



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



Transferencia del Método Analítico del Ensayo de Ácido Valproico de
Cromatografía de Gases a Cromatografía de Líquidos (HPLC).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:

ALEJANDRO ÁLVAREZ DE JESÚS

Director : M. en D.I.I.E. Francisca Robles López



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.

Dedicatorias:

A mi madre por ser ese eslabón que nunca se rompió que supo como guiar y enseñar a la vez reforzando los conocimientos recibidos todos estos años, realmente gracias.

A mis hermanos con los que siempre he compartido juegos, regaños, estudios y palmaditas de aliento para ser mejor persona cada día.

A mis amigos con los que comparto momentos únicos, por sus consejos, sonrisas y aliento de seguir adelante gracias. Maru, Susana, Janet, Isabel, Alma, Laura, Gaby, Rodolfo, Sara, Graciela, Tere, Edith villegas. Agus, Laura Borbolla, Edith Enriquez, Concepción, Aude, Mary y pili.

Con un cariño enorme a tres ángeles que la vida me ha regalado y que son una inspiración extraordinaria en mi vida y camino, Valeria, Andrea y Aurora.

Agradecimientos:

Al laboratorio por el tiempo y espacio permitido en la realización de este trabajo y a las personas que hacen posible que la base de conocimientos sea más sólida para mejorar la toma de decisiones que requiere nuestro trabajo día a día.

A todas esas personas que con su aliento han empujado a que este trabajo se realice por esos momentos de timidez y con su temple se siga adelante. Gracias.

Gracias profesora Francisca Robles López por su paciencia en este tiempo otorgado, por su apoyo incondicional y conocimientos otorgados. Gracias.

Indice.

	Indice	IV
	Acrónimos	VI
1.	Introducción	Í
2.	Antecedentes	3
2.1	Transferencia de métodos analíticos	3
	2.1.1. Clasificación de los métodos de transferencia	4
	2.1.1.1 Los métodos analíticos se validan de acuerdo a su naturaleza	6
	2.1.1.2. Criterios experimentales.	9
	2.1.2. Parametros de validación	13
2.2	La química analítica y su metodología	16
	2.2.1. Métodos de análisis.	17
	2.2.2. Metodología del proceso analítico.	17
2.3	Cromatografía de gases.	21
	2.3.1. Fundamento de cromatografía de gases.	21
	2.3.2. Tipos de columnas	22
	2.3.2.1. Columnas empacadas	22
	2.3.2.2. Columnas capilares	23
	2.3.3 Detectores	25
	2.3.3.1 Parametros caracteristicos de un detector	25
	2.3.3.2. Detector de ionizacion de flama.	27
	2.3.3.3. Detector de conductividad térmica.	27
	2.3.3.4 Detector de captura electronica.	28
	2.3.3.5 Detector de nitrógeno- fósforo.	28
	2.3.3.6 .Detector fotométrico de llama (FPD).	28
	2.3.3.7. Detector fotoionización.	29
2.4	Cromatografía de líquidos HPLC.	29
	2.4.1. Fundamento.	29
	2.4.2. Tipos de separación	30
	2.4.3. Clasificación de la cromatografía líquida.	30
	2.4.4. Instrumentación	31
	2.4.5. Detectores	33
	2.4.5.1. Tipos de detectores	34
	2.4.6. La columna	35
	2.4.7. Tipos de cromatografía	36

2.4.7.1	Cromatografía de fase normal	37
2.4.7.2.	Cromatografía de fase reversa.	37
2.4.7.3.	Cromatografía de exclusión molecular	39
2.4.7.4.	Cromatografía de intercambio iónico	39
2.4.7.5.	Cromatografía basada en bioafinidad.	40
2.4.7.6.	Cromatografía líquida de alta eficacia en condiciones desnaturalizantes (DHPLC)	40
2.4.8.	Elección de la columna y de la fase móvil	41
2.5	Ácido valproico	42
2.5.1.	Farmacología ácido valproico	44
2.5.2.	Epilepsia	44
2.5.3.	Clasificación de las convulsiones epilépticas.	45
2.5.3.1.	Farmacología del ácido valproico. Descripción clínica de las crisis parciales simples	48
2.5.3.2.	Farmacología del ácido valproico. Descripción de las crisis parciales complejas.	49
3.	Planteamiento del problema.	51
4.	Objetivos.	52
5.	Procedimiento y descripción de los pasos de una transferencia de un método analíticos.	53
5.1	Metodología	58
5.1.1.	Diagrama de flujo	59
5.1.2.	Materiales y equipos	60
5.1.3.	Ventajas y desventajas de un método por CG. y HPLC.	61
5.1.4.	Tabla de evaluación con costos.	62
6.	Resultados	65
	Anexo 1 protocolo de transferencia.	
	Anexo 2 protocolo de verificación	
7.	Conclusiones	66
8.	Las propuestas para mejorar el desarrollo de la transferencia	69
9.	Bibliografía.	70

Acrónimos

GTC	Gestión total de la calidad
TQM	Total quality management (Dirección total de la calidad)
TMA	Transferencia de métodos analíticos
SST	Solución para adecuabilidad del Sistema
HPLC	High-performance liquid chromatography
FID	Detector de ionización de llama (flame ionization detector).
TCD	Detector de conductividad térmica (thermal conductivity detector).
TID	Detector termoiónico (thermoIonic detector).
ECD	Detector de captura de electrones (electrón-capture detector).
AED	Detector de emisión atómica (atomic emission detector).
GC	Cromatografía de gases
NP-HPLC	La cromatografía de fase normal HPLC
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CoA	Acuerdos de calidad
GSC	Cromatografía de Gases fase solida
GLC	Cromatografía gas-líquido
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
PLM	Diccionario de Especialidades Farmacéuticas
FEUM	Farmacopea de los estados unidos Mexicanos
LOQ	Límite de cuantificación
WCOT	Pared Cubierta Abierto Tubular
SCOT	Apoyo cubierto abierto tubular

LOL	límite de linealidad
PQL	límite de cuantificación
NIST	Instituto Nacional para normas y tecnología
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
OL	Laboratorio de Origen
Y5	Solución preparada según farmacopea mexicana
RL	Laboratorio que recibe
PM	Peso molecular
N	Normalidad

1. Introducción.

En los inicios del siglo XXI el mercado de la industria farmacéutica privada está regido por las legislaciones vigentes (Nacional e Internacional) y por la presión de la práctica comercial de sus componentes. Este mercado tiene características particulares que se encuadra en un escenario muy competitivo, donde al igual que otros sectores de la salud se debe compatibilizar el concepto de cliente con el de paciente y el de negocio con el de servicio. En este contexto es fundamental el desempeño óptimo y también es importante el rol que cumple el entorno de la administración de la oficina de farmacia como negocio y como centro de salud. ¹

Esta dinámica del servicio farmacéutico y la introducción del concepto de calidad total plantea la necesidad de la administración estratégica, fijando objetivos y políticas a partir del desarrollo de una novedosa capacidad de intervenir en un sistema que tiende a ser cada vez más complejo, con escaso margen de información, con ello provocar un cambio que implique cumplir con los objetivos, metas predeterminadas dentro del equilibrio del sistema competitivo.

El desarrollo de la gestión total de la calidad (GTC) o en inglés TQM comprende la definición de la misión de la organización, el análisis de las condiciones del entorno, la determinación de puntos de control e indicadores de mejora y la identificación de puntos estratégicos que otorguen mayores ventajas competitivas. ^{1, 2} La industria farmacéutica aprueba que la gestión total de calidad es una herramienta eficaz y las transferencias de procesos y métodos analíticos son partes fundamentales de las actualizaciones que se requieren.

La transferencia de tecnología se hace más compleja con los adelantos tecnológicos y su evaluación más constante, trasladar productos a otras partes del mundo como rutina y la transferencia de métodos analíticos hacen todo el conjunto a evaluar en los productos exportados e importados.

Estos párrafos llevan una relevancia porque son los que garantizan que el producto cumpla con el diseño con el cual fueron generados y los fármacos tengan un comportamiento similar en cualquier parte del mundo donde sean distribuidos.

Por tal motivo este trabajo se enfoca en como se lleva a cabo la transferencia de tecnología y los mecanismos que se activan, los cambios requeridos en la transferencia del método analítico del

ensayo de ácido valproico, por el cual los conocimientos técnicos en sus distintas modalidades pasan de un desarrollador de los cambios a un proveedor adquiriente.

Las transferencias se llevan acabo de casa matriz a filiales incorporadas y distribuidoras. Como cambios y documentos que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso, procedimiento, método, equipo o sistema producirá una resultado consistente en cualquier lado donde se distribuyan los productos fabricados.

2. Antecedentes.

2.1 Transferencias de métodos analíticos.

La transferencia de métodos analíticos se demuestra con la capacidad que tiene un laboratorio de reproducir resultados equivalentes, mediante pruebas de origen evaluados con los mismos parámetros con los que fueron validados originalmente. Esto requiere aplicación de técnicas, reactivos, equipos y capacitación del personal involucrado. Mediante documentación (protocolo) de que un laboratorio puede realizar exitosamente un método analítico y obtener resultados satisfactorios en el laboratorio generador del cambio como en el que hará el cambio.

Antes de desarrollar cualquier transferencia de método para cualquier materia prima o producto terminado, debe haber un protocolo establecido. Algunos lineamientos a ser dictaminados en cada protocolo de transferencia son los siguientes:

- La transferencia debe ser desarrollada en dos lotes, con tres preparaciones de muestra para cada lote. Idealmente lotes no comerciales y que contengan algún nivel de impurezas.
- Valor medio para la valoración entre laboratorios debe ser 2% para materias primas y 3% para producto terminado.
- La precisión debe cumplir con los requerimientos intralaboratorios SST (Solución para adecuabilidad del Sistema)
- Para determinación de impurezas conocidas, la diferencia absoluta debe ser no mayor a 0.2%. Precisión (SST) debe ser de 10-15% para las impurezas conocidas.
- Para impurezas desconocidas allí deben ser confirmados cualitativamente.
- Para forma farmacéutica de administración oral, el valor de disolución medio debe ser de 6% y el valor de uniformidad de contenido medio debe ser de 5%.
- Para métodos compendiales el laboratorio debe verificar que el método puede ser desarrollado y que no interfieren sustancias extrañas.

El laboratorio de transferencia debe incluir la siguiente documentación:

- Método finalizado
- Reporte de desarrollo de método
- Reporte de validación o resumen de validación

- Protocolos de transferencia y criterios de aceptación.

El protocolo de transferencia puede ser aprobado por todos los laboratorios involucrados. La documentación que se maneja en el reporte, debe indicar si la transferencia fue exitosa o no. Este consiste en un protocolo completo, un resumen de los resultados y referencia de los datos crudos entre ambos sitios y libros de referencia. Cualquier desviación del protocolo debe ser reportada

La transferencia son mecanismos por el cual los conocimientos técnicos en sus distintas modalidades pasan de un licitante o proveedor a un licenciatarario o adquirente.

La investigación inicial trata de una aplicación que debe comprender y resolver alguna situación, necesidad o problema en un contexto determinado. Se trabaja en el ambiente natural en que conviven las fuentes consultadas, de las que se obtendrán datos relevantes a ser analizados, cuestionados y evaluados.

El cambio se basa en el tipo de producto al que se refiera. Debido a su naturaleza hay métodos de origen que se transfieren por sus propiedades y otros por ser farmacopeicos, esto se refiere si aparecen en documentos oficiales de organismos de regulación sanitaria, de estos solo se ensayan algunos puntos críticos del método validado por farmacopea y si son de origen se transfieren todos los parámetros que se hayan evaluado en la validación.^{7, 25 y 11}

2.1.1. Clasificación de los métodos de transferencia.

Los métodos de transferencia se clasifican como complejos, moderadamente complejos o simples. Un método en algunas circunstancias puede ser complejo y bajo otras condiciones puede ser moderadamente complejo o aún simple.³

Diferentes métodos de procesos.

- Transferencia de métodos analíticos complejos.
- Transferencia de métodos analíticos moderadamente complejos.
- Transferencia de métodos analíticos simples.
- Transferencia en proceso del método analítico.

La categorización debe estar basada entre otros puntos en:

- Un acuerdo entre ambos laboratorios (el de origen y el que recibe) y si está involucrado el centro técnico también debe estar de acuerdo.
- El método.
- Instrumentos utilizados.
- Reactivos y estándares.
- Protocolo de transferencia.
- Entrenamiento y experiencia del laboratorio que recibe.

Métodos analíticos complejos.

Métodos que requieren trabajo de laboratorio para determinar que el laboratorio que recibe está calificado para realizar rutinariamente el método analítico. Hay métodos como los de las sustancias relacionadas en los que el laboratorio que recibe generalmente no tiene suficiente entrenamiento o experiencia con el procedimiento(s). Otros ejemplos incluyen métodos que requieren de nueva tecnología o requerimientos de experiencia específica.

Métodos analíticos moderadamente complejos.

Ejemplos de estos métodos son: métodos cromatográficos, métodos microbiológicos o métodos compendiales para los que hay alguna experiencia, relacionada en el laboratorio que recibe, el método es claro y sencillo de seguir o el método analítico es similar a otra metodología realizada de manera rutinaria en el laboratorio que recibe.

Métodos analíticos Simples.

Ejemplos de estos métodos son análisis fisicoquímicos como determinación de agua por Karl Fischer, pH, pérdida al secado, metales pesados, residuos de ignición, otros métodos no específicos de un producto como son los métodos generales compendiales o métodos estándar, entre otros. Hay métodos similares a los que se realizan en el sitio y actualmente en el laboratorio que recibe o si el personal del laboratorio de origen que tiene experiencia en el método va a ser transferido al laboratorio que recibe. Los métodos pueden ser verificados

utilizando criterios como linealidad del sistema al momento de uso por el laboratorio que recibe si se considera apropiado por el laboratorio de origen o por el laboratorio que recibe.

Los métodos que no requieren transferencia solo se verifican por ejemplo métodos farmacopeicos en evaluaciones físicas u organolépticas.

Estos pasos son necesarios al transferir conocimientos y tecnologías relacionadas a métodos analíticos comerciales. Las transferencias deben ser completadas en paralelo a múltiples laboratorios. Material relacionado será un protocolo de transferencias de método analítico en el cual se contemplarán equipos, material y personal capacitado, según aplique.

2.1.1.1 Los métodos analíticos se validan de acuerdo a su naturaleza

Los métodos analíticos se deben validar de acuerdo a la naturaleza del método en:

- Métodos de cuantificación.
- Métodos de determinación de impurezas.
- Límite de detección.
- Identidad entre otros.

Para estudiar lo anterior se determinan parámetros como linealidad, rango, especificidad, exactitud, precisión, tolerancia, robustez y los límites de detección y cuantificación según sea el caso.

En el caso de que no exista dicho método se propone uno mediante un diseño factorial o se determina las condiciones de trabajo ver tabla 1 donde se colocan algunos parametros que se toman en cuenta para transferir el método más adecuado.

Tabla.1 Especifica los requerimientos para la transferencia de un método complejo, simple y Moderadamente complejos.

Requerimientos	Métodos complejos	Métodos moderadamente complejos	Métodos simples
Nombre y número del método (#)	+	+	+
Número de control de cambios para TMA	+	+	+
Método analítico incluyendo System Suitability, requerimientos y cálculos	+	+	-
Persona de contacto en el laboratorio de origen	+	+	-

Requerimientos	Métodos complejos	Métodos moderadamente complejos	Métodos simples
Datos de referencia del laboratorio de origen	+	+	-
Referencia de la validación del método analítico (número del reporte de validación)	+	+	+(si está disponible)
Discusión sobre los riesgos	+	+	+
Estabilidad de la solución del estándar	+	+	-
Estabilidad de las soluciones de la muestra	+	+	-
Criterios de aceptación para métodos analíticos cromatográficos que pueden incluir:			
Análisis de la muestra (rango de valores aceptables)	+	+	-
Linealidad (rango, coeficiente de correlación e y-intercepto)	+	-	-
Exactitud	+	-	-
Precisión (promedio y desviación estándar)	+	+	-
Requerimientos alternativos que pueden ser utilizados en lugar de los criterios anteriores para los métodos analíticos. Los ejemplos incluyen métodos de limpieza, métodos en donde el dato de recobro debe ser obtenido en el laboratorio que recibe, productos que requieren la modificación de los requerimientos como cuando el material es una sustancia controlada y se dificulta la transferencia de la muestra y/o métodos analíticos microbiológicos en donde es más apropiada la verificación del método.	-	Cuando se requiera	-
Pre-aprobación del laboratorio de origen.	+	+	-
Pre-aprobación del laboratorio que recibe.	+	+	-
Pre-aprobación del centro técnico (si está involucrado en el TMA).	+	+	-
Pre-aprobación de aseguramiento de calidad del laboratorio que recibe.	+	+	-
Datos de referencia (laboratorio que recibe)	+	+	-
Datos adjuntos (laboratorio que recibe)	+	+	-
Post-aprobación del Centro técnico (si está involucrado en el TMA).	+	+	+
Post-aprobación del laboratorio que recibe	+	+	+
Post-aprobación del laboratorio de origen	+	+	+
Post-aprobación del Gerente de laboratorio que recibe	+	+	+
Post-aprobación del Gerente del laboratorio de origen	+	+	+
Post-aprobación de aseguramiento de calidad en el laboratorio que recibe.	+	+	+

Nota: El signo (+) indica que aplica y (-) indica que no aplica el requerimiento.

