

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

FACULTAD DE TECNOLOGIA

QUIMICA INDUSTRIAL



**“SUSTITUCIÓN DEL METANOL POR ACETONITRILO EN
EL ANÁLISIS DEL METRONIDAZOL POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA”**

Trabajo de aplicación presentado para la obtención del grado de licenciatura

POSTULANTE: EDYVERTO MARCOS CHOQUE CHOQUE

LA PAZ – BOLIVIA

2016

DEDICATORIA

A todas las personas que colaboraron en la realización del presente trabajo. A quienes sin ser mencionados, fueron pilar importante durante mi vida y en la elaboración del presente trabajo de aplicación.

A mi hija Lilian Emily por ser estímulo de superación y conclusión de esta etapa de mi vida.

A todos mis amigos que siempre estuvieron apoyándome y que hicieron posible la culminación del presente trabajo.

AGRADECIMIENTO

A Dios infinita misericordia, por darnos la vida, cuidarnos y hacer posible la realización de este trabajo.

A mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome incondicionalmente.

A Carrera de Química Industrial, por ser la institución en la que me formé profesionalmente, por el apoyo, colaboración y predisposición de sus docentes, plantel administrativo, etc.

Al Laboratorios Farmacéuticos LAFAR S.A., por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo aplicación.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN	1
2. CAPITULO I	
2.1. ANTECEDENTES	2
2.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2.3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE APLICACIÓN	2
2.4. OBJETIVO	3
2.4.1. OBJETIVO GENERAL	3
2.4.2. OBJETIVO ESPECIFICO	3
3. CAPITULO II MARCO TEÓRICO	
3.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN “CLAR”	4
3.2. COMPONENTES BÁSICOS DE UN “CLAR”	5
3.2.1. RESERVORIO	5
3.2.2. BOMBA	5
3.2.3. INYECTOR	6
3.2.4. COLUMNA	6
3.2.5. DETECTOR	6
3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA (RPLC)	8
3.3.1. CADENA HIDROCARBONADA	9
3.3.2. FASE MÓVIL	9
3.3.3. SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL	10
3.3.4. FUERZA ELUTRÓPICA O FUERZA DEL DISOLVENTE (E°)	10
3.4. CALIFICACIÓN DEL EQUIPO “CLAR”	12
3.5. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS	12
3.5.1. CROMATOGRAMA	12

3.5.1.1.	DATOS DE UN CROMATOGRAMA	13
3.5.1.2.	CRITERIOS DE CALIDAD DE UN CROMATOGRAMA	14
3.5.1.3.	APTITUD DEL SISTEMA	17

4. CATITULO III MARCO METODOLÓGICO

4.1.	EQUIPOS.....	19
4.2.	REACTIVOS	19
4.3.	PROCEDIMIENTO.....	19

5. CAPITULO IV RESULTADOS

5.1.	RESULTADOS	23
5.2.	CONCLUSIONES.....	29
5.3.	RECOMENDACIONES.....	29

6.	BIBLIOGRAFIA	30
-----------	---------------------------	-----------

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura N° 1 Diagrama de un equipo de CLAR.....	5
Figura N° 2: Sistema de carga de la muestra en el inyector.....	6
Figura N° 3: Componentes de una columna.....	6
Figura N° 4: Esquema de un detector de ordenamiento de fotodiodos DAD.....	4
Figura N° 5: Triángulo de selectividad de solventes propuesto por Snyder.....	11
Figura N° 6 Fuerza elutrópica de solventes en RPLC.....	12
Figura N° 7: Cromatograma de separación de dos analitos.....	13
Figura N° 8: Pico cromatográfico asimétrico.....	16

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla N° 1 Proporción de Acetonitrilo: Agua en la fase móvil.....	21
Tabla N° 2 Criterios de calidad de un cromatograma.....	22
Tabla N° 3 Resultados de la separación con Metanol.....	24
Tabla N° 4 Resultados de la separación con Acetonitrilo.....	28

INTRODUCCIÓN

En la actualidad Laboratorios Farmacéuticos LAFAR S.A. está enfocado hacia la mejora continua en cuanto a la calidad, eficiencia e inocuidad de los medicamentos se refiere. Dentro de la variedad de productos elaborados está el Metronidazol capsulas, este producto tiene un método ya establecido en la farmacopea USP39, el cual solo requiere de la verificación de su aptitud del sistema para la realización de su respectivo análisis; pero a menudo presenta dificultades debido a la falta de metanol, que es una sustancia difícil de adquirir.

Por lo tanto en el presente trabajo de aplicación se propone cambiar el Metanol la fase móvil por Acetonitrilo de manera que la calidad del análisis no sea afectado, de esta manera cumpla el ensayo de aptitud del sistema establecido en la farmacopea USP39; para lo cual se trabaja con las fuerzas eutrópicas de estos dos solventes, calculando el % de Acetonitrilo requerido, también modificando el porcentaje del componente orgánico de la fase móvil propuesta Acetonitrilo versus el tiempo de retención, estableciendo de esta manera el porcentaje requerido de Acetonitrilo para que el analito eluya en las mismas condiciones ya establecido con la fase móvil original.

De esta manera se llega a realizar el ensayo de aptitud del sistema con la nueva fase móvil la cual resulta ser Acetonitrilo: Agua en proporción (11.9: 88.1); donde el ensayo de aptitud del sistema cumple con lo especificado en la farmacopea USP39, siendo viable la sustitución del metanol por Acetonitrilo. Así dando solución al problema planteado de la falta de Metanol.

1. CAPITULO I

1.1. ANTECEDENTES

Las industrias farmacéuticas trabajan estrictamente regidas por el Ministerio de Salud, es por eso que deben dar estricto cumplimiento a los requisitos establecidos por esta institución, la cual señala: “Disponer de medicamentos que garanticen inocuidad, eficacia y calidad demostrada, evitando la presencia de fármacos de dudosa calidad, ineficiencia farmacológica o de riesgo terapéutico”¹. Por esta razón Laboratorios farmacéuticos LAFAR S.A. trabaja con metodologías farmacopeicas que garantizan la calidad del análisis del medicamento.

Este es el caso del Metronidazol capsulas que para su análisis requiere metanol grado HPLC según farmacopea USP39². El cual en épocas altas de producción es bien requerido y difícil de conseguir debido a que es un reactivo controlado por las entidades correspondientes y escasas en el mercado por las formalidades necesarias para su adquisición.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Laboratorios Farmacéuticos LAFAR S.A. habiendo establecido su metodología de trabajo para el análisis del Metronidazol capsulas con Metanol, ha tropezado con el problema de acceso inmediato de este reactivo, ya que el Metanol es un reactivo controlado y para su requerimiento necesita realizar un moroso trámite con las autoridades de la Dirección General de Sustancias Controladas (DGSC).