Los métodos cromatográficos.

Generalmente se transfieren como métodos individuales. Si el laboratorio de origen tiene múltiples métodos cromatográficos que son similares, es posible transferirlos como un grupo.

La transferencia de un grupo de métodos puede ocurrir cuando:

- Se determina que los métodos son similares para ambos laboratorios, el de origen y el que recibe.
- Se han realizado métodos similares en el laboratorio que recibe.
- Se ha completado el entrenamiento previo a la transferencia del método por el laboratorio que recibe, si aplica.

Los métodos son parte de un proyecto y van a ser transferidos en el mismo periodo de tiempo.

Capacitación previa.

Entrenamiento del personal de laboratorio en el laboratorio que recibe.

Si el laboratorio que recibe no tiene la experiencia requerida y el laboratorio de origen determina que se requiere el entrenamiento, el laboratorio que recibe y el centro técnico o el representante técnico aplicable (cuando están involucrados en el TMA) deben ser entrenados por completo antes de que el laboratorio que recibe inicie el trabajo de laboratorio para la transferencia del método analítico. El análisis de las muestras de práctica puede ser parte del plan de entrenamiento. Si el entrenamiento se proporciona después de que el TMA esté pre-aprobado, los documentos que demuestran que se completó el entrenamiento se deben anexar al paquete de la transferencia del método analítico antes de que se apruebe.

El procedimiento que realiza el centro técnico si participa en la transferencia del método analítico para iniciar la capacitación previa del laboratorio que recibe es el siguiente:

Participa en la transferencia como el químico del laboratorio de origen si el personal del centro técnico está facilitando la transferencia con mayor participación que el laboratorio de origen.

Identifica al personal que integra el equipo principal de trabajo constituido por personal del:

- Laboratorio de origen.
- Centro Técnico.

Laboratorio que recibe.

- Incluye en el equipo del laboratorio que recibe por lo menos al supervisor y al químico analista que realizará el ensayo.

- Verifica que el Químico de la primera transferencia del laboratorio de origen sea parte del equipo.
- Señala el tiempo límite para la transferencia aprobado por el equipo principal.
- Verifica que una persona del centro técnico generalmente sea parte de todos los equipos de la transferencia.
- Verifica que todo el personal que integra el equipo principal revise todos los documentos que integran el archivo de transferencia de tecnología antes de realizar la junta inicial de la transferencia del método analítico.

2.1.1.2. Criterios experimentales.

Son los puntos que se deben determinar antes de iniciar el estudio, si el producto terminado es caduco o no caduco. En algunos casos se espera que los datos generados puedan no satisfacer las especificaciones del producto, por ejemplo cuando se utilizan productos caducos. Esto debe estar explicado en el protocolo de transferencia del método que tipo de producto es el requerido para la transferencia.

Resultados de referencia en algunos casos puede ser apropiado utilizar un certificado de análisis (CoA), resultados de validación recientes o resultados de estabilidad del laboratorio que origina los resultados.

- El ensayo
- Para productos de concentraciones múltiples puede ser apropiado utilizar un bracketing (concentración más alta y más baja)

Se deben satisfacer todos los criterios aplicables (en listados en el método) del system suitability. Los criterios de aceptación deben incluir una comparación del promedio y la variabilidad de los resultados.

Uniformidad de contenido

Si el método para realizar la uniformidad de contenido es equivalente al método de ensayo por ejemplo los estándares y muestras son preparados a concentraciones equivalentes, las condiciones cromatográficas y los criterios del system suitability son los mismos, entre otros. entonces la uniformidad de contenido puede ser transferida como un método simple.

Si se utiliza un método diferente por ejemplo UV vs. HPLC o una preparación diferente de la muestra, entonces se debe realizar el trabajo de laboratorio.

Para productos de concentraciones múltiples un bracketing puede ser apropiado concentración más alta y más baja.

Se deben satisfacer todos los criterios aplicables (enlistados en el método) del system suitability.

Productos de degradación / impurezas se deben satisfacer todos los criterios aplicables en listados en el método del system suitability.

- El límite de cuantificación debe ser confirmado por el laboratorio receptor.
- En general el límite de cuantificación o PQL es generado vs. el componente principal o principio activo si los estándares individuales no son requeridos para el ensayo.
- Los cromatogramas de ambos laboratorios deben ser comparados para asegurar un perfil similar de las impurezas, por ejemplo se obtienen tiempo de retención relativo similar y respuesta de los picos relativa para picos conocidos y desconocidos del límite de cuantificación.
- Debe asegurarse que las muestras analizadas por ambos laboratorios sean idénticas, vigencia, empaque, homogeneidad, almacenamiento, entre otros.
- Si muestras típicas no contienen impurezas o degradantes por arriba del límite de cuantificación, puede ser necesario el uso de muestras adicionadas o degradación forzada de las muestras para realizar la transferencia entre ambos laboratorios.

Si se han realizado cuidadosamente los análisis, la exactitud y precisión de los resultados obtenidos por el laboratorio que recibe debe ser similar a los resultados obtenidos por el laboratorio de origen durante los estudios de validación.

La disolución se divide por las características del producto a transferir:

- Para productos de liberación inmediata se recomienda realizar la prueba de disolución de seis unidades por un analista en el laboratorio de origen y otro analista en el laboratorio que recibe.
- Para productos de liberación prolongada o en donde el laboratorio que recibe no realiza de manera rutinaria este tipo de análisis, un perfil de disolución o una prueba de disolución de 12 unidades se realiza por el laboratorio de origen y se recomiendan dos analistas en el laboratorio que recibe.

- Para productos de concentraciones múltiples puede ser apropiado utilizar un bracketing concentración más alta y más baja.
- Los datos de la disolución de ambos laboratorios deben satisfacer las especificaciones para el producto si aplica, el perfil de disolución en ambos laboratorios debe ser similar. Se puede aplicar una disolución etapa 2, si aplica.
- El criterio de aceptación puede estar basado en una diferencia absoluta de las medias.

Selección de criterios del laboratorio de origen y/o centro técnico determinarán apropiadamente los criterios de la transferencia del método analítico basados en:

- La complejidad del método analítico.
- El desarrollo del método.
- El histórico de resultados y/o los resultados de validación.
- Los pasos requeridos mínimos para el centro técnico se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Pasos de la transferencia que sigue el centro técnico que participa.

Paso	Responsable	Acción
1	Laboratorio que recibe	El personal de aseguramiento de calidad debe aprobar el paquete de transferencia del método analítico.
2	Laboratorio de origen / laboratorio que recibe / centro técnico, si aplica.	El representante del laboratorio de origen y del laboratorio que recibe (dos niveles de cada área) aprueba el paquete del TMA, también lo firma el centro técnico, si aplica.
3	Laboratorio que recibe.	Revisa que el paquete del TMA esté completo con las firmas de aprobadores donde indica que el laboratorio que recibe está calificado para realizar de manera rutinaria el análisis para el método analítico.
4	Laboratorio que recibe	Revisa cuidadosamente el método analítico y considera los elementos revisados durante la transferencia para asegurar que se tenga el método en el laboratorio con la claridad suficiente y que no hay instrucciones poco claras o no entendibles.

5	Centro técnico o laboratorio de origen o laboratorio que recibe (cuando es apropiado)	Crea e implementa un documento aprobado del método analítico (ejemplo: método local) en el sistema de documentación.
6	Laboratorio de origen / laboratorio que recibe / centro técnico, si aplica	Verifica que el control de cambios esté completo y cerrado.
7	Laboratorio de origen / laboratorio que recibe / centro técnico, si aplica	Archiva el paquete completo del TMA y entrega al laboratorio que recibe una copia del paquete del TMA. Una copia de los datos del laboratorio de origen debe ser proporcionada al laboratorio que recibe en los casos donde el laboratorio de origen es otra compañía. El reporte de validación debe estar completo, aprobado y archivado si la transferencia del método analítico se completó como una co-validación.

Es importante en general todos los resultados deben satisfacer los criterios de aceptación preaprobados se permiten variaciones a los criterios de aceptación sugeridos pero deben ser adecuadamente justificados en el protocolo de transferencia del método analítico.³

Procedimientos: Finalización de la transferencia del método analítico. El procedimiento para finalizar la transferencia del método analítico y cerrar el control de cambios se requiere que todos los documentos estén llenados correctamente.

Desarrollo del protocolo de transferencia puntos a considerar

Se realiza el análisis documental para ácido valproico.

2.1.2. Parámetros de validación.

Son los puntos mínimos requeridos que se deben determinar durante un proceso de validación del método analítico.^{4, 5, 6}

Especificidad: habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

Exactitud: (veracidad): expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado valor promedio obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

Intervalo de linealidad: ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra incluyendo estas concentraciones para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Limite de cuantificación: Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.

Limite de detección: Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

Linealidad: Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Material de referencia (patrón terciario): Material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecidas para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

Material de referencia certificado patrón secundario: material en el que los valores de una o más de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente validado, bien sea que esté acompañado de, o pueda obtenerse, un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador.

Material estandar de referencia (patrón primario): material emitido por la oficina nacional de normas de Estados Unidos (U.S national bureau of standars) cuyo nombre fue cambiado recientemente a instituto nacional para normas y tecnología (National institute for standards and technology, NIST).

Método analítico: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

Parametros de desempeño analítico: Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo de linealidad y robustez.^{7, 8.}

Libros oficiales: organismos acreditados y aprobados FEUM. USP. entre otros.^{9, 10, 11 y 12}

Precisión: expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea puede ser determinada usando muestras preparadas o una disolución de la muestra.

Precision intermedia: Precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.

Procedimiento analítico: Forma en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no necesariamente los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

Procedimiento analítico oficial: Procedimiento analítico estandarizado contenido en una farmacopea oficial o libros oficiales. Se les supone validados y los laboratorios que los utilizan no están obligados a validar la exactitud de los mismos, solamente demostrar su aptitud para aplicarlos, validando la linealidad y precisión del sistema.

Repetibilidad (repetitividad): Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología.

Robustez: Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

Selectividad: Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

Sesgo: Se usa en el sentido de exactitud de un promedio a largo plazo (valor esperado) de una serie de promedios. Es la diferencia en el valor esperado (teóricamente igual al promedio de un número infinito de valores individuales independientes) del valor verdadero, correcto o asumido.

Sistema analítico: Está compuesto por: equipos, reactivos, materiales, documentos, patrones, materiales de referencia, analistas y variables operativas, que se utilizan en un método de análisis.

Técnica analítica: Principio científico que se ha encontrado útil para proveer información sobre la composición de un determinado producto o material

Validación: Confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

Validación de un procedimiento analítico: Procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.^{5, 13}.

2.2. La química analítica y su metodología

La química analítica se define como la ciencia que desarrolla y mejora métodos e instrumentos para obtener información sobre la composición y naturaleza química de la materia. Dentro de la química analítica se incluye el análisis químico que es la parte práctica que aplica los métodos de análisis para resolver problemas relativos a la composición y naturaleza química de la materia. Los ámbitos de aplicación de los análisis químicos son muy variados en la industria, destaca el control de calidad de materias primas y producto terminando. En el comercio los laboratorios certifican sus análisis y aseguran las especificaciones de calidad de sus productos.

Es interesante realizar una definición de términos ligados al análisis:

- Muestra: Parte representativa de la materia objeto del análisis.
- Analito: especie química que se analiza.
- Técnica: medio de obtener información sobre el analito
- Método: Conjunto de operaciones y técnicas aplicadas al análisis de una muestra.
- Análisis: Estudio de una muestra para determinar su composición y su naturaleza química.

Dentro de la química analítica también pueden diferenciarse diversas áreas según la información que se desee obtener, así la química cuantitativa se centra en identificar la presencia o ausencia de un analito mientras que la química analítica cuantitativa desarrolla métodos para determinar su concentración.

2.2.1. Métodos de análisis.

Métodos clásicos que se basan en las propiedades químicas del analito. Se incluyen los métodos gravimétricos, volumétricos y los métodos de análisis cualitativos clásicos.

Métodos instrumentales, basados en propiedades físico químicas. La clasificación de los métodos instrumentales se realiza en base a la propiedad que se mide espectroscópicos, electroanalíticos, térmicos entre otros.

Métodos de separación. Se incluyen en este grupo los métodos cuya finalidad es la separación de compuestos para eliminar las interferencias y facilitar las medidas.

2.2.2. Metodología del proceso analítico.

La química analítica alcanza sus objetivos mediante una metodología que se fundamenta en la aplicación del método científico hipótesis desde un punto de vista formal. Esta metodología es común a todas las ciencias experimentales y sigue el proceso de la figura. (1).

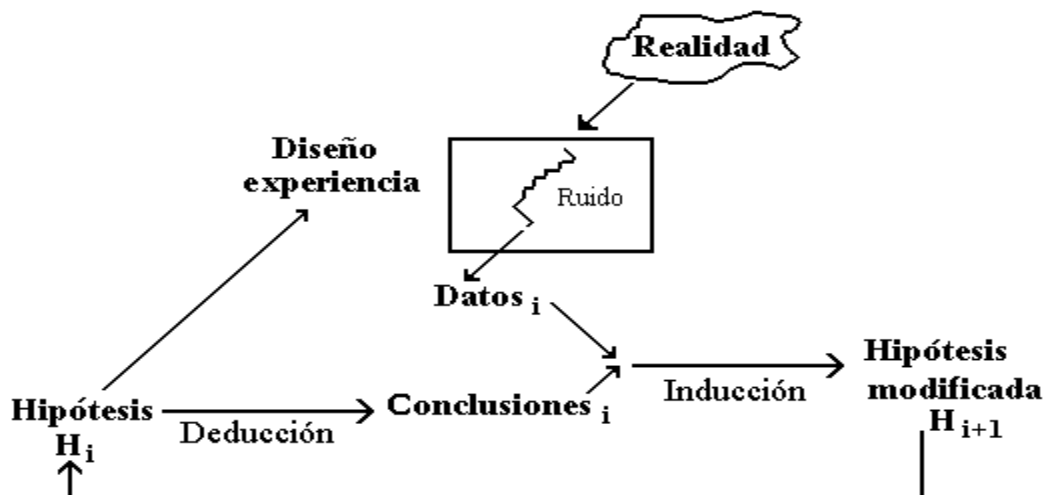


Figura 1. Metodología fundamentada en la aplicación del método científico “Hipótesis”.

Particular de la química analítica es la metodología del análisis químico, que puede resumirse en un proceso analítico general consistente en un conjunto de procedimientos realizados para solucionar un determinado problema analítico. En la figura (2). se esquematiza este proceso:

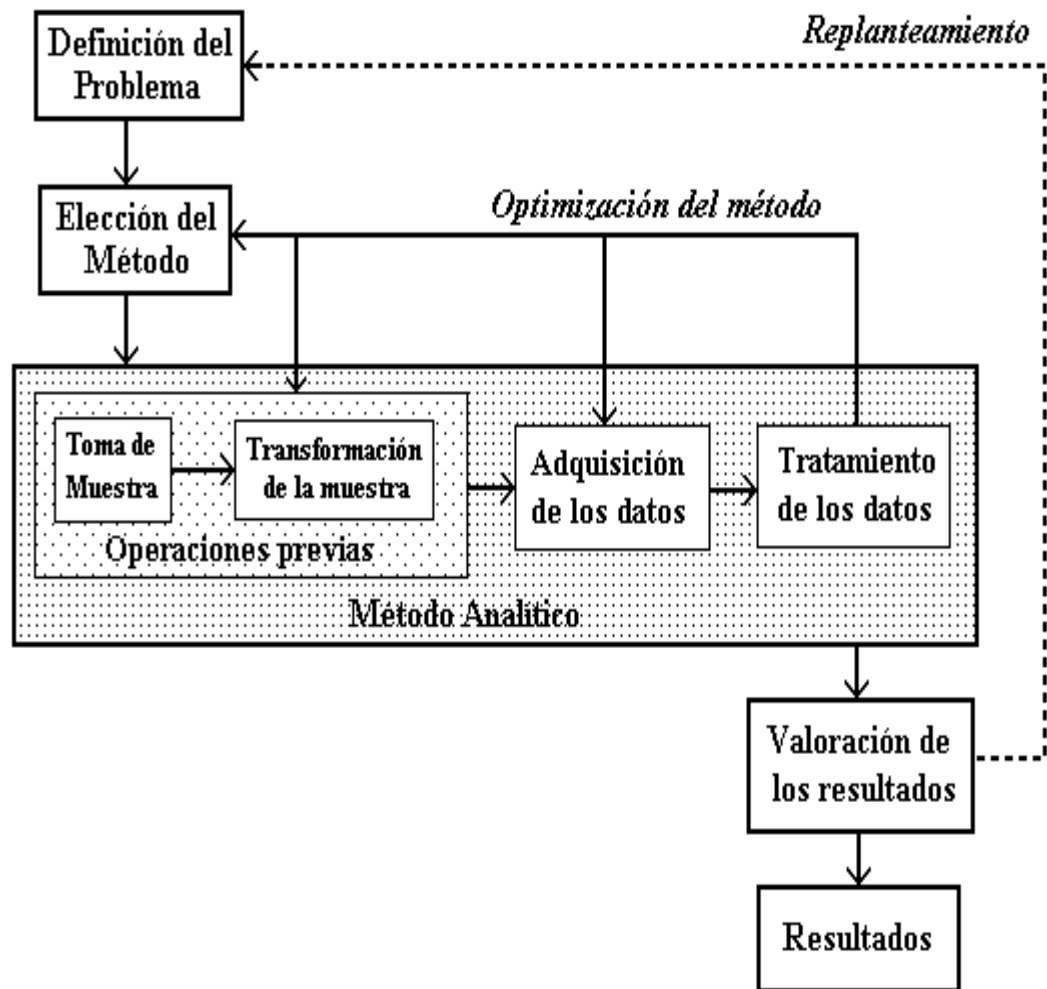


Figura 2 . Procedimiento general para solucionar un determinado problema analítico.