Este hecho ha perjudicado el trabajo en línea de la producción con el control de la calidad, viéndose retrasado los análisis requeridos.

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE APLICACIÓN

En vista al problema planteado se propone sustituir el Metanol por Acetonitrilo para el análisis del Metronidazol capsulas, de manera que no afecte la calidad del análisis establecido en la Farmacopea USP 39 y así poder continuar con los análisis requeridos, sin perjudicar a la producción.

¹ Unidad de Medicamentos y Tecnología en Salud (Política nacional de medicamentos) Pag.7

² Farmacopea de los Estados Unidos USP39 (versión en español) Pág. 4791

Aunque el Acetonitrilo es un poco más caro en costos comparado con el metanol, es más fácil de adquirir, por lo cual en comparación con el tiempo perdido por falta de metanol es muy considerable.

Cabe mencionar que el uso de Acetonitrilo será una alternativa para el análisis del Metronidazol capsulas cuando no se cuente con metanol para el respectivo análisis.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones operativas de análisis del Metronidazol capsulas con Acetonitrilo por cromatografía líquida de alta resolución

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del trabajo de aplicación son:

- Verificar la aptitud del sistema para el Metronidazol capsulas según farmacopea USP39
- Determinar el porcentaje de Acetonitrilo con el cual se sustituirá el Metanol
- Realizar la aptitud del sistema para el Metronidazol con Acetonitrilo

2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN “CLAR”

La cromatografía líquida de alta resolución se encuentra dentro de la cromatografía de elución. En esta un líquido (fase móvil), circula en un íntimo contacto con un sólido o un líquido inmisible (Fase Estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analito) en la corriente de la fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminada la recorrida de la muestra por la columna cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir estarán separadas.

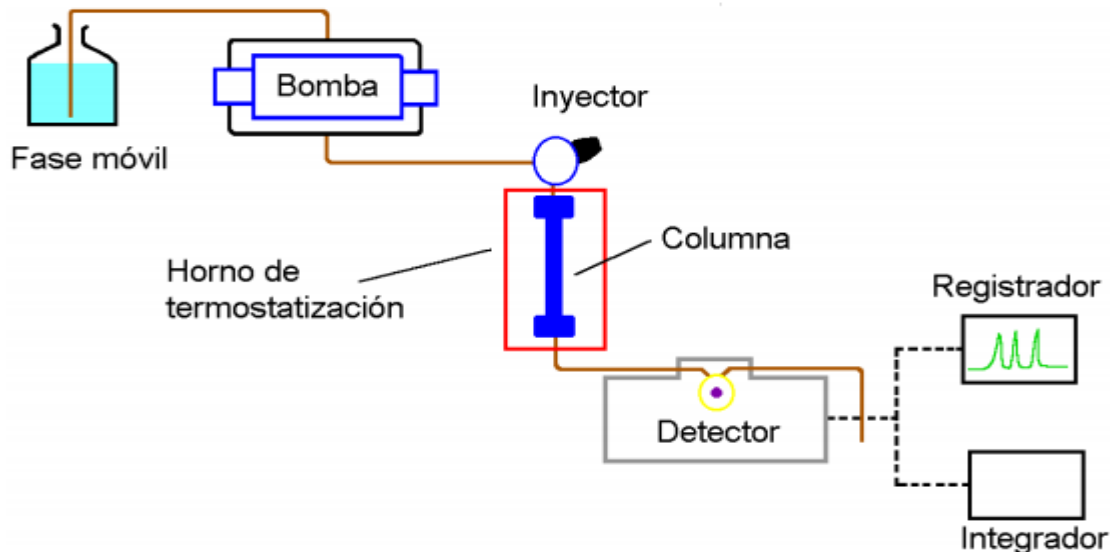
“La cromatografía líquida tiene una amplia aplicabilidad, por lo cual una manera eficiente de clasificarla es por la naturaleza de la fase estacionaria, ya que esta es la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación”³ de este modo se puede clasificar cuatro técnicas:

- Cromatografía de adsorción (líquido-sólido) la fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en las repetidas etapas de adsorción-desorción.
- Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente) la separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- Cromatografía de intercambio iónico este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.
- Cromatografía de exclusión molecular la fase estacionaria en este caso es una materia porosa de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando a otras de mayor tamaño.

³Quattrochi, Alberto Oscar “Introducción a la HPLC Aplicación y Practica” (1992) Pág. 30

2.2. COMPONENTES BÁSICOS DE UN “CLAR”

Figura N° 1: Diagrama de un equipo de CLAR



Fuente: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>

2.2.1. RESERVORIO

Son depósitos donde se encuentra la fase móvil, generalmente botellones de un litro de capacidad.

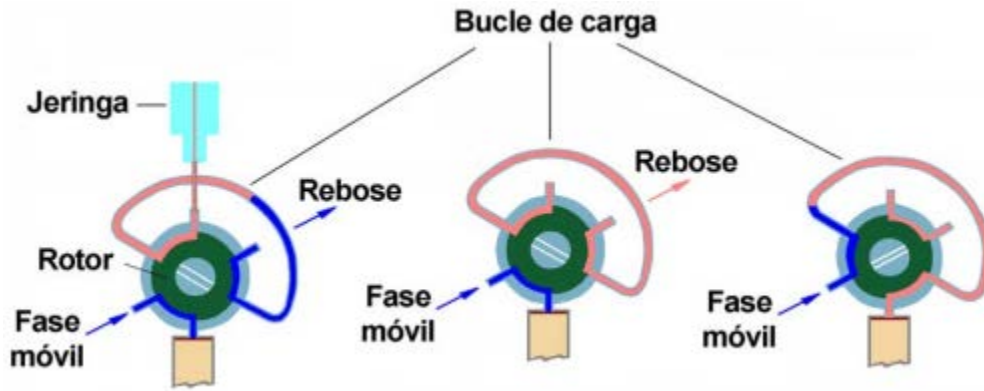
2.2.2. BOMBA

La misión de la bomba es de suministrar caudal constante y libre de pulsaciones, es el encargado de llevar la fase móvil y el analito (muestra) hacia la columna y posteriormente al detector. Debe ser capaz de trabajar a altas presiones, las más utilizadas en la actualidad son: bomba cuaternaria y bomba binaria (UHPLC) con pistón de zafiro.

2.2.3. INYECTOR

Es por donde se introduce la muestra mediante una jeringa o bucle de muestreo. Existen inyectores automáticos y manuales. Su función es introducir una cantidad de muestra específica para ser eluida en la columna y su posterior registro y cuantificación.

Figura N° 2: Sistema de carga de la muestra en el inyector



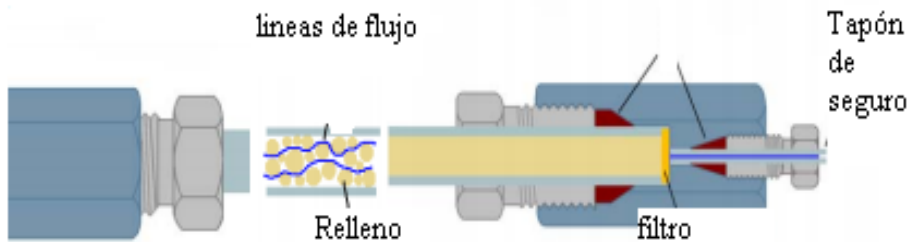
Fuente: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>

2.2.4. COLUMNA

Se dice que es corazón del Cromatografía por “CLAR”, es donde se encuentra la fase estacionaria, donde se produce la separación; mediante la interacción de la fase móvil y la fase estacionaria con el analito. Las características que influyen en su capacidad de separación son: diámetro interno, longitud, relleno, tamaño de la partícula del relleno

Por seguridad llevan una pre-columna el cual es un filtro más para cuidar a la columna.

Figura N° 3: Componentes de una columna



Fuente: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>

2.2.5. DETECTOR

Es un dispositivo que permite medir a la salida de la columna una propiedad física del eluyente que deberá detectar la composición de este. Las características que debe cumplir son:

- Respuestas debe ser proporcional a la masa o concentración del analito, lo implica que la señal producida debe variar linealmente con la concentración del soluto.
- El ruido es cualquier perturbación de la señal generada por el detector
- 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.
- La sensibilidad se define como la mínima concentración o cantidad de soluto que puede ser detectado por el detector, esta debe ser dos veces mayor al ruido de fondo.
- El rango dinámico es el rango de concentraciones entre los cuales el detector produce una respuesta dependiendo de la concentración del soluto a la salida de la columna.

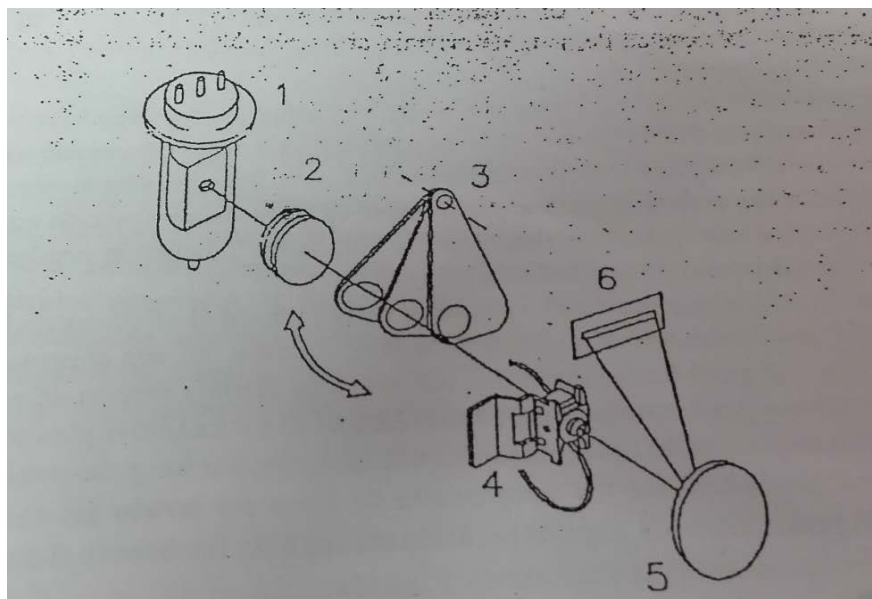
Existen varios tipos de detector entre los cuales podemos mencionar: Detector de índice de refracción, Detector Ultravioleta – Visible, Detector de fluorescencia, Detector de Conductividad, Detector Electroquímico y la Detector de Arreglo de Diodos (DAD)

El detector “DAD” es uno de los más utilizados para el análisis por cromatografía líquida de alta resolución, ya que trabaja con un ordenamiento de fotodiodos que emplea un sistema óptico invertido donde la celda se ilumina con luz blanca, es decir no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción allí se dispersa hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma se consigue medir no solo a la luz transmitida a una longitud de onda, sino a todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real⁴.

Es el detector ideal para realizar el desarrollo de los métodos analíticos por “CLAR”, ya que permite asegurar dentro de los límites, la integridad de un pico cromatográfico.

⁴Quattrochi, Alberto Oscar “Introducción a la HPLC Aplicación y Practica” (1992) Pag.31

Figura N° 4: Esquema de un detector de ordenamiento de fotodiodos DAD compuesto por:1) Lámpara de deuterio, 2) Sistema de lentes, 3) Chopper, 4) Celda, 5) Red de difracción y 6) ordenamiento de fotodiodos



Fuente: Quattrochi, Alberto Oscar "Introducción a la HPLC Aplicación y Practica" (1992) Pag.32

2.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA (RPLC)

Desde 1970 se desarrolló la cromatografía en fase ligada químicamente, la cromatografía de líquidos ha experimentado un gran desarrollo. Actualmente se estima que de las separaciones que se llevan a cabo por cromatografía líquida entre el 80% al 90% se realiza por medio de una columna con fase unida químicamente.

Estas fases ligadas químicamente han dado origen a dos modos de separación:

Cromatografía en fase reversa (inversa) y cromatografía en fase normal. Dentro de estas dos más del 70% corresponde a cromatografía de fase reversa.

“La cromatografía en fase reversa en la actualidad ha desplazado no sola a la cromatografía en fase normal (aunque nunca podrá hacerlo totalmente), sino que ocupa terrenos hasta hace poco exclusivos de la cromatografía de intercambio iónico y su empleo es progresivo para el análisis de macromoléculas, antiguamente tratadas solo por técnicas de filtración molecular, intercambio iónico”⁵.

⁵Quattrochi, Alberto Oscar "Introducción a la HPLC Aplicación y Practica".(1992)Pág. 109

La cromatografía de fase reversa tiene la particularidad de que la fase estacionaria es apolar, presenta cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo, amino y la interacción que se produce es inespecífica. La fase móvil es polar.

El mecanismo de retención en fase reversa no se comprende totalmente. Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos: partición del soluto en la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción.

La teoría solvofóbica de Horvath es probablemente la de mayor aceptación donde dice que la interacción entre las moléculas del soluto y de solventes es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria que actúa como receptor pasivo.

2.3.1. CADENA HIDROCARBONADA

La cadena hidrocarbonada ligada a la fase estacionaria es generalmente de tipo alquilo, especialmente C18 y en menor proporción C8, fenilo y amino. Clasificándose de esta manera según su forma operativa como:

- Cromatografía de partición simple
- Control de la ionización (Supresión Iónica)
- Cromatografía de Aparamiento Iónico
- Complejación con Iones Metálicos
- Cromatografía en fase reversa en medio no acuoso

La cromatografía de partición simple emplea como fase móvil una mezcla de agua y un modificador orgánico Metanol, Acetonitrilo o Tetrahidrofurano; en mezclas binarias, ternarias y en casos complejos aun cuaternarias⁶.