El desarrollo práctico del método analítico consta de tres etapas figura 2:

- La definición del problema es la primera etapa, en ella se plantea el tipo de análisis que se necesita y la escala de trabajo, posteriormente debe realizarse la elección del método analítico, aspecto clave para una resolución adecuada del problema.
- Una vez elegido el método, se procede a su ejecución.
- Posteriormente, se pasa a valorar los resultados obtenidos para establecer si el problema ha sido resuelto de forma satisfactoria. Si no es así, se debería reiniciar el proceso analítico y replantear el problema como se observa en la figura 2.

Las operaciones previas o preliminares, pueden descomponerse en dos sub-etapas. En la primera, se realiza una toma de muestra representativa del material a analizar. En la segunda, se

lleva a cabo una transformación de la muestra o parte de la misma, de forma que la especie o especies químicas de interés pasen a una forma medible inequívocamente. Esta transformación, de ser necesaria, podría requerir etapas de separación de sustancias interferentes y etapas de reacción química que hagan más sensible y específica la medición de la señal debida al analito.

En la etapa de adquisición de datos tiene cada vez más importancia la instrumentación analítica.

El proceso de medida instrumental básico puede separarse en tres etapas:

- La generación de un flujo de energía,
- La interacción de este flujo con la muestra
- Medición y procesado de la señal procedente de la muestra.

Por último, la etapa de tratamiento de datos consiste en el proceso matemático de los datos para obtener unos resultados que den el valor más probable de la información buscada, así como la incertidumbre que la acompaña. Características de calidad de los métodos analíticos:

- Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado. En ausencia de exactitud se tiene error sistemático.
- Precisión: Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie. Refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico.
- Sensibilidad: Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.
- Límite de detección: Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
- Intervalo dinámico: Intervalo de concentraciones entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de linealidad (LOL).
- Selectividad: Cuantifica el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz.

Seguridad: Amplitud de condiciones experimentales en las que puede realizarse un análisis.

Además, se debera de considerar otro tipo de parámetros asociados y de gran importancia práctica como son la rapidez, costo, seguridad del proceso, toxicidad de los residuos, entre otros.

Un mecanismo muy indicado para conocer la calidad del método analítico es participar en programas de inter-comparación con otros laboratorios. En ellos, un organismo independiente evalúa los resultados, tanto en exactitud como en precisión, sobre muestras enviadas a los laboratorios participantes. Los resultados de la inter-operación permiten corregir los errores de funcionamiento del método analítico y, una vez comprobada la calidad del mismo, obtener la homologación del laboratorio para realizar los análisis. La homologación requiere la puesta en marcha de un programa de garantía de calidad, que permita controlar el funcionamiento global del laboratorio.

Trazabilidad de los resultados analíticos. La calidad de los resultados analíticos exige que estos sean trazables, esto es que puedan relacionarse directamente con las unidades patrones del sistema internacional de medida (amperio, kilogramo, mol, metro y segundo). La trazabilidad exige una cadena ininterrumpida de comparaciones que une el resultado obtenido con los estándares del sistema internacional y que, en análisis químico, pasa por las sustancias de referencia, los patrones químicos tipo primario y secundario, los estándares físicos, los pesos atómicos, etc. El concepto de trazabilidad se aplica tanto al resultado de un análisis, como a una medida cualquiera, al instrumento con el que se obtiene, el método que se aplica y el laboratorio mismo. Cuando un resultado es trazable implica que ha sido obtenido en un laboratorio confiable, aplicando instrumentos calibrados y un método validado.

En un método absoluto como la gravimetría la cadena de trazabilidad es corta:

Muestra---precipitado---masas atómicas----mol, Kg.

En un método relativo como una volumetría la cadena es más larga:

Muestra---patrón secundario---patrón primario---masas atómicas----mol, Kg. ^{5, 27, 28.}

2.3. Cromatografía de Gases.

2.3.1. Fundamento de cromatografía de gases.

la cromatografía es una técnica que permite la separación de un analito que se encuentran en una mezcla a través de un proceso de migración diferencial donde los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil gas inerte y retenidos selectivamente por una fase estacionaria sólida.^{8, 14.}

La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatografía. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte y en el orden en que emergieron hacia un detector donde a través un software se procesa la separación de componentes y se registran concentraciones y tiempos de retención característicos a diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas de la muestra. Su única función es la de transportar el analito a través de la columna.^{8, 14, 30}

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-sólido (GSC) separación de sustancias en las que la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un sólido y la cromatografía gas-líquido (GLC) separación de sustancias en las que la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido, siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso el gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones.

- Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector a utilizar...

El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, nitrógeno, hidrógeno, argón o dióxido de carbono, y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado y molécula a analizar. El almacenaje del gas puede ser en cilindros de alta presión normales o

empleando un generador, especialmente en el caso del nitrógeno y hidrógeno. Luego tenemos un sistema de manómetros y reguladores de flujo para garantizar un flujo estable. Y trampas de humedad. Generalmente la regulación de la presión se hace a dos niveles: un primer manómetro se sitúa a la salida del cilindro o generador del gas y el otro a la entrada del cromatógrafo, donde se regula el flujo. Las presiones de entrada varían entre 1.0 y 25 psi, lo que da lugar a caudales de 25 a 150 mL/min en columnas de relleno y de 1 a 25 mL./min en columnas capilares. La pureza de los gases es sumamente importante, se requieren niveles 4.5 o mayores es decir 99.995 % de pureza. Sin embargo, debido al cuidado que se debe tener con la fase activa de la columna, se hace completamente necesario la instalación de trampas de humedad a la entrada del gas acarreador, estas trampas obviamente tienen una capacidad limitada, pero son importantísimas al momento de usar el cromatógrafo. Estas trampas evitan el ingreso de hidrocarburos, agua, CO entre otros.^{8, 14, 30.}

2.3.2. Tipos de columnas

En cromatografía gas-líquido se llevan a cabo en columnas empacadas, en las cuales la fase estacionaria es una película delgada de líquido colocada en la superficie de un soporte sólido inerte y finamente dividido las columnas no empaquetadas con diámetros interiores de unas pocas décimas de milímetro deberían proporcionar separaciones mucho mejores que las columnas de relleno, tanto en rapidez como en eficacia de columna. En las columnas capilares, la fase estacionaria es una película uniforme de líquido con unas décimas de micrómetros de grosor que recubriría uniformemente el interior del tubo capilar. Éste tipo de columnas. La columna es de sílice fundida fabricada en una sola pieza y con un diámetro interno de 0.32 mm y una longitud de 2100 m. La columna se recubrió con una película de 0.1 micrómetros de polidimetilsiloxano.

2.3.2.1. Columnas empacadas

Las actuales columnas empacadas, se fabrican en tubo de vidrio, metal (acero, inoxidable, cobre, aluminio), o de teflón, con una longitud característica de 1 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm. Estos tubos se empaquetan densamente con un material de relleno sólido, finamente dividido y homogéneo, que se recubre con una delgada capa (0,05 a 1 μm) de la fase estacionaria

líquida. Con objeto de poder introducir las en un horno termostático, los tubos se configuran en forma helicoidal con un diámetro aproximado de unos 15 cm.

Materiales de soporte sólidos. El soporte sólido en una columna de relleno sirve para retener y ubicar la fase estacionaria, de tal forma que haya la mayor superficie de contacto posible con la fase móvil. El soporte ideal consiste en partículas esféricas, pequeñas, y uniformes con una buena resistencia mecánica y una superficie específica de al menos 1 metro² entre gramo. Además, el material debería ser inerte a elevadas temperaturas, y poder humectarse homogéneamente con la fase líquida.

Tamaño de partícula de los soportes. La eficacia de la columna en cromatografía de gases, aumenta rápidamente cuando disminuye el diámetro de partícula del relleno. Sin embargo, la diferencia de presión que se requiere para mantener un determinado caudal de gas portador, varía inversamente con el cuadrado del diámetro de la partícula; esto último ha condicionado el límite inferior del tamaño de las partículas que se utilizan en cromatografía de gases, dado que no es conveniente trabajar con diferencias de presión superiores a los 4 bares.

2.3.2.2. Columnas capilares

Las columnas capilares, o capilares abiertas, son de dos tipos básicos, denominados capilares de pared recubierta (WCOT) y capilares con soporte recubierto (SCOT). Las columnas de pared recubierta son simplemente tubos capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las columnas abiertas con soporte recubierto, la superficie interna del capilar está revestida de una fina capa (de unos 30 µm) de un material soporte, tal como tierra de diatomeas. Este tipo de columnas contiene varias veces la fase estacionaria de una columna capilar de pared recubierta y, por tanto, tienen una mayor capacidad de carga. Generalmente, la eficacia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero es sensiblemente mayor que la de una columna de relleno. Al principio, las columnas WCOT se construían de acero inoxidable, aluminio, cobre o plástico, posteriormente se utilizó el vidrio. Con frecuencia las columnas de vidrio se trataban químicamente para transformarlas en una superficie rugosa, donde la fase estacionaria se unía más fuertemente. Las nuevas columnas WCOT, que se son columnas tubulares abiertas de sílice fundida (columnas FSOT). Los capilares de sílice fundida

se fabrican a partir de sílice especialmente purificada con un contenido mínimo de óxidos metálicos. Estos capilares tienen las paredes mucho más delgadas que sus equivalentes de vidrio. La resistencia de los tubos se refuerza con un recubrimiento externo protector de poliamida, el cual se aplica en el momento de la obtención del tubo capilar. Las columnas que resultan son flexibles y pueden doblarse en forma helicoidal con un diámetro de varios centímetros. Las columnas capilares de sílice están disponibles en el comercio, y ofrecen importantes ventajas tales como resistencia física, una reactividad mucho menor frente a los componentes de la muestra y flexibilidad. En la mayoría de las aplicaciones, han sustituido a las antiguas columnas de vidrio WCOT. Las columnas capilares de sílice más frecuentemente utilizadas tienen diámetros internos de 320 y 250 μm . También se venden columnas de alta resolución, con diámetros de 200 y 150 μm . La utilización de estas columnas es más problemática y son más exigentes con respecto a los sistemas de detección y de inyección. Por ejemplo, se ha de utilizar un divisor de muestra para reducir el tamaño de la muestra inyectada en la columna, y se requiere un sistema de detección más sensible con un tiempo de respuesta rápido.

Adsorción sobre los rellenos de la columna o las paredes de capilar. Uno de los problemas que siempre ha afectado a la cromatografía de gases, ha sido la adsorción física de los analitos polares o polarizables sobre las superficies de silicato de los soportes de las columnas o de las paredes del capilar. La adsorción da como resultado picos distorsionados, los cuales se ensanchan y a menudo presentan cola. Se ha demostrado que la adsorción se produce como consecuencia de los grupos silanol que se forman en la superficie de los silicatos debido a la humedad. Los grupos SiOH presentes en la superficie del soporte tienen una gran afinidad por las moléculas orgánicas polares, y tienden a retenerlas por adsorción. Los materiales soporte pueden desactivarse por sililación con dimetilclorosilano (DMCS) seguido de un lavado con alcohol. Las superficies sililadas de los soportes todavía pueden mostrar una adsorción.

Residual, que al parecer se produce debido a las impurezas de óxidos metálicos presentes en la tierra de diatomeas. Un lavado ácido previo a la sililación elimina estas impurezas.

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición del analito o analitos, como también la máxima temperatura de funcionamiento de la columna (fase estacionaria), y por lo general se ajusta a un

valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elución va a oscilar entre 2 a 30 y 40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar bien o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución ya que aunque a mayor temperatura la elución es más rápida, se corre el riesgo de descomponer el analito. Se puede programar la rampa tanto para aumentar como para disminuir la temperatura del horno para que no haya solapamiento de los picos.^{8, 14, 30}

2.3.3 Detectores

El detector es la parte mas importante de esta tecnica y una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna se hace preciso el disponer de ésta de un sistema de deteccion, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo una señal proporcionada a la cantidad de substancia que pasa a través de el. los detectores utilizados en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no ofrecen señal cuando pasa por ellos solamente el gas portador y responden ante alguna propiedad que puede variar cuando éste se encuentra mezclado con alguna substancia eluida de la columna

2.3.3.1 Parametros caracteristicos de un detector

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- Señal del detecor este mide una propiedad que diferencia el gas portador de la mezcla gas portador / substancia eluida. El cambio medido por el detector, denominado señal (S), es proporcional a la magnitud de la propiedad a la que responde (a), a una constante propia del diseño del detector (K) y al número de moléculas de la substancia eluida en el detector (N). $S = K \cdot a \cdot N$. la señal ofrecida es la suma de S se cualquier substancia eluida, del gas portador y de las impurezas de éste.
- Sensibilidad: Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale el analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito

esta se define como el cambio en la señal medida DELTA-S. originado por un cambio de concentracion del gas y la substancia eluida DELTA-N_s

$DELTA-S / DELTA-N_s = k_{a_s}$. Es decir, la sensibilidad de un detector hacia una substancia estará dada por el producto de la constante de diseño del detector y el valor de la propiedad analizada de la substancia eluida. en consecuencia la sensibilidad será diferente para cada substancia.

- Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud esta se define como la constante de proporcionalidad de la relación entre el logaritmo de la señal ofrecida por el detector y el logaritmo de la concentracion de la substancia eluida. Es relativamente frecuente encontrar evaluaciones de la linealidad de los detectores en cordenadas lineales donde $1 = 1$ se denomina detectores lineales y el resto no lineales. De cualquier forma , la utilizacion de cordenadas lineales no es correcta ya que muchos detectores muestran dependencia de la señal con la concentracion de tipo exponencial dejando al margen las desviaciones producidas por la amplificación de la señal. El intervalo de concetraciones para el que la linealidad no cambia, es conocido como el rango dinámico lineal del detector.
- Tiempo de respuesta minima, independiente del caudal de salida, la señal de fondo por un detector, fluctúa con el tiempo debido a la inconstancia de los parámetros experimentales, estas fluctuaciones pueden ser consideradas como errores aleatorios de la medida y son denominadas ruido. El nivel de ruido oscila continuamente alrededor de una señal promedio correspondiente a la minima cantidad detectable
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos 350-400 °C, temperaturas típicas trabajo.
- Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo, o a prueba de operadores inexpertos.
- Respuesta semejante para todos los analitos.
- Respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos.

2.3.3.2. Detector de ionizacion de flama.

Detector de ionización de flama (FID, flame ionization detector destructivo).es talvez el más ampliamente utilizado en cromatografía de gases. Este tipo de detector es universal ya que es selectivo hacia los compuestos que presentan enlaces. Carbón-hidrógeno por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él. En un detector de ionización de llama el gas procedente de la columna se mezcla en la cavidad del detector el gas carreador se mezcla con H₂ y aire y se quema en una flama dentro del detector los átomos de carbón de compuestos orgánico pueden producir radicales Carbón-hidrógeno, los cuales a su vez producen iones Carbón-hidrógeno-oxihídrica en la flama y producir una señal.

El mecanismo de generacion de iones en este detector es complejo y no del todo conocido, dado que la energia de la llama es demasiado baja para explicar la generacion de iones, generalmente son generados por un proceso de ionización química en el que la energía liberada por reacciones fuertemente exotérmicas es retenida por las moléculas orgánicas, generándose iones a partir de las moléculas excitadas.

Los detectores de ionización de llama ofrecen una elevada sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado.

2.3.3.3. Detector de conductividad térmica.

Detector de conductividad térmica (TCD, thermal conductivity detector no destructivo). este termino se refiere a la capacidad de una sustancia de transportar calor de una región caliente a otra fria a mayor conductividad térmica más rápido se transporta el calor, el detector de conductividad térmica suele consistir en un filamento caliente de tungsteno hacia el cual se dirige el gas que sale de la columna cromatográfica. En un detector de conductividad, el gas procedente de la columna pasa a través de una cavidad termostalizada que contiene el elemento sensor un hilo de metal caliente donde pasa el gas portador puro la perdida de calor del sensor es función de la diferencia de temperatura entre éste y la pared de la cavidad y de la conductividad termica del gas portador, se traduce en una vareación de una señal electrica que se convierte en señal.

El detector de conductividad térmica es universal y no es destructivo, por lo general se utiliza para el análisis de gases permanentes, hidrocarburos ligeros y otros tipo de compuestos que

ofrecen una respuesta pobre en otros tipos de detectores. Su sensibilidad oscila entre 10^{-6} y 10^{-8} g. con un rango dinámico lineal de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud.

2.3.3.4 Detector de captura electronica.

Detector de captura de electrones (ECD, electrón-capture detector no destructivo). Mide una pérdida de señal cuando el analito se eluye de la columna y los electrones así formados son atraídos a un anodo lo que produce una pequeña corriente uniforme. Debido a que utiliza una fuente de radiación beta para bombardear el gas portador que pasa a través de una cámara de ionización, generándose de esta forma un plasma de iones positivos, radicales libres y electrones térmicos. Este hecho junto a su selectividad hacia compuestos de enorme interés, fundamentalmente en los campos del medio ambiente y toxicología, hacen que sea utilizado para la detección y cuantificación de trazas.

2.3.3.5 Detector de nitrógeno- fósforo.

Detector termoiónico (TID, thermoionic detector de llama alcalina). Está basado en el hecho de que la adición de una sal de metales alcalinos a la llama de un detector de ionización aumenta la respuesta de éste hacia determinados elementos. La selectividad es muy dependiente de parámetros tales como temperatura, forma y tamaño de la llama.

2.3.3.6 .Detector fotométrico de llama (FPD).

El detector fotométrico de llama utiliza un llama de hidrógeno para excitar un estado electrónico elevado de fragmentos de moléculas que contengan átomos de azufre o fósforo. Estos dos elementos son excitado de forma óptima por la llama de hidrógeno, y cuando retornan a su estado fundamental emiten las líneas características de sus espectros las líneas analíticas de interés son seleccionados por medio de un filtro (392 nm para determinar azufre y 526 para fósforo).

2.3.3.7. Detector fotoionización.

Los detectores de fotoionización están basados en la utilización de los fotones generados en un lámpara de descarga para ionizar los compuestos orgánicos que emergen juntos con el gas portador de una columna cromatográfica. Este tipo de detectores, utiliza la radiación en un tubo de descarga que contiene una mezcla de gases a baja presión éstos son excitados por medio de una diferencia de potencial elevada que se mantiene entre dos electrodos. Los compuestos que eluyen de la columna son ionizados por los fotones de alta energía procedentes de la lámpara y los iones generados son recogidos por medio de un electrodo polarizado adecuadamente

La cromatografía de gases tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es determinar cuantitativa ó cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), ó el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito. ^{8, 14, 15, 16, 30.}

2.4. Cromatografía de líquidos HPLC.

La cromatografía es una técnica que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla a través de un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de dicha mezcla son transportados por una fase móvil.

2.4.1. Fundamento.

Un proceso de separación que involucra la interacción entre uno o más solutos y dos fases una estacionaria y otra móvil.

Los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil a través de una capa de la fase estacionaria. Cada especie sufre un retardo distinto en su transportador debido a varios parámetros como.

- Adsorción en la superficie

- Solubilidad
- Carga

2.4.2. Tipos de separación

- Elución un soluto sufre un fenómeno de partición entre dos fases. La separación se fundamenta en la retención relativa de tal sustancia, un aumento en la longitud de la columna contribuye a una mejora en la separación. Se pueden utilizar varios tipos de atracciones competitivas para la separación
- Análisis por desplazamiento. Los materiales se mueven a través de la columna al ser desplazados por una sustancia con mayor retención por ejemplo intercambio iónico. No se puede obtener una resolución total. El aumento en la longitud de la columna no contribuye a mejorar la separación.
- Análisis frontal. La muestra se adiciona de manera constante a la columna y los componentes se analizan conforme eluyen por ejemplo filtración a través de carbono. Este alcance puede utilizarse para evaluar la retención relativa, no para la separación de mezclas.
- Teoría de platos. Se fundamenta en la analogía con la destilación y la extracción a contra corriente. En ésta teoría la columna se considera como un sistema estático en equilibrio. Cada especie exhibe un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil
- Teoría de velocidad considera la dinámica de la separación.

2.4.3. Clasificación de la cromatografía líquida.

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual de clasificación es la realizada en base a la naturaleza de la fase estacionaria ya que es ésta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación, de este modo se pueden enumerar cuatro tipos de técnica:

- Cromatografía de adsorción (líquido-sólido). La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. Fundamentalmente se tiene éste mecanismo de separación cuando la fase estacionaria es un sólido, con una superficie que contiene grupos funcionales que le permiten interactuar con los analitos a separar y con la fase móvil. La fase estacionaria son alúmina o sílice. Puntos a considerar son la cantidad de puntos activos sobre la superficie de la fase estacionaria, la

fuerza aleotrópica de la fase móvil (fuerza de adsorción del eluyente sobre la fase móvil), relación de fases. fase móvil adsorbida/fase móvil sin adsorber. Y por último el soluto

- Cromatografía de reparto/adsorción, (fases ligadas químicamente, fase normal y fase reversa). La separación, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- Cromatografía de (intercambio iónico, cambio catiónico, y cambio aniónico) Este tipo de cromatografía es cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circula en la fase móvil. Este tipo de cromatografía, se utiliza una fase estacionaria con grupos activos, permanentemente unidos a la superficie de la partícula mediante enlace químico, cargas de signo contrario a las del soluto a separar, estas cargas son compensadas por los iones presentes en la fase móvil. Los solutos serán retenidos por las cargas de la fase estacionaria en función de su propia carga eléctrica y de la competencia por los puntos activos de la fase estacionaria por parte de los contraiones presentes en la fase móvil. Básicamente son dos equilibrios que intervienen en el mecanismo en cromatografía iónica.
- Cromatografía de (exclusión, molecular, y filtración en gel). La fase estacionaria, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño.

2.4.4. Instrumentación

- Dispositivo de suministro de eluyente (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- Fase móvil
- Dispositivo de inyección

Conducciones y conexiones Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna se utilizó el siguiente dispositivo.

- Detector y registrador
- Columnas.

Además de los dispositivos anteriormente mencionados se pueden incorporar en el sistema otros que puedan simplificar el trabajo o bien mejorar algún aspecto concreto de la técnica cromatográfica, como:

- Inyectores automáticos
- Colectores de fracciones
- Hornos termostatzados para las columnas
- Sistemas de tratamiento de datos.

En cromatografía de líquidos el método isocrático es el compuesto que pasa por una columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La bomba es la que suministra un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna sin que el flujo de columna sea influido por la presión en cabeza de la columna. Un sistema de bombeo ideal debe cumplir las siguientes características:

- Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.
- Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas ya que las pulsaciones, aunque no afectan a la separación en sí, pueden contribuir al ruido de fondo del detector y por lo tanto disminuir la sensibilidad.
- Suministrar flujos adecuados por los diferentes tipos de columnas.
- El caudal que suministran debe ser constante a lo largo, ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención.
- Bombas en dos modalidades; Isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución y en gradiente cuando la composición cambia según una función dependiente del tiempo.

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El método de introducción de la muestra es de

importancia capital, un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamiento de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema. Un inyector ideal debe tener:

- Introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible.
- Ser de fácil manejo.
- Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas
- Inyectores de válvula y jeringa

2.4.5. Detectores

Un detector es un dispositivo que permite medir a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente que depende de la composición de éste. La detección en cromatografía se realiza a través de la utilización de colectores de fracción para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente. Las características del detector es:

Características que no afectan a la eficacia de la separación.

- Respuesta. Es la respuesta ofrecida por el detector por una determinada variación de la propiedad física del eluyente que es medida. Esta propiedad es proporcional a la variación de la masa del soluto y la respuesta de un detector es lineal.
- Ruido. Es cualquier perturbación de la señal generada por el detector y que no es originada por la salida de un soluto de la columna. El ruido de fondo del detector se compone a su vez de otros dos tipos de ruido de corto alcance (perturbaciones de una frecuencia mayor que la inversa del ancho del pico de soluto) y ruido de largo alcance (perturbaciones de una frecuencia del mismo orden que la inversa del ancho del pico del soluto).
- Deriva. Es la variación de la señal de base a lo largo del tiempo, que origina una variación lenta y progresiva de la línea base.
- Sensibilidad. Se define como la mínima concentración o cantidad de soluto que debe pasar por el detector para que la señal a que éste da lugar sea dos veces mayor que la del

ruido de fondo. Éste parámetro indica la cantidad mínima de soluto que es posible detectar y es dependiente del ruido del detector.

- Rango dinámico. Es el rango de concentraciones del soluto entre las cuales el detector produce una respuesta dependiente de la concentración del soluto de salida de la columna. El valor mínimo corresponde a la sensibilidad del detector y el máximo con la concentración del soluto, del cual la respuesta del detector es constante.

2.4.5.1. Tipos de detectores.

La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos los detectores basados en una propiedad de la disolución.

- Detector índice de refracción. El índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. La detección se basa en equilibrar el detector a caudal constante, con fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil. Cuanto sea mayor la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio, por lo tanto la máxima sensibilidad se obtendrá el respectivo índice de refracción. Y hay dos tipos de refractómetros, detector de desviación y detector de reflexión.
- Detector de ultravioleta y/o visible. Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional. Ésta energía provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. La absorción de energía, se traduce en una disminución de la intensidad del haz luminoso que se ha hecho pasar a través de la muestra pudiéndose medir esta disminución de intensidad haciendo incidir el haz sobre una fotocélula. Hay varios tipos de detectores UV/Vis. Como de longitud de onda fija de onda variable y detector UV de matriz de fotodiodos.
- Detector de fluorescencia. El fenómeno de fluorescencia tiene lugar en los compuestos que tienen grupos funcionales específicos, se excitan con la energía de ciertas longitudes de onda y emiten radiación de mayor longitud de onda que la absorbida. La

fluorescencia, la radiación emitida normalmente , con objeto de evitar interferencia, en dirección perpendicular a la incidencia del haz de excitación. Naturalmente la posibilidad real de detectar por fluorescencia grupos químicos específicos, es función de las longitudes de onda seleccionadas, tanto lo de excitación como la de emisión.

- Detector de conductividad eléctrica. En ésta se mide continuamente la conductividad eléctrica que eluye de la columna, indicándose la presencia de un analito por medio de un cambio en la conductividad.
- Detector electroquímico. Éste se basa en la oxidación del analito eluido mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de la corriente, mantenida mediante la electrólisis de los analitos, a lo largo del cromatograma. La detección en este caso está basada en el conocido polarógrafo de gotas de mercurio; éste instrumento consta de un par de electrodos a los que se aplica un potencial de oxidación (potencial de semionda) suficiente para crear una corriente de difusión . puesto que la cantidad de corriente es una medida directa de la concentración del analito en un momento dado, el proceso es cuantitativo. Para poder aplicar esta técnica a la detección en cromatografía líquida,

2.4.6. La columna

La columna es el elemento fundamental de un cromatografo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación por lo tanto, resulta una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumento.

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son:

- Diámetro interno
- Longitud
- Conexiones (reducciones)
- Relleno
- Tamaño de partícula del relleno

Las propiedades de la sílice que proporciona su utilización como soporte se pueden resumir:

- Gran resistencia mecánica

- Amplia gama de formas y tamaños y diámetros de poro
- Gran variedad de sílices en cuanto superficie específica.

2.4.7. Tipos de cromatografía

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La separación en cromatografía de líquidos es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria

A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (En cromatografía de líquidos, high-performance liquid chromatography) no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra.

En cromatografía de líquidos es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa.

En cromatografía de líquidos ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación.

En cromatografía de líquidos preparativa

Es la técnica escogida para aislamiento y purificación de productos de valor en las industrias químicas y farmacéuticas, así como en la biotecnología y la bioquímica. La cromatografía preparativa comprende un amplio rango de aplicaciones, desde el aislamiento de 1µg de muestra para identificación espectroscópica hasta el aislamiento de un compuesto puro de una mezcla de 100 g.

Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, normalmente en su modalidad de fase reversa, en la que la fase estacionaria tiene carácter no polar, y la fase móvil posee carácter polar (generalmente agua o mezclas con elevada proporción de la misma, o de otros disolventes polares, como por ejemplo metanol). El nombre de "reversa" viene dado porque tradicionalmente la fase estacionaria estaba

compuesta de sílice o alúmina, de carácter polar, y por tanto la fase móvil era un disolvente orgánico poco polar. Una serie alotrópica es un rango de sustancias de diferentes polaridades que actúan como fase móvil y que permiten observar un mejor desplazamiento sobre una fase estacionaria.

2.4.7.1 Cromatografía de fase normal.

La cromatografía de fase normal "Normal fase HPLC" (NP-HPLC) es primer tipo de sistema utilizado en el campo de la química instrumental y química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

2.4.7.2. Cromatografía de fase reversa.

En HPLC (fase reversa cromatografía de líquidos) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina cromatografía de líquidos sin ninguna especificación

adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por el aumento de la entropía, y la consecuente disminución de la energía-libre, asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquílica larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase inmóvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de silice de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de sílica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por sílica modificada con

cadena alquíl y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de sílica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

2.4.7.3. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, la columna se empaqueta con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (son demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta. ^{10, 14, 27}.

2.4.7.4. Cromatografía de intercambio iónico.

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son: i) Resinas de poliestireno, ii) intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles) y iii) Sílica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado. En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones elevada carga y radio

pequeño. Un incremento en la concentración del contraión (respecto a los grupos funcionales de la resina) reduce el tiempo de retención. Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado en las siguientes aplicaciones: purificación de agua, concentración de componentes traza, carbohidratos y oligosacáridos entre otros.

2.4.7.5. Cromatografía basada en bioafinidad.

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

2.4.7.6. Cromatografía líquida de alta eficacia en condiciones desnaturizantes (DHPLC)

Se trata de un método que se emplea para el rastreo de mutaciones (ya casi totalmente en desuso debido al auge de la secuenciación), que permite detectar la presencia de variaciones en el ADN aunque no se determinan específicamente cuáles. En este caso, se utiliza la técnica cromatográfica para la detección de heterodúplex de ADN, en lugar de utilizar un gel para correr las moléculas de ácidos nucleicos.

El procedimiento consiste en desnaturizar (aumentando la temperatura normalmente) una muestra que contenga tanto el ADN problema como un ADN control, que no es más que el mismo ADN problema pero en su versión silvestre o normal (sin mutaciones). Luego se procede a renaturalizar (disminuyendo la temperatura), de manera que aquellas cadenas de ADN que vuelvan a unirse con sus respectivas complementarias (cadena "a" silvestre con cadena "b" silvestre; o bien cadena "a" mutante con cadena "b" mutante) no presentarán diferencia con el estado original; sin embargo, si por ejemplo una cadena "a" silvestre híbrida con una cadena "b" mutante, aquella región (más o menos amplia) en la que exista mutación no complementará, formándose un bucle u horquilla, es decir, una región en la que las bases nitrogenadas no son complementarias y no establecen las uniones características por puentes de hidrógeno en la doble

hélice de ADN. Dichas estructuras son los denominados heterodúplex (dúplex de ADN híbridos). Estos heterodúplex migran de forma diferente a los homodúplex en la columna de cromatografía de fase reversa (al igual que lo hacen en un gel de agarosa o acrilamida).

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. ^{8, 14, 15, 16, 30, 17, 18.}

2.4.8. Elección de la columna y de la fase móvil

La elección del sistema cromatográfica debe realizarse en función de la naturaleza de las sustancias a separar.

El conocimiento de la naturaleza de la sustancia va a permitir a priori, orientar el cromatografista sobre qué mecanismo de separación puede ser el más apropiado o dicho de otro modo cual es la propiedad para la existen diferencias más notables entre las sustancias a separar (tamaño, carga, polaridad etc.), lo que dará una idea de la fase estacionaria que pueda ser apropiada figura 3 se muestran estos parámetros.

- Peso molecular dependiendo del tamaño.
- Solubilidad del compuesto y origen.
- Tipos de filtración.
- Polaridad del compuesto a tratar y de los solventes analizados.
- Se indica que tipo de fase teórica se podría analizar en primera instancia.