2.3.2. LA FASE MÓVIL

En “RPLC” la fase móvil está en general constituida por un solvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que se podrán agregar aditivos, sales o buffers. A mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención (menor k') y a mayor proporción de agua, mayor retención (mayor k').

⁶Quattrochi, Alberto Oscar “Introducción a la HPLC Aplicación y Practica”.(1992)Pág. 112

Los solventes de mayor empleo en RPLC son: el agua, metanol, Acetonitrilo y Tetrahifurano situados en grupos diferentes y opuestos en la clasificación de diagrama triangular de Snyder (ver figura N° 5)

Otros solventes empleados en menor grado son: Acetona, Dioxano, Dietilamina, Isopropanol, etc.

2.3.3. SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, por puentes de hidrogeno, interacciones dieléctricas o una combinación de ellas⁷. No solo la polaridad sino la suma de todas estas propiedades es la que define la afinidad de la fase móvil por un analito dado, que tendrá a su vez determinadas características dipolares, aceptara o donadoras de protones.

La magnitud de las interacciones para cada solvente esta tabulada y fue clasificado por Snyder según su selectividad (ver figura N° 5), en 8 grupos distintivos desplegados en un diagrama triangular.

2.3.4. FUERZA ELEUTRÓPICA O FUERZA COMO DISOLVENTE (E°)

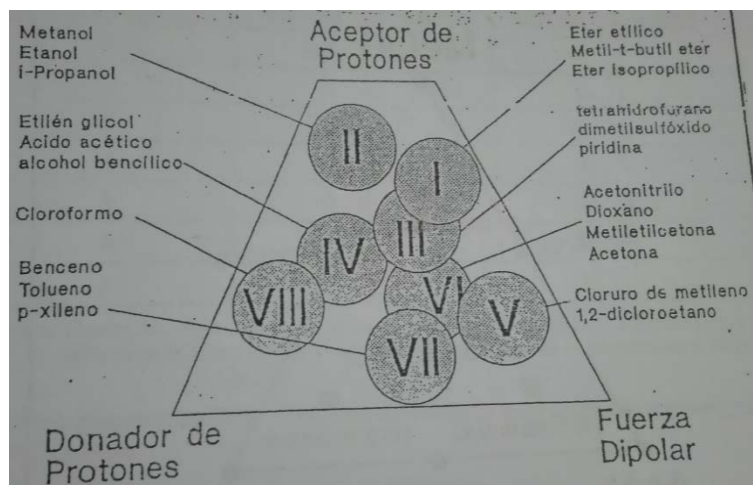
A los disolventes que interaccionan fuertemente con los solutos, a menudo se les denomina disolventes “fuertes”. Para descubrir cuantitativamente la polaridad de los disolventes se han desarrollado varios índices. El más útil en cromatografía de reparto es el “índice de polaridad”, desarrollado por Snyder. También se utilizan el parámetro de solubilidad de Hildebrand y la fuerza eluotrópica como disolvente (E°).

La magnitud de interacción de cada solvente esta tabulada y clasificada por Snyder⁸ según su selectividad en ocho grupos distintos desplegados en el diagrama triangular mostrado a continuación:

⁷Skoog D, Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid, Mc GrawHill Interamericana España S.A, (1994).

⁸Snyder, L. R. 1978. Classification of solvent properties of common liquids. Journal of Chromatographic Science, 16(6):223-234.

Figura N° 5: Triángulo de selectividad de solventes propuesto por Snyder



Fuente: Snyder R. L. Kirkland J.J. "Modern Liquid Chromatography" Wiley New York (1974)

Para conseguir un cambio efectivo en la selectividad en fase reversa una alternativa es ajustar la concentración del modificador orgánico (por ejemplo para una fase móvil agua metanol) para conseguir un factor de capacidad (K') entre 2 y 10.

Se calcula la composición de las mezclas agua-acetonitrilo, agua-tetrahidrofurano de igual fuerza de elución. Esto se consigue calculando la fuerza total de cada mezcla según Snyder:

$$\varepsilon^{\circ}_{mezcla} \times \%_{mezcla} = \varepsilon^{\circ}_1 \times \%_1 + \varepsilon^{\circ}_2 \times \%_2$$

Dónde: $\varepsilon^{\circ}_{mezcla}$ = Es la fuerza elutrópica total de la mezcla

$\%_{mezcla}$ = El porcentaje de la mezcla (100%)

ε°_1 y ε°_2 = Son las fuerzas elutrópicas de los solventes puros presentes en la fase móvil.

$\%_1$ y $\%_2$ = Es proporción en que se encuentra de cada uno de los solventes

Figura N° 6 Fuerza elutrópica de solventes en RPLC

Solvente	Fuerza de elución
Agua	0.0
Metanol	2.6
Acetonitrilo	3.2
Tetrahidrofurano	4.5

Fuente: Quattrochi, Alberto Oscar "Introducción a la HPLC Aplicación y Practica" (1992). Pag.

2.4. CALIFICACIÓN DEL EQUIPO "CLAR"

Actividad destinada a demostrar que un instrumento de medida produce resultados dentro de los límites de error establecido y comparable a los obtenidos con un sistema de referencia en un rango apropiado de medidas.

La calibración forma parte de la calificación, se aplica a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto en el ámbito modular como del sistema completo.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

Calificación de Diseño (DQ)

Calificación de la Instalación (IQ)

Calificación de la Operación (OQ)

Calificación del Desempeño (PQ)

Para realizar el análisis en HPLC se tiene que cumplir con todas estas calificaciones además de que los métodos deben estar validados. Los equipos se califican, los métodos y procesos se validan; siempre van de la mano estos dos aspectos muy importantes que exigen las normativas de las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio).

2.5. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

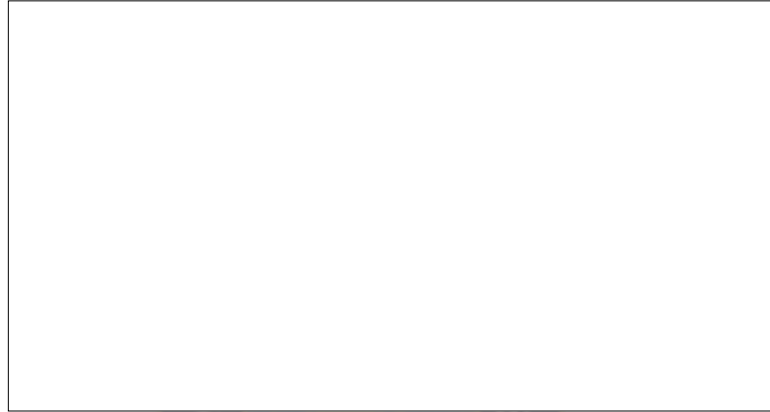
2.5.1. CROMATOGRAMA

Un cromatograma es una representación gráfica o de otro tipo de la respuesta del detector, de la concentración del o los analitos en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración en el efluente en función del volumen de este o del tiempo. En la cromatografía plana se puede usar el término, cromatograma para referirse al papel o capa con las zonas

separadas.