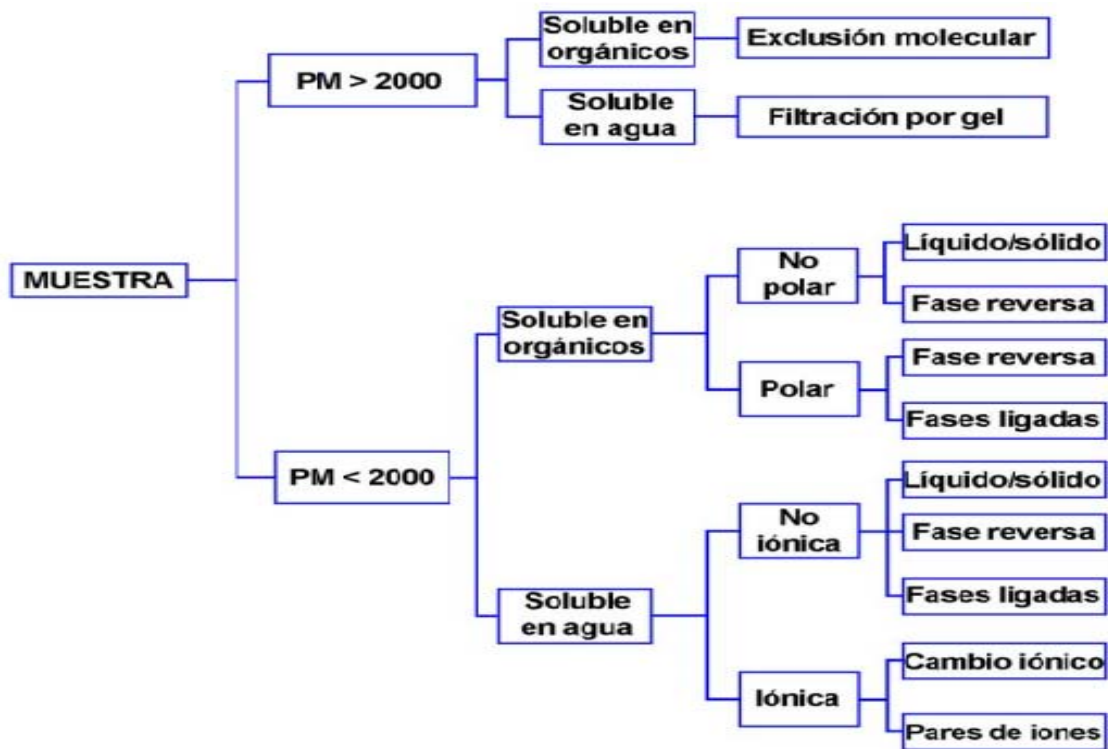


Figura 3 Selección del sistema cromatográfica en función del tipo de muestra.

Es necesario por lo tanto conocer los mecanismos de separación más generales utilizados en cromatografía de líquidos. Básicamente éstos se pueden dividir.

- Adsorción cromatográfica líquido-sólido
- Adsorción / reparto (fases ligadas químicamente, fase normal y fase reversa).
- Intercambio iónico, cambio catiónico, y cambio aniónico)
- Tamaño molecular (exclusión molecular, y filtración en gel).

2.5. Ácido valproico.

La molécula de ácido valproico (2-Propyl ácidopentanoico). se representa en el espacio como se indica en la figura 4. La cual es necesario conocer sus propiedades. Físicas y químicas para ver el planteamiento que requiere para su análisis y desarrollo.¹⁹

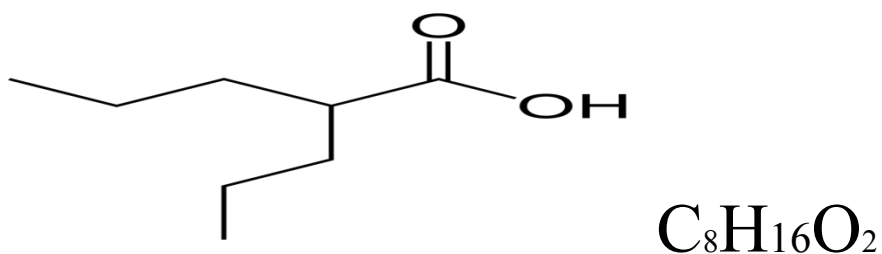


Figura 4. Representación de la molécula de ácido valproico en el espacio 1.4.1 Ácido 2 – Propilpentanoico.

Peso molecular: 144.211 g/mol.

Contenido no menos. De 98.0 % y no más de 102.0 % de ácido valproico calculado con referencia a la sustancia anhidra.

Descripción. Líquido ligeramente viscoso incoloro o amarillo claro.

Solubilidad. Fácilmente soluble en Solución Volumétrica de hidróxido de sodio 1.0 N metanol, etanol cloroformo, benceno, benceno, éter: Ligeramente soluble en agua y en solución de ácido clorhídrico 0.1 N.

Identidad por cromatografía de gases con tiempo de retención e Infrarrojo.

Aspecto de la solución: disolver muestra en hidróxido de sodio solución clara.

Color de la solución: no excede la comparación de la solución Y5.^{3, 26}

Sustancias relacionadas por cromatografía de gases: no exceden el 0.3 % de impurezas totales.

Impurezas orgánicas volátiles: limite cumple con los requisitos.

Residuos de ignición: limiteno más de 0.1 %.

Metales pesados método II: limite no más de 20 ppm.

Ensayo de ácido valproico: limites 98.0 102.0 % en base a lo referido.^{7, 10, 19.}

2.5.1 Farmacología Ácido valproico.

El Ácido valproico es un fármaco antiepiléptico y estabilizador del estado de ánimo no relacionado químicamente con otros anticonvulsivos es un medicamento de amplio espectro ya que actúa en diversos canales del sistema nervioso central está indicado para el tratamiento y la profilaxis de la epilepsia y del trastorno bipolar. El ácido valproico está indicado como monoterapia y terapia complementaria en el tratamiento de pacientes con crisis parciales complejas que ocurren en forma aislada o asociadas con otro tipo de crisis.

El ácido valproico también está indicado en monoterapia o terapia complementaria para el tratamiento de las crisis de ausencia simple o compleja y de manera complementaria en pacientes con múltiples tipos de crisis que incluyen las de ausencia.

Se define ausencia simple como una muy breve pérdida del sensorio o de conciencia acompañada por ciertas descargas epilépticas generalizadas sin otros signos clínicos detectables. Ausencia compleja es el término usado cuando otros signos también están presentes..

Cuya acción anticonvulsivante tiene diversas propiedades farmacológicas que lo hacen diferente a otros anticonvulsivos. Entre ellas presenta un efecto antianóxico a nivel periférico que se opone a la inactivación del metabolismo muscular y a la apnea provocadas por la convulsión. El ácido valproico ha mostrado a través de su empleo un efecto ansiolítico debido a su acción gabaérgica, tiene un espectro antiepiléptico que se puede usar en el tratamiento de crisis generalizadas y crisis parciales. en presentación de cápsulas y jarabe entre otros. ^{1, 2, 4}.

El ácido valproico es útil en pacientes con tratamiento de las ausencias simples y complejas y en la epilepsia mioclónica especialmente en niños cuya sintomatología es resistente a otros anticonvulsivos

2.5.2. Epilepsia.

El concepto de epilepsia es un síndrome neurológico, crónico, con crisis epilépticas recurrentes. las crisis epilépticas son la manifestación clínica de una descarga anormal de una población neuronal, generalmente pequeña, localizadas ya sea en la corteza cerebral o bien en la profundidad del parénquima cerebral. El cerebro es el origen de la epilepsia. Aunque los

síntomas de un ataque pueden afectar cualquier parte del cuerpo, los fenómenos eléctricos que producen los síntomas se producen en el cerebro. La ubicación de estos fenómenos, su alcance en el tejido cerebral y su duración tienen efectos importantes. Estos tres factores determinan el carácter del ataque, su repercusión en el individuo y las consecuencias sociales correspondientes.

En primer lugar porque toda pérdida completa o parcial de la conciencia coloca al individuo en un estado de indefensión al ambiente que lo rodea, los daños físicos tales como quemaduras, heridas, contusiones son acompañantes habituales. Su reiteración provoca importantes discapacidades psico-sociales y laborales, incluso, tras una única crisis. La segregación sigue siendo una actitud frecuentemente observada y por cierto lamentada. El tratamiento antiepiléptico intenta prevenir la aparición de nuevas crisis y lograr con ello mejorar de forma global la calidad de vida de los pacientes.

2.5.3. Clasificación de las convulsiones epilépticas.

- Crisis generalizada (simétricas en ambos lados y sin inicio local)
- Crisis parciales o focales (las crisis inician en forma local)
- Síndromes epilépticos especiales.

Cada una de estas es subdividida por sus características iniciales.

Crisis generalizada son.

- Tónicas, clónicas o tónico-clónicas (gran mal).) Crisis Tónico-clónicas: Son aquellas que provocan mayor impacto emocional en los observadores. El individuo afectado cae inconsciente al suelo, se pone rígido, a veces emite un quejido. Después de un período de hasta 30 segundos de duración aparecen convulsiones de todo el cuerpo, los labios se ponen azules, elimina saliva por la boca, su duración total es de 1 a 5 minutos y luego queda en un estado de sopor profundo. Puede haber mordedura de la lengua y relajación de esfínteres. Crisis tónicas: suelen ser breves y consisten en caída al suelo y rigidez de todo el cuerpo, el que puede adoptar posturas bizarras. Son más frecuentes en casos con daño cerebral. Crisis clónicas: se refiere a una crisis convulsiva generalizada, con movimientos repetitivos, sin la fase tónica inicial y son menos frecuentes. Se observan especialmente en el recién nacido. De ausencia (pequeño mal). Sólo con pérdida de la

conciencia, complejas con movimientos clónicos, tónicos o automáticos breves. Y se caracteriza por episodios de “desconexión”, de segundos de duración, que se presentan en el niño, el cual queda inmóvil, con la vista fija, inconsciente y no reactivo a estímulos. Su duración es de 5-20 segundos, son de ocurrencia diaria, muchas veces al día y de inicio y término abrupto. Pueden asociar pestañeo, leve caída de la cabeza y a veces algunos automatismos simples. No provocan decaimiento post crisis. Existen las ausencias atípicas, en las que hay mayor pérdida del tono muscular, el paciente se demora mucho más en recuperar las conciencia.

- Síndrome de lenox-Gastaut. Es un síndrome epiléptico infrecuente, pero severo. Se caracteriza por crisis de difícil control, retardo mental. Las crisis se inician entre los 2-3 años de edad y son de tipo múltiple: ausencias atípicas, crisis tónicas, crisis tónico-clónicas, crisis atónicas, crisis mioclónicas y estados de mal epiléptico. Las crisis son de muy difícil control y las crisis atónicas arriesgan traumatismos faciales o de cráneo por caídas súbitas al suelo, por lo que los niños afectados suelen usar un casco protector. Constituyen el síndrome epiléptico de más difícil control en el niño
- Epilepsia mioclónica juvenil. Constituye alrededor de un 7% de los casos de epilepsia. Se presenta alrededor del inicio de la pubertad. Las crisis son matinales y coexisten sacudidas mioclónicas del despertar, que típicamente provocan caída de objetos de las manos (taza, cepillo dental). Es como un golpe de corriente único. Se asocian crisis tónico-clónicas generalizadas particularmente cuando hay privación de sueño. Pueden existir también ausencias y crisis fotosensibles como las provocadas por la televisión, videos juegos o luces estroboscópicas (Discoteca). Existe un elevado porcentaje de casos con antecedentes familiares de epilepsia. El examen neurológico es normal. se caracteriza por registro basal normal con descargas generalizadas de puntas y polipuntas ondas lentas visibles con mayor facilidad durante el sueño. Responde muy bien a los FAE, pero tiene invariablemente tendencia a la recaída al suspenderlos. Además implica restricciones en el estilo de vida del adolescente y adulto joven en cuanto al riesgo de recaída que implican las traspasadas y el alcohol
- Espasmos infantiles (síndrome de West). Infrecuente pero severo. Se presenta en lactantes entre 3 y 18 meses de edad con un máximo alrededor de los 6 meses de vida. Las crisis consisten en flexión de la cabeza y un movimiento de abrazo que a veces asocia llanto, dura 1-2 segundos y se repite varias veces en salvas (espasmos). Se observa

especialmente al quedarse dormido o al despertar y no asocian decaimiento post crisis. El síndrome de West tiene una triada clásica constituida por los espasmos, atraso o detención del desarrollo psicomotor y un patrón eléctrico muy anormal.

- Atónicas (astáticas, acinélicas a veces son sacudidas mioclónicas). Crisis Atónicas: Es una crisis en la cual la persona pierde en forma brusca la fuerza. Puede sólo caer la cabeza sobre el pecho o afectar a todo el cuerpo y caer al suelo en forma súbita. Son de inicio en la niñez y asocian riesgo de lesiones físicas producto de los traumatismos en las caídas. Su duración es de unos pocos segundos, con recuperación rápida de la conciencia.

Crisis parciales o focales

- Simples (sin pérdida del estado de alerta o alteración en la función psíquica). Motoras originadas en el lóbulo frontal. Se trata de un lóbulo cerebral muy grande y con muchas conexiones y las manifestaciones clínicas son muy variadas y a veces rápidamente pueden presentar generalización secundaria. Las crisis frontales pueden ser nocturnas con conductas bizarras, crisis parciales complejas, crisis con giro de la cabeza u ojos, automatismos bilaterales complejos, detención del habla, etc. Y somatosensoriales o sensoriales especiales. Vegetativas y psíquicas puras, en las cuales se conserva la conciencia y existe memoria de los síntomas y signos que presentó el paciente una vez que ha finalizado la crisis y es capaz entonces de describirla.
- Complejas (con trastorno de la conciencia). Inician como crisis parciales simples y progresan hasta afectar el estado de conciencia. Y con trastorno de la conciencia desde el principio. Existe un enturbiamiento de la conciencia o sea del grado de darse cuenta. Se compromete la capacidad de recordar, por parte del paciente, que está ocurriendo una crisis. Además con frecuencia las crisis parciales complejas asocian automatismos y son seguidas por un período de confusión y/o amnesia (falta de recuerdo).
Hay varios tipos de automatismos: Oro faringeo: chupar, relamerse.
Expresiones de emociones: generalmente temor pero también puede ser risa, rabia.
Gesticular: Movimientos de la cara, un brazo o la mano, abrochar, etc.
Ambulatorio: caminar sin rumbo algunos metros.

Síndromes epilépticos especiales.

- Mioclono y crisis mioclónicas.
- Epilepsia refleja
- Afasia adquirida con trastorno convulsivo
- Crisis febriles y otras clases de la lactancia y la infancia
- Crisis histéricas

2.5.3.1. Farmacología del ácido valproico. Descripción clínica de las crisis parciales simples.

Generalmente es la expresión clínica de una lesión cerebral focal y por lo tanto la localización determinara la expresión clínica. Este foco epiléptogeno constituido, inestabilidad eléctricamente la zona afectada pero no difunde de allí que una característica básica sea que no exista compromiso de la conciencia.

Las manifestaciones clínicas de las crisis parciales simples pueden ser:

- Motoras : Aquí el foco se halla en la corteza frontal prerrolándica, la expresión clínica está dada por contracciones musculares, en forma de crisis, involuntarias, localizadas en territorio del hemicuerpo contralateral (cara y/o brazo y/o miembro inferior) que provocan desplazamiento de los segmentos afectados.
- Sensitivas : El foco se localiza en áreas parietales y occipitales La expresión clínica se caracteriza por compromiso de uno o más de los cinco sentidos, además de vértigos y alucinaciones.
- Autonómicas : El foco se localiza en áreas temporales. Las manifestaciones clínicas están constituidas por crisis de sudoración, sensaciones epigástricas, midriasis, fenómenos vasomotores, etc.
- Fenómenos psíquicos: El foco se localiza en áreas temporales y secundariamente en áreas frontales anteriores Su expresión clínica se caracteriza por fenómenos psíquicos dado por experiencias que afectan la memoria (ya visto. nunca visto), compromiso afectivo (miedo o placer); ilusiones y alucinaciones.

- Simples: Sin pérdida de conciencia con signos motores, sensitivos, psíquicos y autonómicos.

2.5.3.2. Farmacología del ácido valproico. Descripción de las crisis parciales complejas.

Complejas: Con alteración de conciencia. Parciales simples que evolucionan a parciales complejas y posteriormente a generalizadas. Descripción clínica de las crisis convulsivas generalizadas. Esta forma es la más frecuente y se la conoce y denomina habitualmente como “Crisis del Grand mal”, básicamente se trata de movimientos tónico-clónicos.

Las crisis parciales complejas, presentan una sintomatología compleja más un compromiso de la conciencia. Se expresan con automatismos que consisten en movimientos involuntarios con una actividad motora coordinada, repetitiva y que no tiene sentido. Los automatismos más comunes son:

- Movimientos de masticación
- Movimientos orales de chupeteo
- Caminar
- Automatismos gestuales.

La diferencia entre las crisis parciales simples y complejas es que en las crisis parciales complejas se produce una alteración de la conciencia, es decir que el paciente no reacciona o reacciona de forma retrasada durante alguna parte de la crisis, y después no se acuerda de todo lo que ha pasado si se le pregunta. Hay muchos pacientes que no notan que han estado inconscientes durante la crisis. Una alteración de la consciencia se puede valorar mejor.

Las crisis parciales complejas son a menudo erróneamente llamadas “ausencias”, pero conviene indicar que las ausencias son crisis generalizadas y se distinguen en la causa y el pronóstico de las crisis parciales.

Las crisis parciales complejas pueden estar precedidas por una crisis parcial simple que se llama “aura” si es sensitiva o psíquica (ver crisis parciales simples).

En las crisis parciales complejas típicamente se observan gestos y comportamientos que se llaman “automatismos”, tales como: * Chupetear * Masticar * Carraspear * Toser * Manosear.

- Gestos complejos: arreglarse la ropa, mover muebles etc.
- Habla automática, gritar, cantar, rezar, insultar.

Durante e inmediatamente después de la crisis pueden aparecer otros síntomas neurológicos como:

- Afasia: imposibilidad para comprender y hablar correctamente
- Disartria: imposibilidad de articular las palabras correctamente, aunque el contenido del habla es normal
- Confusión: no reconocer personas conocidas, no contestar adecuadamente, agitación

Estas dificultades pueden persistir durante 5-20 minutos después de terminar la crisis.

- Con alteración aguda de la conciencia, que duran pocos minutos y que generalmente cursan con tres fases definidas.
- Fase tónica pérdida de conocimiento brusca con caídas e hipertonía Muscular generalizada.
- Fase clónica: Movimientos alternativos de flexo-extensión, con sacudidas. Rítmicas a nivel cefálico y los cuatro miembros simultáneamente Es habitual que se acompañe de mordedura de lengua y labios e incontinencia urinaria.

Fase proscritica: Recuperación paulatina de la conciencia, con amnesia de lo ocurrido, cefalea, dolores musculares difusos; al cabo de una hora el paciente se haya habitualmente recuperado. ^{7, 10, 12, 19.}

Estas crisis registran factores facilitadores como.

- La ingesta de alcohol
- Derivación de sueño
- Ingestión de estimulantes (café, analépticos, etc.)
- Periodo menstrual etc.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El desarrollo analítico cambia día a día y los recursos con los cuales se desarrollaron van cambiando y mejorando parámetros de eficiencias tanto analíticas como de tecnología.

Las empresas nacionales y multinacionales hacen desarrollo analítico en sus áreas y las filiales se alinean a estos parámetros los cuales se transfieren de una filial a otra como parte de políticas internas.

Hay métodos analíticos actuales con ventajas tanto en costos, tiempos y generación de residuos. Los cambios analíticos desarrollados involucran la eficiencia y seguridad y la certeza de que un producto farmacéutico salga al mercado con las mejores características con respecto a su principio activo.

El químico farmacéutico biólogo está muy relacionado con el desarrollo de técnicas y métodos analíticos porque en la preparación profesional se nos capacita para participar en situaciones tanto de cambio como de manejo de técnicas y métodos nuevos a nivel instrumental o tecnológico; el cual en la práctica deberá llevar a cabo muchos planteamientos de desarrollo como cambios a métodos, todos sustentados analíticamente

Se actualizan los métodos analíticos alineándose a políticas internas de mejora continua y cambios constantes a parámetros en los métodos que se aplican a los productos específicos

Detallar el proceso de transferencia para un método analítico de un producto terminado que realice el cambio casa matriz y se requiere que la filial se aline a estos puntos. Por lo tanto el planteamiento es realizar como se llevo acabo la transferencia por medio de un protocolo y se describe los pasos requeridos para éste cambio. Asi como el protocolo de verificación que se realiza cuando la transferencia solo es parcial o compendial.

Se realizó el cambio analítico del método para ácido valproico por cromatografía de gases a la metodología por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Como lo describen las políticas internas en cada empresa.

4. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Transferir un método analítico del ensayo de ácido valproico de cromatografía de gases a cromatografía de líquidos (HPLC).

Objetivos Particulares.

- 1) Se realiza el análisis documental que nos permite determinar las ventajas que de cambiar el método analítico de ácido valproico de cromatografía de gases (CG) a cromatografía de líquidos.(HPLC).
- 2) Elaborar la estructura de cómo se lleva a cabo una transferencia de un método analítico de una filial a otra.
- 3) Describir de manera general cada una de las etapas involucradas en la transferencia de un método analítico.
- 4) Describir los pasos del protocolo de transferencia de ácido valproico de cromatografía de gases a cromatografía de líquidos de alta resolución.

5. Procedimiento y descripción de los pasos de una transferencia de un método analítico.

Los siguientes pasos son parte de una transferencia de un método analítico para la formación del protocolo requerido para documentar este proceso.

- Visión general.
- Definiciones.
- Reglas.
- Procedimientos.
- Información general.
- Puntos a discutir antes de la transferencia del método.
- Asignación del número de protocolo .
- Protocolo de transferencia.
- Elaboración del control de cambios.
- Clasificación de métodos.
- Requerimientos mínimos para la transferencia del método.
- Capacitación previa.
- Criterios experimentales.
- Criterios de aceptación.
- Datos asociados a investigación de laboratorio.
- Finalización de la transferencia del método analítico.

El propósito de este protocolo es especificar los requerimientos para la transferencia de métodos analíticos.

Estos pasos aplica a todo el personal involucrado en la transferencia de métodos analíticos de la Gerencia de control de calidad y laboratorios.

Responsables de este procedimiento químico analista responsable del proceso.

- Generar el protocolo y reporte de transferencia del método analítico.
- Realizar los análisis que apliquen para la transferencia del método de acuerdo a las instrucciones del protocolo.
- Completar todos los pasos requeridos en el protocolo de transferencia.

- Gerente de Control de calidad / Jefe / Coordinador.
- Asegurar que éste procedimiento es ejecutado sin desviaciones.

Revisar y aprobar el protocolo y reporte de transferencia cuando se cumplan todos sus requerimientos de actividades a realizar.

Seguridad. Las reglas que aplican al tema de seguridad en la preparación de reactivos y durante el análisis son las siguientes:

- Siempre deben identificarse adecuadamente todas las sustancias que se están utilizando.
- Revisar las hojas de datos de seguridad de cada reactivo.
- Portar el uniforme y equipo de protección personal completo: lentes de seguridad, bata de laboratorio, zapatos de seguridad con casquillo y/o según lo correspondiente a la matriz de equipo de protección personal.

Información de seguridad. El laboratorio de origen debe identificar e informar al personal del laboratorio que recibe de peligros y precauciones asociadas a los reactivos y muestras utilizadas en el método analítico.

Capacitación. El laboratorio de origen debe proporcionar la capacitación al laboratorio que recibe conforme sea necesario y si es requerido.

Métodos que no requieren transferencia (verificación). La transferencia de métodos analíticos no se requiere para métodos analíticos que no requieren validación completa, por ejemplo métodos que son compendiales, evaluaciones físicas u organolépticas. Esto se realiza cuando:

Un laboratorio transfiere conocimientos y tecnología relacionada a métodos analíticos. Los métodos de transferencia analítica deben ser completados en paralelo a múltiples laboratorios, con sus materiales y herramientas a implementar cuando son procedentes de otros laboratorios.

Materiales y herramientas para el protocolo de transferencia del método analítico.

Equipos y/o instrumentos de laboratorio asociados al método analítico, calificado/calibrado según aplique. Se deben realizar en acuerdo mediante una revisión con los miembros de los

equipos del laboratorio que recibe y del laboratorio de origen, y discutir los requerimientos para que la transferencia del método analítico se complete exitosamente.

Los puntos a revisar por los miembros de los equipos son los siguientes:

- Nombres de las personas que fungirán como contactos adecuados para preguntas y problemas que pudieran surgir.
- Lista de los métodos que son transferidos por el producto o proyecto.
- Equipo requerido para completar la transferencia del método analítico y para correr el método de manera rutinaria como soporte de manufactura.
- Recursos requeridos para correr rutinariamente el método analítico.
- Evaluación de laboratorio para confirmar que el laboratorio que recibe tiene el espacio adecuado para los instrumentos y personal necesario para correr el método.
- Tiempo límite necesario para el entrenamiento, compra y calificación de equipos, etc. y tiempo requerido para completar la transferencia del método analítico.
- Experto y experiencia en el laboratorio que recibe relacionada a esos métodos y el entrenamiento que pudiera ser requerido para cada uno de los métodos que son transferidos.

Complejidad del método que es transferido y criterios de aceptación apropiados que son incluidos en la transferencia del método.

Es responsable de preparar el protocolo de transferencia el cual define:

- El alcance del estudio.
- La complejidad del método.
- Los criterios de aceptación.

Las razones por las que se eligieron los criterios de aceptación.

Nota: El laboratorio de origen o el Laboratorio que transfiere proporciona datos generales para formar el protocolo del producto a analizar.

El número de protocolo se asignará internamente del laboratorio que recibe. Este paso o proceso que se realiza para asignar el número de protocolo de transferencia de método analítico es utilizado para control interno en el área.

Formación del protocolo.

El procedimiento que sigue el Gerente / Jefe o designado para dar seguimiento al protocolo de transferencia es el siguiente:

Verifica que el protocolo sea aprobado por el representante/ Gerente del laboratorio de origen (OL) y por el representante/Gerente del laboratorio y representante del sitio de aseguramiento de calidad (RL).

Verifica que se envíen copias del protocolo aprobado a todos los participantes antes de iniciar con el estudio.

El procedimiento para los preparativos de la transferencia del método que realiza el laboratorio de origen es el siguiente:

Pre-aprueba el protocolo de transferencia del método analítico.

Asegurar que las muestras:

- Están disponibles en la cantidad suficiente para que sean distribuidas a todos los laboratorios incluidos en el estudio.
- Están disponibles en la cantidad suficiente para completar la transferencia y asegura la disponibilidad de los estándares de referencia correspondientes, conforme sea necesario.
- Proporciona el entrenamiento al laboratorio que recibe.
- Proporciona una copia de los datos del laboratorio de origen al laboratorio que recibe.
- Participa en la investigación de laboratorio, conforme sea necesario.
- Revisa los resultados crudos del estudio, compara los resultados entre los dos laboratorios y determina si se realizó una transferencia de método exitosa basado en los criterios de aceptación del protocolo.
- Una vez que se ha completado la transferencia, presenta un reporte final que muestra los resultados generados por los participantes indicando si se logró una transferencia exitosa.
- Aprueba el protocolo/paquete del TMA una vez que se ha completado la transferencia.

- Laboratorio que recibe El procedimiento de la transferencia del método que realiza el laboratorio que recibe es el siguiente:
- Pre-aprueba el protocolo de transferencia excepto métodos simples del método analítico.
- Revisa cuidadosamente el método analítico para asegurar que el método analítico es recibido en el laboratorio y que es aceptablemente claro y comprensible.
- Asegura que el laboratorio que recibe entiende el método y los criterios de aceptación.
- Registra el recibo del protocolo de transferencia
- Asigna un número interno de protocolo.
- Utiliza la codificación anteriormente descrita para asignar número de protocolo.
- Coloca entre paréntesis el número de protocolo original asignado por el laboratorio que transfiere el método.
- Asegura que el trabajo de laboratorio está programado y completado.

Participa en la investigación de laboratorio, Gerente / Jefe o designado, si aplica. Los resultados de prueba que no cumplen con los criterios de aceptación establecidos en el protocolo se consideran fuera de especificación por lo que se debe iniciar una investigación de acuerdo a los lineamientos de cada laboratorio.

Reporta por escrito, una vez que se ha completado el estudio, el resultado de sus análisis y proporciona al laboratorio de origen un paquete completo de copias de cromatogramas de HPLC, de UV/Vis, etc. generados durante la transferencia.

Reporta cualquier problema experimentado, cualquier desviación hecha y cualquier recomendación que tenga. Cualquier cambio substancial en el método debe ser documentado.

5.1. Metodología:

Parte de la transferencia es puntualizar como se realizarón los pasos y el mecanismo a seguir en cada punto. Se coloca la metodología analítica aplicada al formato, indicando el tipo transferencia que se realizara dependiendo casa matriz si es completa o parcial:

- Responsabilidades claras de cada parte.
- Propósito.
- Lista de todos los métodos a ser transferidos para ácido valproico
- Indicar los métodos para estos productos.
- Alcance
- Materiales requeridos en la transferencia.
- Los estándares deben ser suministrados con su certificado analítico
- El protocolo de transferencia.
- Criterios de aceptación para todas las pruebas.
- Documentación de transferencia de método.
- Copias de los métodos.
- Requerimientos y forma final del reporte.
- Aprobacion y envio de metodologia para muestras de rutina.

5.1.1. Diagrama de flujo de una transferencia.

Pasos mínimos de una transferencia de ácido valproico de cromatografía de gases CG. Y cromatografía de líquidos HPLC. Observar la figura número 5,

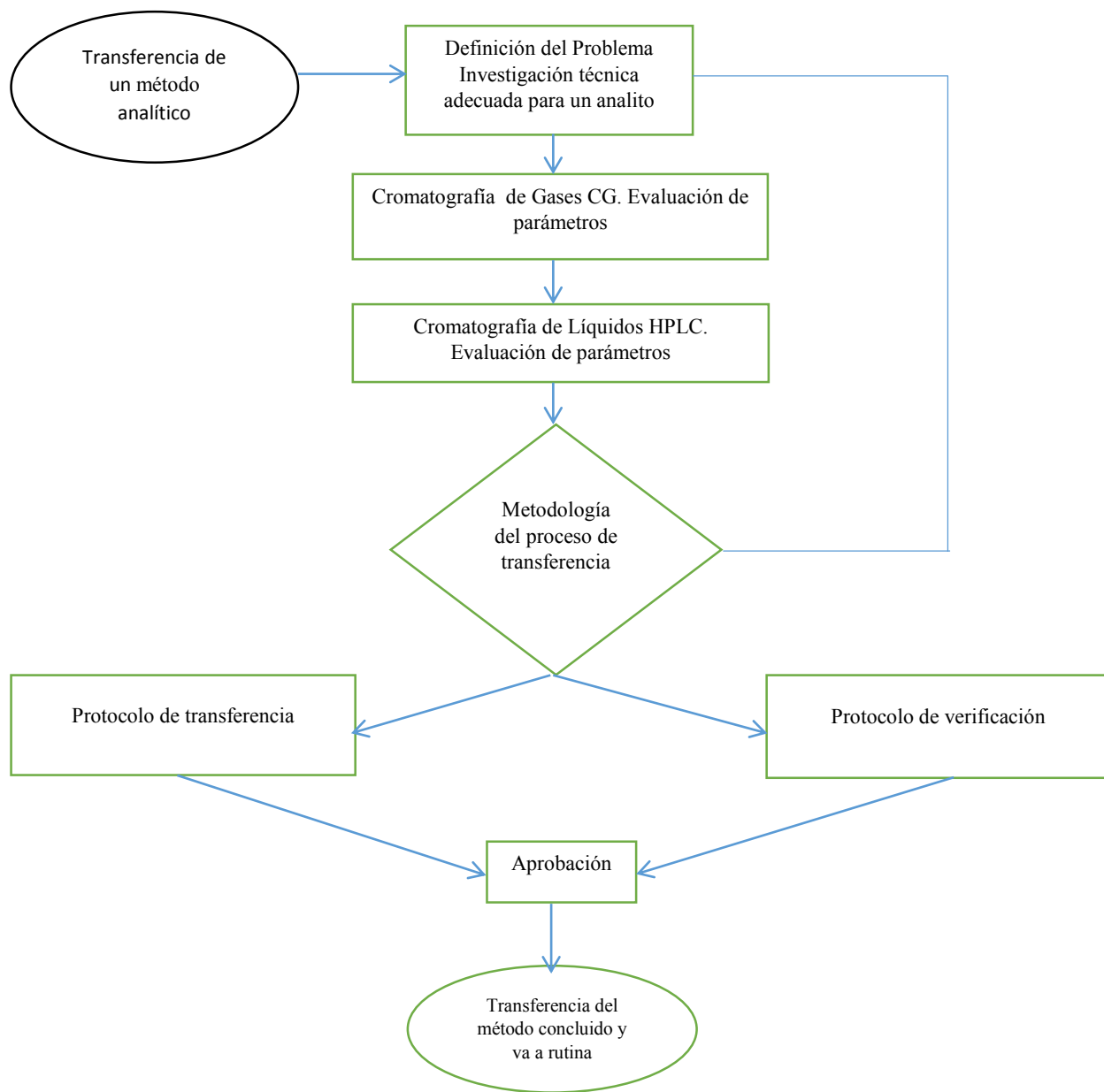


Figura. 5 El flujo de información de la transferencia de ácido valproico.

5.1.2. Materiales y Equipos

Equipos:

- Cromatógrafo de Gases (CG)
- Cromatógrafo de Líquidos (HPLC)
- Balanza analítica
- Campana de Extracción
- Potenciometro.
- Agitadores mecánicos

Materiales

- Vasos de Precipitado
- Matraces Aforados de 50 mL.
- Matraces Aforados de 250 mL
- Matraces Aforados de 200 mL
- Pipetas Volumétricas 5 mL.
- Pipetas Volumétricas 20 mL.
- Pipetas Volumétricas 15 mL.
- Columnas para cromatografía de gases, y cromatografía de líquidos.
- Filtros para fases móviles y muestras.

Reactivos

- Estandar de ácido valproico USP.pureza minimo de 99.5%
- Muestras problemas.Preferentemente producto caduco
- Acetonitrilo grado HPLC.sigma aldrich
- Agua purificada.Milli-Q grado HPLC
- Ácido ortofosfórico. grado reactivo Merck
- Bufferes.Beckman.coulter 1.68, 4.0 y 7.0.
- Fosfato de sodio monohidrato. grado reactivo Merck o sigma aldrich
- Ácido cítrico grado reactivo J.T. Baker.
- Fosfato dibásico. grado reactivo Merck

5.1.3. Ventajas y desventajas de un método por cromatografía de gases, a cromatografía de líquidos

En estudio comparativo de las ventajas que se tienen al cambiar un método analítico de ácido valproico de cromatografía de gases a cromatografía de líquidos ver tabla 3. Y un punto importante resaltar, la alineación de métodos dentro de la filial.