La Figura N° 7 presenta una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2.

Figura N° 7: Cromatograma de separación de dos analitos



Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos USP39 (versión en español) <621>Pág.495

Dónde: t_{R1} , t_{R2} son los tiempos de retención respectivos
 h es la altura de pico del analito
 $h/2$ la mitad de la altura
 $W_{h/2}$ el ancho del pico a la mitad de la altura.
 W_1 y W_2 son los anchos de los picos 1 y 2, respectivamente, en la línea base.

Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos. El tiempo de retención de estos picos de aire o componentes no retenidos se denomina (t_M)

2.5.1.1. DATOS DE UN CROMATOGRAMA

- a) **PICO:** El pico es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. El pico puede ser definido por su área, altura y ancho a la mitad de la altura, o altura y ancho en la línea de base. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto.

- b) **TIEMPO MUERTO (t_M):** El tiempo muerto es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido, también denominado frente de solvente, respuesta de la especie menos retenida, etc.
- c) **TIEMPO DE RETENCIÓN (t_R):** En cromatografía líquida y cromatografía de gases, el tiempo de retención, t_R , se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar t_R como un parámetro para identificación. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad
- d) **ÁREA:** es la cantidad de superficie cubierta bajo la curva del pico hasta la línea base, es utilizado para fines de cuantificación, representa la proporción de analito presente en la corrida cromatográfica.

2.5.1.2. CRITERIOS DE CALIDAD DE UN CROMATOGRAMA

- a) **FACTOR DE RETENCIÓN (k):** Al factor de retención también se le conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como:

$$k = \frac{\text{moles desoluto en la fase estacionaria}}{\text{moles desoluto en la fase móvil}}$$

El factor de retención de un componente se puede determinar a partir del cromatograma:

$$k = (t_R - t_M) / t_M \dots \dots \dots (\text{ec. 2.1})$$

- b) **RESOLUCIÓN (R_s):** La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla, calculada por:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2) \dots\dots (\text{ec. 2.2})$$

Donde t_{R2} y t_{R1} son los tiempos de retención de los dos componentes; y W_2 y W_1 son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea de base.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar la resolución, mediante la ecuación:

$$R_s = 1.18(t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1,h/2} + W_{2,h/2}) \dots\dots (\text{ec. 2.3})$$

c) **NUMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N):** Es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula por la ecuación:

$$N = 16 (t_R / W)^2 \dots\dots (\text{ec. 2.4})$$

En donde t_R es el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho del pico en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos del pico hasta la línea de base. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna, y, para columnas capilares, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar el número de platos teóricos por la ecuación:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \dots\dots (\text{ec. 2.5})$$

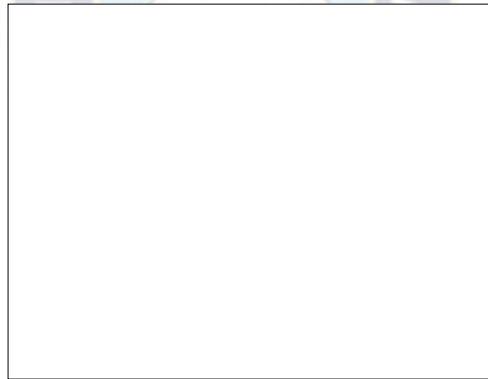
Donde $W_{h/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura. Sin embargo, en caso de discrepancias, sólo se deben usar las ecuaciones basadas en el ancho del pico en la línea base.

- d) **FACTOR DE SIMETRÍA (A_s):** El factor de simetría también conocido como factor de asimetría o factor de cola de un pico se calcula por:

$$A_s = W_{0,05}/2f \dots (\text{ec. 2.6})$$

Donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde de la línea base.

Figura N° 8: Pico cromatográfico asimétrico



Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos USP39 (versión en español) <621>Pág. 496

- e) **FACTOR DE SEPARACIÓN (α):** El factor de separación es la retención relativa calculada para dos picos adyacentes (por convención n , el valor del factor de separación siempre es >1). También conocido como selectividad se calcula mediante el cociente de los factores de capacidad de un par de picos determinados

$$\alpha = k_2/k_1 \dots (\text{ec. 2.7})$$

2.5.2. APTITUD DEL SISTEMA

“Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar.

Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal”⁹.

Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia ensayada, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil.
- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión.
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área específica.
- En fase reversa y otras modificaciones superficiales de las fases estacionarias, el grado de modificación química (según se expresa mediante recubrimiento exhaustivo (end-capping), carga de carbono, etc.)

La resolución, (R) es una función del número de platos teóricos(N), el factor de separación (α), y el factor de capacidad (k'). Para una fase móvil y una fase estacionaria determinadas, se puede especificar (N) para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre sí se resuelvan unos de otros, para establecer el poder de resolución general del sistema y/o para asegurar que el estándar interno se resuelva del fármaco.

La eficiencia de la columna (N) puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar

⁹Farmacopea de los estados Unidos USP39 (versión en español) <621>Pág. 499

componentes en baja concentración.

El factor de simetría (As), es una medición de la simetría del pico, la unidad es el valor que adquiere para picos perfectamente simétricos; y su valor se incrementa conforme la asimetría se vuelve más pronunciada (ver la Figura N° 8). En algunos casos, pueden observarse valores menores a la unidad. A medida que la simetría del pico se aleja de valores de uno, la integración y por lo tanto la precisión se tornan menos confiables.

Estas pruebas de aptitud del sistema se realizan recolectando datos a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifica en la monografía individual.

La especificación de parámetros definidos en una monografía no excluye el uso de otras condiciones de operación aptas¹⁰. No se deben realizar ajustes a los sistemas cromatográficos a fin de cumplir con los requisitos de aptitud del sistema para compensar fallas en la columna o mal funcionamiento del sistema.