Tabla 3. Estudio comparativo del cambio de un método analítico de cromatografía de gases, a cromatografía de líquidos.

Puntos considerados	CG	HPLC
Costos	Elevados en un 30 % por el costo de los gases que se utilizan para el sistema helio hidrógeno y aire	Economico en un 30 % el costo de preparación de la fase móvil es económica comparada con los gases
Columnas	Elevados en 20 % + o – fragilidad del material (vidrio y en desuso)	Resistente en el uso y poco más robustas
Métodos	Generales Método por cromatografía de gases	Generalidades cambios en su análisis
Desechos	Diclorometano	Acetonitrilo
Tiempos de análisis	Corrida de 8 a 15 min	8 min
Desarrollo del método	Se requiere cierta habilidad para la extracción del analito (diclorometano como solvente de extracción)	Solo requiere tiempo de agitación con el solvente (acetonitrilo como solvente de extracción)
Equipos	Cromatógrafo de gases	Cromatógrafo de Líquidos de alta presión
Costos	Más elevados en un 30 %. Por la pureza de los gases	Más económico no requiere algo extra.
Robustes	Mínima solo resalta picos mayores	Mayor para picos pequeños y resalta las pequeñas fluctuaciones en línea base

5.1.4. Tabla de evaluación con costos

Se realizó la evaluación de algunas ventajas del análisis por cromatografía de líquidos con respecto a cromatografía de gases tomando en cuenta. El método general para su ensayo, Equipos que se tienen, uso de estándares y reactivos, columnas y preparación de muestras, estándares y tiempos generales de análisis ver tabla 4. Aproximados.

Tabla 4. Estudio de costos aproximados de una transferencia del método analítico de cromatografía de gases, a cromatografía de líquidos.

	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR HPLC METODO COMPENDIAL	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR CG METODO ACTUAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Método	HPLC (UV)	GASES (por ionización de flama)	HPLC= Menor tiempo de Acondicionamiento de columna	GASES= Analistas especializados
Reactivos	Ácido cítrico monohidratado 2.0 g fosfato dibásico de sodio 1.6 g Ácido fosfórico 20 mL. Acetonitrilo 800 mL.	Cloruro de Metileno 1000 mL Ácido clorhídrico 100 mL helio 5000 mL	HPLC Costo de reactivos Aprox: 10 usd.	Gases - Cloruro de metileno: alto costo, seguridad del analista, daño al medio ambiente. (\$ 35 USD) HCL = 4 usd - Helio: Costo: \$ 15 usd Costo total de reactivos: 59 usd.
Estándar	Estándar USP ácido valproico 100 mg.	(Estándar interno) Bifenilo 2.5 g Estándar USP Ácido valproico 125 mg	HPLC= 45 usd.	GASES= 59 usd 58 usd Acido Valproico + 1 USD bifenilo
Columna	L11 15cmx3.9mm 4mm (fenilo, silica porosa de 1.5 a 10 mm).	De vidrio 10% DEGS-PS 6 pies x 1/4 pulgada x 2 mm, de malla 80 a 100	HPLC= 617 usd.	GASES= 950 USD Desventaja: columna de vidrio empaque sobre pedido. Manejo frágil.
Fase móvil	Ácido cítrico monohidratado, fosfato dibásico de sodio, ácido fosfórico y acetonitrilo. (1000 mL). Flujo: 0.9 mL x minuto.	Gas acarreador: helio 40 mL. x minuto (5000 mL.). aproximadamente	Ver costos en columna de reactivos.	
Preparación de estándar	Dilución en fase móvil Solución estándar estable por 3 meses.	Solución de estándar interno (Estándar de bifenilo en cloruro de metileno en 1000	HPLC= Menor tiempo de preparación	NA

	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR HPLC METODO COMPENDIAL	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR CG METODO ACTUAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
		mL.) y con este aforar el estándar de ácido valproico.		
Preparación de muestra.	tabletas = 10 o 5 tabletas sonicar durante 1.5 hrs. con fase móvil.	tabletas=10 o 5 tabletas agitar mecánicamente durante 1.0 hr, con 50 ml. solución de estándar interno (estándar de bifenilo en cloruro de metileno), en un embudo de separación. agregar hcl agitar manualmente 2 minutos y dejar reposar 15 minutos, agitar otra vez 2 minutos y dejar separar las fases durante 30 minutos.	hplc= fácil método de preparación y de menor tiempo.	gases= uso de embudo de separación en la preparación de la muestra y posible pérdida por la volatilidad del cloruro de metileno. manipulación directa del analista con el cloruro de metileno (extracciones). mayor tiempo y cuidado en la preparación de la muestra.
Tiempo por inyección	8 minutos.	8 minutos.	NA.	NA.
# de inyecciones	1 blanco Estándares (system suitability) Estándar de cuantificación (3 inyecciones) 2 Muestras (2 Inyecciones) Pueden inyectarse hasta 4 muestras (4 inyecciones) Estándar de cuantificación (2 inyecciones) Total: 12.	3 Estándares (system suitability) Estándar de cuantificación (2 inyecciones) 2 muestras (2 inyecciones de cada una) Estándar de cuantificación (2 inyecciones) Total: 11.	NA.	NA.
Tiempo de análisis de equipo	2.0 horas (120 min).	1.5 horas (88 minutos).	Gases= menor tiempo de análisis.	NA.
Tiempo total por análisis.	4.5 - 5.0 horas Considerando el acondicionamiento del equipo y preparación de muestras.	4.0 - 4.5 horas Considerando el acondicionamiento del equipo y preparación de muestras.	La diferencia es de 30 minutos, considerando que las extracciones sean continuas y se extraiga la muestra adecuadamente por la evaporación del disolvente (Cloruro de metileno).	Tiempo total por análisis.
Costo Total POR ANÁLISIS (1 LOTE)	\$ 672 usd (Considerando la compra inicial de la columna) \$ 55 USD (cuando ya se haya adquirido la columna)	\$ 1,053 usd. (Considerando la compra inicial de la columna) \$ 103 USD (cuando ya se haya adquirido la columna)	NA.	

	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR HPLC METODO COMPENDIAL	DETERMINACION DE ACIDO VALPROICO POR CG METODO ACTUAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
COSTO TOTAL POR ANÁLISIS DE 5 LOTES	\$ 692 USD (Considerando la compra inicial de la columna) \$ 75 USD (cuando ya se haya adquirido la columna) por que solo se necesitarían 2 litros de Fase móvil adicionales, se utiliza el mismo estándar	\$ 1,193 USD (Considerando la compra inicial de la columna) \$ 243 USD (cuando ya se haya adquirido la columna)	HPLC Costo de reactivos Aprox: 20 USD	GASES - Cloruro de metileno: \$ 105 USD) HCL = 20 USD - Helio: Costo: \$ 15 USD Costo total de reactivos: 140 USD

6. Resultados.

Se elaboró la estructura general que especifica, los pasos a relizar en un protocolo de transferencia (ver anexo 1) y se elabora la estructura de un protocolo de verificación (ver anexo 2) para el ácido valproico por cromatografía de líquidos HPLC con los puntos que se requieren documentar para este proceso. Tomando en cuenta características del proceso de cambio de casa matriz a una filial, evaluando el proceso y método analítico desarrollado y evaluando los cambios significativos para el ensayo del analito en cuestión, se revisan equipos, instalaciones, estándares, reactivos, documentos, validación del producto original y personal, evaluados previamente antes de su transferencia de cromatografía de gases a cromatografía de líquidos. Teniendo como soporte o base, políticas internas en la industria farmacéutica, alinendo parámetros de casa matriz en programas de mejora continua para productos ya establecidos a sus filiales en el mundo.

Como resultado se planteó la estructura del protocolo de transferencia, se ejecutó con esos parámetros donde se indica los criterios de aceptación de casa matriz y las pruebas de precisión intermedia y reproducibilidad a evaluar para el ácido valproico y tendrán sus propios criterios de aceptación del tipo de transferencia del cual se trató.

También se formó el protocolo de verificación para cuando un método es compendial o se encuentra registrado en farmacopea o USP. Y los pasos de revisión son diferentes.

7. Conclusiones:

Al desarrollarse el cambio analítico de un producto se requiere un protocolo de transferencia en donde se plantearon los puntos de cambio, desde un aspecto analítico, instrumental, método o procedimiento, se considero la complejidad que esto requiere y hacer las recomendaciones claras para llevar a un buen termino los cambios requeridos.

Se realizó un análisis documental para ácido valproico. El primer punto que se considero fué cambio de técnica, por que su análisis ya es obsoleto para la cuantificación del principio activo, la metodología original utiliza columnas de vidrio para ácido valproico en cromatografía de gases de las cuales ya no se fabrican actualmente. Por lo que se planteo la necesidad de modificar la técnica sin alterar parámetros del producto final del cual fué desarrollado. Se consultaron propiedades físico – químicos de la molécula, como solubilidad, punto de fusión y otras técnicas instrumentales donde se desarrollo un cambio de análisis sugiriendo el ensayo por Cromatografía de líquidos HPLC siendo un sistema más robusto, sensible, confiable y reproducible. A diferencia de su diseño por CG. para finalizar la transferencia del método analítico se reviza que el control de cambios, el cual requiere que todos los documentos esten llenados y firmados correctamente para su aprobación hasta su cierre.

En la actualización de los métodos analíticos se realizan cambios a parámetros de mejora para el procedimiento y equipos de un analito específico. esto se detalla en los procesos de transferencia del método analítico para ácido valproico por cromatografía de gases al método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para realizar la transferencia del método analítico, de acuerdo con los resultados reportados en este protocolo de transferencia. Se cumplen con todos los criterios de aceptación establecidos en el mismo protocolo, para productos similares en ambas filiales.

El proceso de transferencia es el mecanismo que se emplea hoy en día en la industria farmacéutica donde el Laboratorio de Origen (OL) y el Laboratorio que Recibe (RL), se plantea y diseñan los puntos que se ejecutarón para la transferencia de ácido valproico como: reproducibilidad y precisión intermedia, para alcanzar un resultado satisfactorio del método de prueba para el ácido valproico, por lo tanto el proceso a seguir establece que se realizó con la misma muestra y dos días diferentes, con dos analistas diferentes y tres replicas cada uno en el mismo equipo, evaluando los resultados obtenidos del ácido valproico.

A continuación se indica la metodología manejada y los parámetros considerados para la transferencia del método analítico del ácido valproico

- Reproducibilidad:

El promedio de la muestra obteniendo de la precisión intermedia de RL (n=6 mediciones continuas de la muestra) debe estar de acuerdo con límite menor de desviación estándar relativa del 4.0 % como un valor absoluto del 100 % del ensayo en relación con el laboratorio de origen CoA el resultado expresado en el % Documentado. El Resultado es 2.1 % de RSD por lo tanto cumple parámetro.

- La Precisión Intermedia:

Se analizaron 3 determinaciones independientes del producto de pruebas de acuerdo al método analítico por el 1er analista, y 3 determinaciones independiente de muestras de producto para el 2o analista. Criterios de aceptación: % desviación estándar relativa para cada analista y en general % desviación estándar relativa debe ser igual ó menor al 3.3 %. Reportando independiente tanto para n igual a 3 como para n igual a 6 determinaciones, el promedio del RSD en %, el intervalo de confianza etc. Resultado es de 1.4 % por lo tanto cumple parámetro.

Con base a los parámetros analizados la transferencia de este método analítico de ácido valproico por HPLC para recibirse en el Laboratorio (RL) y los resultados serán comparados con los acuerdos de calidad entre (OL) y ambos laboratorios. La prueba de identificación se determina en relación de picos en los cromatogramas de las preparaciones de muestras y de estándares.

La transferencia es aprobada para este método que demuestra ser estable y que los criterios de aceptación son reproducibles y constantes. Además que los resultados del análisis de la muestra esta dentro de los parámetros de especificación.

La verificación del método de análisis del ensayo e identificación se recomienda para métodos compendiales es necesario realizar esta verificación que demuestre que el método seleccionado es adecuado para su uso previsto, bajo condiciones específicas. El método de ensayo del producto a prueba será verificado de acuerdo a protocolo, (anexo2) la especificación, alineado con los requerimientos de la USP como método compendial de acuerdo a la política referente a cada empresa.

Se revizarón los parámetros de Precisión intermedia y Especificidad para realizar la verificación del método, utilizando producto farmacéutico de una filial o de otro país, el protocolo debiera estar aprobado y disponible para el area de calidad cumpliendo con todos los criterios evaluados en su protocolo de casa matriz OL como en la filial RL. Proceso en el cual el ensayo no modifica sus características por cromatografía de líquidos HPLC.

8. Las propuestas para mejorar el desarrollo de la transferencia:

Se propone revisar las nuevas tecnologías cromatográficas de líquidos como el de cromatografía de líquido de funcionamiento ultra UPLC que es un sistema que genera mayor presión y sus columnas son de 5 a 10 cm con un diámetro interno inferior y con mayor afinidad de separación del analito y su resolución entre picos será mayor, entre otros.

Se revisaran otros solventes de extracción para utilizar menor cantidad y mantener la afinidad de la molécula y solubilidad, así como que sean menos tóxicos

Se revizará, columnas de nueva generación donde las partículas, tamaño de columna, longitud y diámetro interno tengan mejor interacciones con el sistema y cumpla para la separación, resolución y su cuantificación del analito en cuestión.

Al tener una mayor demanda por aumento de ventas el costo de reactivos es modificado y se tendría menor cantidad de residuos generados en los análisis.

Se propone desarrollar nuevas bases de transferencia de métodos analíticos más sencillos y que cumplan con los parametros requeridos y extenderla a otros analitos.

9. Bibliografía.

1. Administración y gestión de la calidad total en la farmacia oficial Oviedos, Antonello 2 edición, Di pauli n.a. Ars Pharmaceutica, 43:3-4; 159-177, 2002
2. Responsable de TQM Área de Desarrollo de Productos y Procesos UNC-Hemoderivados/
Av Valparaiso s/n Agencia Postal 4 - 5016 Cordoba- República Argentina. 2
Farmacia Antonello-Vilca, 1104-5186.
3. Curso de Transferencia y Validacion de Métodos Analíticos . 24, 27 y 26, De Marzo del 2014. Por Terra Farma.
4. Analytical Method Development and Validation Michael Swartz, Ira S, Krull. Editorial Marcel Dekker Inc. New York. 53 – 68. (1997).
5. Taylor, John K. Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry, Vol. 55 N° 6 (05, 1993).
6. USP-35 NF-30. Pharmacopoeia National Formulary United States of Americas 2012. 4992.
7. Skoog, Douglas A. y Leary, James J. (1994). Analysis Instrumental. Armenia: MGrav-Hill. 345, 84-481-0191-X, 785 – 791 y 831 – 836.
8. Michael Swartz, Marcel Dekker. Analytical method development and validation 1997. Pag. 7–91.
9. FEUM. Farmacopea de los estados unidos Mexicanos. Decima edición 2011 Pag.1301, 2175.
10. FEUM. Farmacopea de los estados unidos Mexicanos. Undécima edición 2014 Pag.1379, 2350.
11. Skoog Wert Holler Crouch. Fundamentos de Química Analítica 8 ed. Cengage Learning 2009. Pag. 2 -17 y 958 – 985.
12. Goodman and Gilman Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. Las bases farmacológicas de la terapéutica 11ª. ed. México 2006: 684
13. ICH-FDA Avalbility of draft Guideline on quality of biotevhnological/biological products. Derivation and characterization of cell substrates, Used for producción of biotechnological/ biological products, notice. Federal Register vol. 62N85 (03,1997)
14. McNair, Harold M. & Miller, James M. Basic Gas Chromatography. Canada: John Wiley & Sons, Inc. (1998).