No se recomienda realizar ajustes a la composición de la fase móvil en la elución en gradiente. Las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándar se comparan entre sí para determinar si se cumplen los requisitos de precisión. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa (%RSD), se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0 % o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0 %. La desviación estándar relativa (%RSD), se calcula según la fórmula siguiente:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1} \right)^{1/2} \dots\dots(\text{ec. 2.8})$$

¹⁰Farmacopea de los Estados Unidos USP39 (versión en español), <621> Pág. 500

3. CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO

3.2. EQUIPOS

- Cromatografo liquido de alta resolución HPLC Agilenttechnologies 1260 infinity, incorporado con: un software OpenLAB, detector UV-Vis DAD, inyector automático, una columna cromatográficaZORBAX Eclipse XDB C8 de 4.6 x 150 mm con un tamaño de partícula de 5 µm (ver anexo N° 4 y 3).
- Sonicador Ultrasonido RockerSone 206H
- Balanza analítica METTLER TOLEDO sensibilidad (+/-0.0001) [g]

3.2. REACTIVOS

- Metanol grado cromatográficoLiChosolv. Reag. PhEur de MerkGermany
- Acetonitrilo grado cromatograficoLiChosolv. Reag. PhEur de MerkGermany
- Agua ultra purificada grado cromatografico
- Estándares se trabajó con estándar de trabajo de metronidazol lote: MET/1602022 con una pureza R= 99.68%

3.3. PROCEDIMIENTO

a) PREPRACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se preparó a partir de un estándar de trabajo de Metronidazol, lote: MET/1602023, la cual tiene una pureza del 99.68%(ver anexo N°7). El medio en que se preparó fue en la misma fase móvil Metanol: Agua (20:80).

Se pesó 30 [mg] del estándar el cual se transfirió aun matraz aforado de 100 mL, añadiendo 50 ml de fase móvil, llevando a unbaño de ultrasonido durante 2 minutos, posteriormenteaforarlo con la misma fase móvil.De la solución anterior realizo una dilución como se muestra a continuación.

$$C \text{ estandar} = \frac{30\text{mg}}{100\text{mL}} * \frac{1\text{mL}}{10\text{mL}} = 30\text{ug/mL}$$

Antes de su lectura se hizo pasar la solución del analito por un filtro membrana 0.45 [um]

b) CONDICIONES DE SEPARACIÓN CON METANOL

El ensayo se realizó con el estándar de Metronidazol mediante 5 inyecciones repetidas, bajo las condiciones de la monografía para el análisis del Metronidazol capsulas descrita en la farmacopea USP 39.

Fase móvil: Metano y Agua (20:80)

Solución estándar: 0,03 mg/mL de Metronidazol en Fase móvil

Sistema cromatográfico

Modo: HPLC

Detector: UV 319 nm

Columna: 4,6 mm x 15 cm; relleno L7 de 5 µm

Temperatura de la columna: 30° C

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 30 µL

Requisitos de aptitud de sistema

Factor de asimetría: No más de 2,0

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% en 5 inyecciones repetidas

c) DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ACETONILO REQUERIDO

Se realizaron corridas cromatograficas cambiando proporcionalmente el porcentaje del componente orgánico de la fase móvil Acetonitrilo, bajo los mismos parámetros del anterior ensayo donde solo se modificó la fase móvil.

Para lo cual se modificó la fase móvil de la siguiente manera:

Tabla N° 1 Proporción de Acetonitrilo: Agua en la fase móvil

	ACETONITRILO	H2O
1	15	85
2	20	80
3	30	70
5	40	60
6	50	50

Fuente: Elaboración propia

Con el cual se realizó la gráfica o curva de tiempo de retención versus porcentaje de Acetonitrilo en la fase móvil.

Posteriormente mediante fuerzas elutrópicas de los disolventes se calcula el porcentaje de Acetonitrilo que deberíamos usar para obtener la misma fuerza elutrópica de la anterior fase móvil.

d) CONDICIONES DE SEPARACIÓN CON ACETONITRILO

En base a los resultados del anterior ensayo se realiza el ensayo de aptitud del sistema con las condiciones propuestas. Donde solo se cambia el Metanol por Acetonitrilo bajo las siguientes condiciones:

Fase móvil: Acetonitrilo y Agua (11.9:88.1)

Solución estándar: 0,03 mg/mL de Metronidazol en Fase móvil

Sistema cromatográfico

Modo: HPLC

Detector: UV 319 nm

Columna: 4,6 mm x 15 cm; relleno L7 de 5 μ m

Temperatura de la columna: 30° C

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 30 μ L

Requisitos de aptitud de sistema

Factor de asimetría: No más de 2,0

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% en 5 inyecciones repetidas

Donde solo se cambia el solvente orgánico y su proporción en la fase móvil original.

e) TRATAMIENTO DE DATOS PARA EL ENSAYO DE APTITUD DEL SISTEMA

Una vez realizado los ensayos se imprimieron la evidencia física como son los cronogramas (Ver Anexo 1 y 2), los cuales nos muestran los datos primarios para el tratamiento estadístico en Excel utilizando las siguientes formulas (ver tabla N° 2)

Tabla N° 2 Criterios de calidad de un cromatograma

Coficiente de variación (CV) o Desviación estándar Relativa (%RSD)	$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right)^{1/2}$
Factor de capacidad (k')	$k = (t_R - t_M)/t_M$
Numero de platos teóricos (N)	$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$
Factor de asimetría (As)	$As = W_{0,05}/2f$

Fuente: Elaboración propia

4. CAPITULO IV RESULTADOS

4.1. RESULTADOS

4.1.1. CONDICIONES DE SEPARACIÓN CON METANOL

En la tabla N° 3 se puede evidenciar el ensayo de aptitud del sistema del ensayo con Metanol, en la parte superior se encuentra las condiciones cromatograficas con las que se trabajó, posteriormente se detalla los datos primarios obtenidos del cromatograma correspondiente (Area, tiempo de retención y ancho de base al 50%) del analito metronidazol y su tiempo muerto, En el lado derecho se encuentra los datos de factor de capacidad (k'), numero de platos teóricos (N) y Factor de asimetría (As); los cuales fueron calculados por el Excel con las formulas anteriormente mencionadas (ver tabla N° 2).

Dando como resultado de un promedio de 5 datos los siguientes valores:

CV= 0.476 del área del analito (Metronidazol)

$K' = 2.772$ del Metronidazol

N= 4371.94 del Metronidazol

As= 0.228 del Metronidazol

Comparando estos resultados con lo especificado en la farmacopea

Requisitos de aptitud de sistema

Factor de asimetría: No más de 2,0

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% en 5 inyecciones repetidas

Se evidenció que cumple el ensayo de aptitud del sistema

La farmacopea no especifica requisitos de número de platos teóricos (N), ni factor de capacidad (k'). Por lo cual para el ensayo se adopta las especificaciones generales que debe cumplir un cromatograma de calidad las cuales que son: $N > 2000$ y $k' > 2$. Nuestro ensayo también cumple con estos dos parámetros de calidad.