15. Modelling and prediction of retention in high-performance liquid chromatography by using neural networks", *Y.L. Xie, J.J. Baeza, J.R. Torres, M.C. Garcia y G. Ramis*, *Chromatographia*, 1995. 41, 435-444.
16. McNair, Harold M. & Miller, James M. *Basic Gas Chromatography* 2 ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc.. ISBN: 978-0-470-43954-8. (alk. paper); july 2009. 0-471-17261-8. 25, 53
17. Ptrucci, Harwood, *arenque General de Química*. Ed. 8 °. Prentice Pasillo. 2003. Pag. 18.
18. Brown, Lemay. *Química Central de Ciencia de la Ed*. Prentice – pasillo Hispanoamericana. 1998., 84, 104.
19. PLM *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas* 39ªed. México 1993. 1507-1511.
20. USP-36 NF-31. *Pharmacopoeia National Formulary United States of Americas* 2013. 5533
21. *Curso de Buenas prácticas de laboratorio y de control de calidad*. 20, 26, 27 Y 28 Noviembre, 02 de Diciembre del 2013. Por Terra Farma.
22. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. MugdhaKarde, HarshalAwarr, AchelGeevarghese, Jaikishan k hatri. Development and validation of RP-HPLIC methods for estimation of Valproic Acid in dissolution study of its formulations. vol. 4 supply 5. 2012. issn-0975-1491. 25 july 2012.
23. *Cibtech Journal of Pharmaceutical Sciences* ISSN: 2319-3891 (online) An Online International journal Available at <http://www.cibtech.org/cjps.htm> 2013 vol. 2. determination of valproico acid by HPLC in human blood and its relationship to therapeutic drug monitoring Colegio federado de químicos y de ingenieros químicos de Costa Rica, Ingeniería y ciencia química, Actualidad de los Fármacos, Camaleón Editores, S.A. 1998
24. FDA. US Departament of health and human services. Guidance for industry bioanalytical.
25. Centro de electroquímica y energía. Programa de capacitacióny actualización profesional UCR. Definitions in method validación, traceability and uncertainty.
26. EURACHEM, *The fitness for purpose of analytical methods*, First English Edition 1998.
27. Colegio federado de químicos y de ingenieros químicos de Costa Rica, Ingeniería y ciencia química, Actualidad de los Farmacos, Camaleón Editores, S.A. 1998
28. *Introducción a la HPLC Capitulo 12 Validación de métodos* Pag. 302-328.
29. Taylor, John K. *Validation of Analytical Methods*. *Analytical Chemistry*, Vol. 55 N° 6 (05,1993).

30. Kenneth A. Rubinson, Judith f. Rubinson *Análisis Instrumental* , Ed. Prentice Hall. España 2004. Pp730 – 739.
31. PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. México 2013.
32. Paulo Ricardo de Souza, Juliana Machado de Carvalho, André Luis Mazzei Albert, Josino Costa Moreira and Chistina Leandro. Development and validation of a method for the determination of valproic acid in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), 2013. *Vigilancia sanitária em debate* 1 (1) 52-58.
33. Simon D and Penry JK. Sodium di-N-propylacetate (DPA) in the treatment of epilepsy. A review: *Epilepsia* 1979. 16 549.
34. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of valproic acid in dissolution study of its formulation. Mugdha Karde, Harshal pawar, Rachel Geevarghese, Jaikishan Khatri. Vol 4, Suppl 5, 2012.

ANEXO 1

Protocolo de transferencia:

Protocolo de Transferencia de métodos analíticos de productos farmacéuticos.

Transferencia de método analítico			CC No.: LP000000
Clave:			Número de documento de transferencia.
Tipo de documento formato	Fecha de aprobación: 23-May-2013	Fecha de cambio: 31-Aug-2013	Fecha efectiva: 23-May-2013

Productos farmacéuticos

Transferencia de métodos analíticos

Ácido valproico en jarabe o cápsulas. por HPLC

1.0 información del método de prueba	
Nombre del método analítico	Procedimiento analítico para ácido valproico en jarabe o cápsulas Ensayo (por HPLC)
Numero de método de prueba	4107-00XXXXXXXX (anexo metodología)
Dato de referencia (laboratorio originador)	Certificado analítico del análisis de prueba.
Método validación del ensayo referencia (Número de reporte de validación)	Validación del método analítico: ensayo de ácido valproico por HPL MVR/F/158, dato aprobado: 14/07/13

	Validación del método analítico. ensayo por HPLC bibliografía (originador) MVR/F/294 (suplemento de reporte de validación) MVR/F/158), dato de aprobación: 05/10/13
Número de documento:	PLP-00000XXXXXX

Descripción
<p>El método de prueba procedimientos analíticos para ácido valproico del ensayo por HPLC es considerado como un método moderadamente complejo debido al origen del laboratorio, se debe tener la familiaridad, con los métodos de prueba por HPLC y el análisis de productos de ácido valproico.</p> <p>El método de prueba es validado por casa matriz y la filial revizó detalladamente el informe de validación.</p> <p>La validación del método analítico para el ensayo por HPLC del ácido valproico,</p> <p>El de Laboratorio de Origen (OL) y el laboratorio que recibe (RL) ha convenido que RL completará: la reproducibilidad y la precisión intermedia para alcanzar el método de prueba del ensayo de ácido valproico será probada para recibir en el laboratorio y los resultados serán comparados contra el (OL) como acuerdos de calidad entre ambos.</p> <p>La transferencia aceptada del método será demostrada para encontrar los criterios establecidos de aceptación. Además, todos los resultados de análisis de la muestra deberían estar dentro de los parámetros de especificación.</p>

2.0 Página de aprobación

Pre-aprobaciones	(Aprobados los criterios de aceptación) (la Pre-aprobación de recibido en el laboratorio indica que los recursos y el equipo es suficiente y la capacitación es suficiente y la requerida)		
	Nombre	Firma	Fecha
Representante de laboratorio de origen			
Gerente de laboratorio de origen			
Representante de laboratorio que recibe			
Gerente de laboratorio que recibe			
Garantía de calidad (Laboratorio que recibe)			
Otros			
Otros			

Post-aprobaciones	(El método de prueba está listo para la puesta en práctica en el laboratorio que recibe)		
	(Todos los criterios han sido establecidos y prueban la transferencia del método y están completos)		
	Nombre	Firma	Fecha
Representante de laboratorio de origen			
Gerente de laboratorio de Origen			
Representante de laboratorio que recibe			
Gerente de laboratorio que recibe			
Garantía de calidad (Laboratorio que recibe)			
Otros			
Otros			

3.0 Método de prueba	
Método de prueba:	Procedimientos analíticos para ácido valproico de 250 mg ensayo por HPLC.
Riesgos:	Observe siempre buenas prácticas de laboratorio. Consulte las hojas de datos apropiados, material de seguridad, antes del manejo de cualquier producto químico nuevo o desconocido.

Estándar de estabilidad:	Proteja todas las soluciones de la luz y use frascos de ámbar y la cristalería de bajo actínio. Preparación de estándar inmediatamente antes del empleo.
Muestra de estabilidad:	Proteja todas las soluciones de la luz y use frascos de ámbar y la cristalería de bajo actínio.. Prepare la muestra inmediatamente antes del empleo.
Otros accesorios:	No Aplica

4.0 Criterios de aceptación del método prueba, ensayo

La muestra: Resultados de análisis deben encontrarse, datos específicos y criterios de aceptación establecidos en la siguiente sección. Los parámetros establecidos del sistema deben anotarse en este documento.

Ácido valproico:

4.1.1. Reproducibilidad:

El valor total medio obtenido de la precisión intermedia en el RL (n=6) debe estar de acuerdo al 4.0 % como un valor absoluto de % en relación con el laboratorio de origen CoA el resultado expresado en el % documentado.

4.1.2. Precision intermedia:

3 determinaciones independientes que usan el producto típico según el método de prueba por el 1er analista, y 3 determinaciones independientes la utilización de muestras de producto típicos según el método de prueba por el 2o analista. Criterios de la aceptación: % RSD para cada analista y en general %RSD debe ser = el 3.3 %. Reportando tanto para n=3 como para n=6: Promedios. De, % RSD e intervalo de Confianza etc.

5.0 Método moderadamente complejo

5.1. Resultados.

5.1.1. Reproducibilidad – ácido valproico:

El Origen del laboratorio (OL) y Recibiendo el Laboratorio (RL) ha convenido que RL complementa la reproductibilidad para alcanzar la transferencia de método de prueba.

Reproducibilidad(e.g., Rango de aceptación):

Información de la muestra	Resultados de la muestra de 6 determinaciones (OL, <i>dato de CoA</i>):	Resultados de muestra de 6 determinaciones (promedio de la precisión intermedia):	Rango de aceptación: (<i>Resultados. valor absoluto en % relación con los resultados o de origen expresados en % LA</i>)
	mg/tab: %:	mg/tab: %:	Relación de datos de la validación y datos obtenidos $\pm 4.0\%$ (CoA)

Referencias del Laboratorio que recibe:

Método e instrucciones de Preparación de la muestra:

RL: Informe general del promedio de precisión intermedia.

OL: Informe del ensayo, resultado de CoA.

Compare resultados contra criterios de aceptación.

5.1.2. Intermedia precisión – ácido valproico :

Laboratorio de Origen (OL) y Laboratorio que recibe (RL) ha convenido que reporte final es completo con la precisión intermedia para alcanzar la transferencia de método de prueba.

Intermedia Precisión

precisión (desviación estándar y promedio):

Resultados de la Muestra :	Ácido valproico		Criterios de aceptación
	Resultados de las muestras (RL):		
	Muestra #:	Resultado(mg/tab):	
	Analista 1, muestra 1		
	Analista 1, muestra 2		
	Analista 1, muestra 3		
	Analista 2, muestra 1		
	Analista 2, muestra 2		
	Analista 2, muestra 3		
	Promedio analista 1:		RSD para cada analista en general ≤ 3.3 %
	st dev analista 1:		
	% RSD analista 1:		
	Intervalo de confianza analista 1:		

	Promedio Analista 2:		
	st dev analista 2:		
	% RSD analista 2:		
	Intervalo de confianza analista 2:		
	Promedio general:		
	general st dev:		
	general % RSD:		
	Intervalo de Confianza total:		

Instrucciones: Preparación de la muestra: RL:

Dos analistas prepararán sus propias muestras y reactivos, evaluando tres preparativos de muestras según procedimientos analíticos para el ensayo de ácido valproico en mg por mililitro HPLC. Reportar las exigencias tanto para n=3 como para n=6: Promedio, %RSD e intervalo de confianza.

Compare resultados contra criterios de aceptación.

Referencia Laboratorio que recibe: Documentos y número de transferencia.^{3, 22, 23.}

ANEXO 2

Protocolo de verificación:

Protocolo de Verificación

LABORATORIO FARMACEUTICO

PROTOCOLO – Transferencia de Métodos Analíticos

Título:	Verificación del método de ensayo e identificación.		
Iniciador:	A_Alvarez.	Fecha de Inicio:	08/Ago/2013
Sitio:	México	Departamento:	Laboratorio químico

Número y nombre del método:	METODO DE ANÁLISIS N° Especificaciones de control del producto (Ensayo, impurezas etc.)
Fecha de aprobación del método:	22/Nov/2013
Fecha de efectividad del método:	22/Nov/2013
Número de Lista del Producto:	Clave
Nombre del Producto:	Producto (Principio activo)
Razón de la verificación:	De acuerdo a políticas, acuerdo de calidad Se recomienda que para métodos compendiales es necesario realizar una verificación para demostrar que el método seleccionado es adecuado para el uso previsto bajo condiciones especificadas. El método de Ensayo Producto será verificado de acuerdo a la especificación, alineado con los requerimientos de la

	USP como método compendial, Política referente a cada empresa (Fecha de efectividad: 22/Nov/2013).
--	--

Aprobación de Protocolo y Reporte

Todos los planes/procedimientos en este protocolo/reportes fueron revisados y aceptados de conformidad con las políticas apropiadas. Las firmas capturadas manualmente indican aceptación y aprobación de este protocolo/reportes.

Pre-Aprobación

La pre-aprobación indica que los recursos, el equipo y los entrenamientos son suficientes y la aprobación del criterio de aceptación.

Función	Nombre	Firma	Fecha
Autor			
Revisor/Jefatura de Control de Calidad			
Revisor/ Jefatura de Centro Técnico			
Aprobador/Gerencia de Calidad			
Aprobador/Gerencia de Documentación (o dependiendo cada estructura)			

Post- Aprobación

La post-aprobación indica que el método ha sido verificado y está listo para su implementación y que todos los criterios han sido cumplidos.

Función	Nombre	Firma	Fecha
Autor			
Revisor/Jefatura de Control de Calidad			
Revisor/ Jefatura de Centro Técnico			
Aprobador/Gerencia de Calidad			
Aprobador/Gerencia de Documentación (o dependiendo cada estructura)			

TABLA DE CONTENIDO
DE VERIFICACIÓN

Sección	Página
1.0 Propósito*	5
2.0 Alcance*	5
3.0 Parámetros de Verificación*	5
3.1 Adecuabilidad del Sistema*	5
3.2 Precisión-Intermedia*	6
3.3 Especificidad*	7
4.0 Resultados**	8
5.0 Equipos e Instrumentos**	10
6.0 Conclusiones de la Verificación**	10

* Las secciones identificadas con un asterisco deberán ser llenadas antes de las firmas de pre-aprobación.

** Las secciones identificadas con doble asterisco deberán ser llenadas antes de las firmas de post-aprobación.

1.0 Propósito. *

El propósito de realizar la verificación del método de análisis de Ensayo e Identificación Producto farmacéutico es demostrar que el método seleccionado es adecuado para el uso previsto bajo condiciones específicas. Será verificado de acuerdo al método (Especificación), alineado con los requerimientos de la USP como método compendial.

2.0 Alcance *

La verificación del método de análisis de Ensayo e Identificación se llevará en producto farmacéutico.

Se realizarán los parámetros de Precisión Intermedia y Especificidad para realizar la verificación del método, utilizando producto farmacéutico de una filial o de otro país

La prueba de Identificación se determina en relación de los picos en los cromatogramas de las preparaciones de muestra y del estándar.

La verificación para la prueba de uniformidad de contenido no es necesaria ya que esta prueba se cubre completamente con la verificación del método de ensayo puesto que se realiza bajo las mismas condiciones.

La verificación exitosa del método se demostrará mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos.

3.0 Parámetros de Verificación.

*NOTA: Los parámetros necesarios para cada tipo de método son identificados en políticas o referencias oficiales. En la sección de criterios de aceptación, los criterios son de acuerdo al Método de prueba.

3.1 Adecuabilidad del Sistema

Parámetro de Prueba	La Adecuabilidad del Sistema debe ser establecida de acuerdo a los requerimientos del método “Especificaciones de Control del Producto para la Prueba que determina el Ensayo.
Criterio de aceptación	La Adecuabilidad del Sistema debe cumplir con los siguientes parámetros: Inyectar la solución de Adecuabilidad del sistema. La Resolución cuando se encuentren más de dos áreas diferentes en el producto debe de ser mínimo 3. El %RSD para 5 réplicas no debe ser mayor a 2.0%.
Resumen	**

**Las secciones identificadas con doble asterisco deberán ser llenadas antes de las firmas de post-aprobación.

3.2 Precisión Intermedia

Parámetro de Prueba	Dos analistas realizarán 3 determinaciones independientes por dos días del método de prueba. Especificaciones de Control del Producto para la determinación de Ensayo e Identificación, reportar lo siguiente: <ul style="list-style-type: none">- Resultados individuales en porcentaje.- Promedio en porcentaje.- Desviación estándar- Desviación estándar relativa (% RSD).- O lo que se indique en el método establecido como sistema
Criterio de aceptación	Todos los resultados deberán estar dentro del rango 90.0 - 110.0 % respecto al contenido declarado en el marbete. RSD% debe ser $\leq 3.3\%$

Resumen	**
----------------	----

**Las secciones identificadas con doble asterisco deberán ser llenadas antes de las firmas de post-aprobación.

3.3 Especificidad

Parámetro de Prueba	<p>Un analista realizará por duplicado la determinación del Ensayo.</p> <p>Placebo:</p> <p>Pesar por duplicado el equivalente a 10 muestraso de placebo del producto en un matraz y realizar la extracción de la muestra de acuerdo al método de prueba para la determinación de Ensayo.</p> <p>Muestra:</p> <p>Puede ser utilizada la misma muestra preparada para la precisión intermedia o preparar una muestra de acuerdo al método de prueba para la determinación de Ensayo.</p> <p>Estándar:</p> <p>Puede ser utilizado el estándar de la preparación de la precisión intermedia.</p> <p>Comparar y reportar un ejemplo de cromatograma de placebo, estándar y preparación de la muestra.</p>
Criterio de aceptación	Ausencia de picos en los cromatogramas del placebo que puedan interferir con la detección del pico del producto
Resumen	**

**Las secciones identificadas con doble asterisco deberán ser llenadas antes de las firmas de post-aprobación.

4.0 Resultados **

Precisión Intermedia				
Información de la muestra	% de Contenido de activo (Ácido Valproico)			Criterio de aceptación
	Muestra	Resultados Analista 1	Resultados Analista 2	
	1			Contenido del producto 90.0 – 110.0 %
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	Promedio			RSD ≤ 3.3 %
	Desv. STD			
	%RSD			
	Promedio total			
	Desv. STD total			
	%RSD total			
Referencias:				

Verificación de la transcripción de datos por:				

¿Se cumplen los criterios de aceptación? Sí No

Si no, explicar:

Especificidad

Información de la muestra	Resultados		Criterio de aceptación
	Muestra		Ausencia de picos en los cromatogramas del placebo que puedan interferir con la detección del pico del Ácido Valproico en las muestras preparadas en mg.
	Estándar		
	Placebo		

Referencias:

Verificación de la transcripción de datos por:

¿Se cumplen los criterios de aceptación? Sí No

Si no, explicar:

5.0 Equipos e Instrumentos**

Equipo / Instrumento	No. ID	Calibración	Próxima Calibración

6.0 Conclusiones de la Verificación**