Tabla N° 3 Resultados de la separación con Metanol

ENSAYO DE APTITUD DEL SISTEMA PARA METRONIDAZOL CPS.					
CONDICIONES DEL METODO ANALITICO					
MODO		HPLC			
LONGITUD DE ONDA		319 nm			
COLUMNA		4,6mm*15cm* 5um			
VOLUMEN DE INYECCION		30uL			
VELOCIDAD DE FLUJO		1mL/min			
TEMPERATURA		30° C			
FASE MOVIL		MET:H2O(20:80)			
	To	METRONID	K METRO	N METRO	As METRO
AREA 1	0,197	8354,109	2,77	4080,09	0,260
AREA 2	0,347	8328,931	2,77	4756,68	0,270
AREA 3	0,489	8313,271	2,80	4804,60	0,270,
AREA 4	0,306	8330,837	2,76	4388,49	0,260
AREA 5	0,152	8414,369	2,75	3825,60	0,330
PROMEDIO	0,298	8348,303	2,772	4371,094	0,280
S (Ds)	0,133	39,705	0,020	424,013	0,034
CV (r)	44,628	0,476	0,734	9,700	12,023
CRITERIO DE ACEPTACION		< 2%	2	2000	2
CONCLUSION		SIST APTO	K ADECUA	N EFICIENT	As ADECUA
t r1	1,088	4,106			
t r2	1,092	4,114			
t r3	1,082	4,117			
t r4	1,093	4,112			
t r5	1,088	4,081			
PROMEDIO	1,089	4,106			
S (Ds)	0,004	0,015			
CV (r)	0,398	0,354			
W (50%)1	0,105	0,151			
W (50%)2	0,085	0,140			
W (50%)3	0,097	0,140			
W (50%)4	0,122	0,146			
W (50%)5	0,099	0,155			
PROMEDIO	0,102	0,147			
S (Ds)	0,013	0,007			
CV (r)	13,229	4,611			

Fuente: Elaboración propia

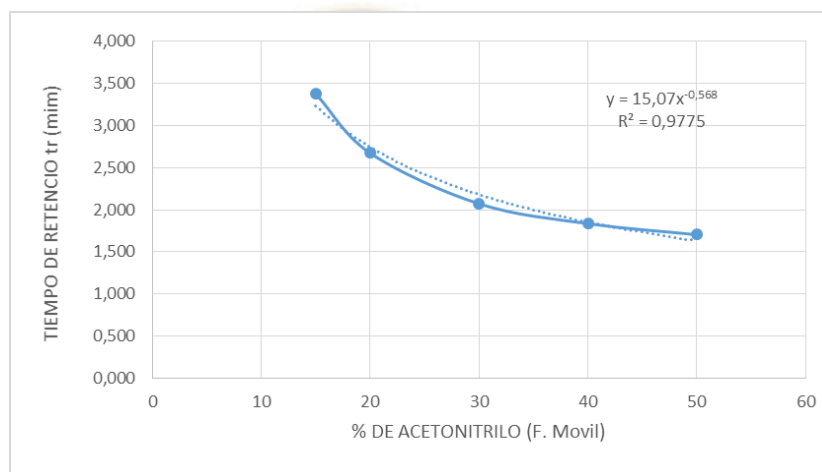
Los cromatogramas correspondientes a este ensayo se adjuntando en anexos (ver anexos 1).

a) DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ACETONITRILLO REQUERIDO

Se armó una curva de tiempo de retención versus porcentaje de Acetonitrilo con las mismas condiciones cromatograficas, cambiando simplemente el % de Acetonitrilo de manera creciente.

El cual se muestra en la siguiente grafíaca:

Grafica N° 1 % Acetonitrilo Vs Tiempo de retención



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico se puede apreciar que a medida que incrementamos el porcentaje de Acetonitrilo, el tiempo de retención se reduce considerablemente. El cual se ajusta a una curva de función potencial como se muestra en el gráfico N° 1.

Esta grafica nos sirvió para definir nuestro % de Acetonitrilo con el cual podemos para eluir al analito en 4.106 minutos, tiempo de retención de la corrida con metanol q en las condiciones originales de su aptitud del sistema (ver tabla N° 3).

De la ecuación potencial $Y=AX^B$ donde: $A= 15.07$; $B= -0.568$; despejamos X que es la variable independiente y representa al % de Acetonitrilo

Dando como resultado **X= 9.9 % de Acetonitrilo** el cual con un coeficiente de variación ($r = 0.989$) nos indica el que la proporción de Acetonitrilo requerido es 9.9%.

También mediante la fórmula de fuerzas eutrópicas

$$\varepsilon_{mezcla}^0 \times \%_{mezcla} = \varepsilon_1^0 \times \%_1 + \varepsilon_2^0 \times \%_2$$

Calculamos la fuerza eutrópica de la fase móvil inicial Metanol: Agua (20:80)

$$E^{\circ} \text{ mezcla} \times \% \text{ mezcla} = (E^{\circ} \text{ metanol} \times \% \text{ metanol}) + (E^{\circ} \text{ agua} \times \% \text{ agua})$$

$$E^{\circ} \text{ mezcla} = \frac{2.6 \times 20\% + 0.0 \times 80\%}{100\%} = 0.52$$

Dando como resultado $E^{\circ} \text{ mezcla} = 0.52$,

Posteriormente se calcula el % de Acetonitrilo requerido para la nueva fase móvil

$$E^{\circ} \text{ mezcla} \times \% \text{ mezcla} = (E^{\circ} \text{ acetonitrilo} \times \% \text{ acetonitrilo}) + (E^{\circ} \text{ agua} \times \% \text{ agua})$$

$$E^{\circ} \text{ mezcla} = \frac{2.6 \times 20\% + 0.0 \times 80\%}{100\%} = 0.52$$

$$\% \text{ Acetonitrilo} = \frac{0.52 \times 100\%}{3.2} = 16.25$$

Dando como resultado que se requiere **16.2 % de Acetonitrilo**

En base a estos dos resultados que nos indican que el % de Acetonitrilo a utilizar es inferior al del metanol, se realiza experimentalmente el ensayo de aptitud del sistema dando como resultado una fase móvil Acetonitrilo:Agua (11.9:88.1), la cual de aptitud del sistema descrito en la farmacopea USP39.

b) CONDICIONES DE SEPARACIÓN CON ACETONITRILLO

En la tabla N° 4 se puede evidenciar el ensayo de aptitud del sistema Acetonitrilo, en la parte superior se encuentra las condiciones cromatografías con las que se trabajó, posteriormente se detalla los datos primarios obtenidos del cromatograma correspondiente (Area, tiempo de retención y ancho de base al 50%) del analito Metronidazol y su tiempo muerto, en el lado derecho se encuentra los datos de factor de capacidad (k'), número de platos teóricos (N) y Factor de asimetría (As); los cuales fueron calculados por el Excel con las formulas anteriormente mencionadas (ver tabla N° 2).

Dando como resultado de un promedio de 5 datos los siguientes valores:

CV= 0.125 del área del analito (Metronidazol)

$K' = 2.899$ del Metronidazol

N = 3975.407 del Metronidazol

As = 0.340 del Metronidazol

tr = 4.066 [min]

Comparando estos resultados con datos obtenidos con metanol

CV= 0.476 del área del analito (Metronidazol)

$K' = 2.772$ del Metronidazol

N = 4371.94 del Metronidazol

As = 0.228 del Metronidazol

tr = 4.103[min]

Tienen valores similares en cada uno de sus parámetros, los cuales no son iguales, pero ambos cumplen con el ensayo de aptitud del sistema y criterios de calidad de un cromatograma.

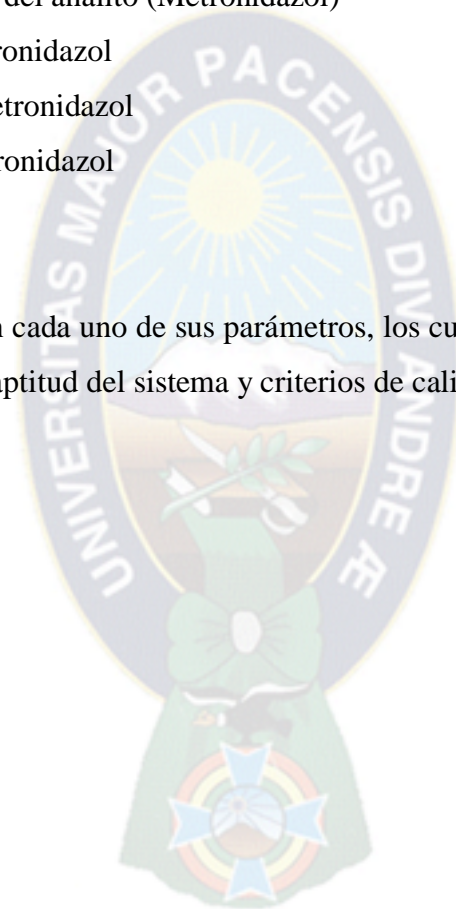


Tabla N° 4 Resultados de la separación con Acetonitrilo

ENSAYO DE APTITUD DEL SISTEMA PARA METRONIDAZOL CPS.					
CONDICIONES DEL METODO ANALITICO					
MODO		HPLC			
LONGITUD DE ONDA		319 nm			
COLUMNA		4,6mm*15cm* 5um			
VOLUMEN DE INYECCION		30uL			
VELOCIDAD DE FLUJO		1mL/min			
TEMPERATURA		30 C			
FASE MOVIL		ACN:H2O (11,9:88,1)			
	To	METRONIDAZOL	K METRO	N METRO	As METRO
AREA 1	0,129	8430,900	2,842	4092,998	0,340
AREA 2	0,212	8434,180	2,846	4033,504	0,340
AREA 3	0,155	8428,450	2,875	4001,597	0,340
AREA 4	0,186	8409,963	2,840	3934,350	0,340
AREA 5	0,143	8415,400	2,839	3814,588	0,340
PROMEDIO	0,165	8423,779	2,849	3975,407	0,340
S (Ds)	0,033	10,509	0,015	106,580	0,000
CV (DSR%)	20,189	0,125	0,531	2,681	0,000
CRITERIO DE	< 2%	< 2%	2	2000,000	2
CONCLUSION	ST. NO APT	SIST APTO	K ADECUA	N EFICIENTE	As ADECUA
tr1	1,059	4,069			
tr2	1,058	4,069			
tr3	1,050	4,069			
tr4	1,050	4,032			
tr5	1,058	4,062			
PROMEDIO	1,055	4,060			
S (Ds)	0,005	0,016			
CV (DSR%)	0,434	0,395			
W (50%)1	0,106	0,150			
W (50%)2	0,123	0,151			
W (50%)3	0,116	0,151			
W (50%)4	0,128	0,151			
W (50%)5	0,099	0,155			
PROMEDIO	0,115	0,152			
S (Ds)	0,012	0,002			
CV (DSR%)	10,449	1,261			

Fuente: Elaboración propia

Los cromatogramas correspondientes se adjuntando en anexos (ver anexo N° 2)

4.2. CONCLUSIONES

La verificación del ensayo de aptitud del sistema con Metanol, para el análisis del Metronidazol capsulas cumple con las condiciones establecidas en la farmacopea USP39. Dando como resultado un sistema apto para continuar con el análisis pertinente.

La determinación del porcentaje de Acetonitrilo fue realizado con los resultados obtenidos mediante la gráfica de % Acetonitrilo versus tiempo de retención y del cálculo de fuerzas elutricas, los cuales nos dieron las bases para encontrar % de Acetonitrilo practico a utilizar para que se mantenga las condiciones cromatográficas establecidas en la Farmacopea USP39. Así concluyendo que la proporción práctica de la fase móvil es Acetonitrilo:Agua en una proporción de (11.9:88.1).

El ensayo de aptitud del sistema con Acetonitrilo cumple con lo establecido USP39 dando como resultado un sistema apto para el análisis del Metronidazol capsulas.

Con las pruebas realizadas se concluye que es el cambio de Metanol por Acetonitrilo para el análisis de Metronidazol capsulas es factible; por que cumple los criterios de calidad y el ensayo de aptitud del sistema.

4.3. RECOMENDACIONES

Cabe recomendar que el comportamiento es distinto para cada analito, debiendo realizar esta prueba o ensayos de manera específica para cada analito al que se le quiera realizar algún cambio en la fase móvil ya que el comportamiento y la estructura de los analitos no son iguales.

Las propiedades de fuerzas elutricas es más aplicado en corridas isocráticas y no así para corridas en gradiente donde es más dificultoso el cambio de solvente.

5. BIBLIOGRAFÍA

- http://www.sanderkok.com/techniques/hplc/eluotropic_series_extended.html.
- <http://www.cienytech.com/tablas/Tabla-miscibilidades-cruzada.pdf>.
- <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>
- Farmacopea de los estados Unidos USP39 (versión en español), <621> Pág. 495-500; 2245
- Quattrochi, Alberto Oscar “Introducción a la HPLC Aplicación y Practica” (1992)
- Snyder R. L. KirKland J.J. “Modern Liquid Chromatography” Wiley New York (1974) of Chromatographic Science1 Pág.223-234.
- Skoog D, Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid, Mc GrawHill InteramericanaEspaña S.A, (1994).
- Unidad de Medicamentos y Tecnología en Salud “Política nacional de medicamentos” (1996) Pag.7

ANEXOS



Anexo N° 1 Cromatogramas del análisis con Metanol

Performance Report

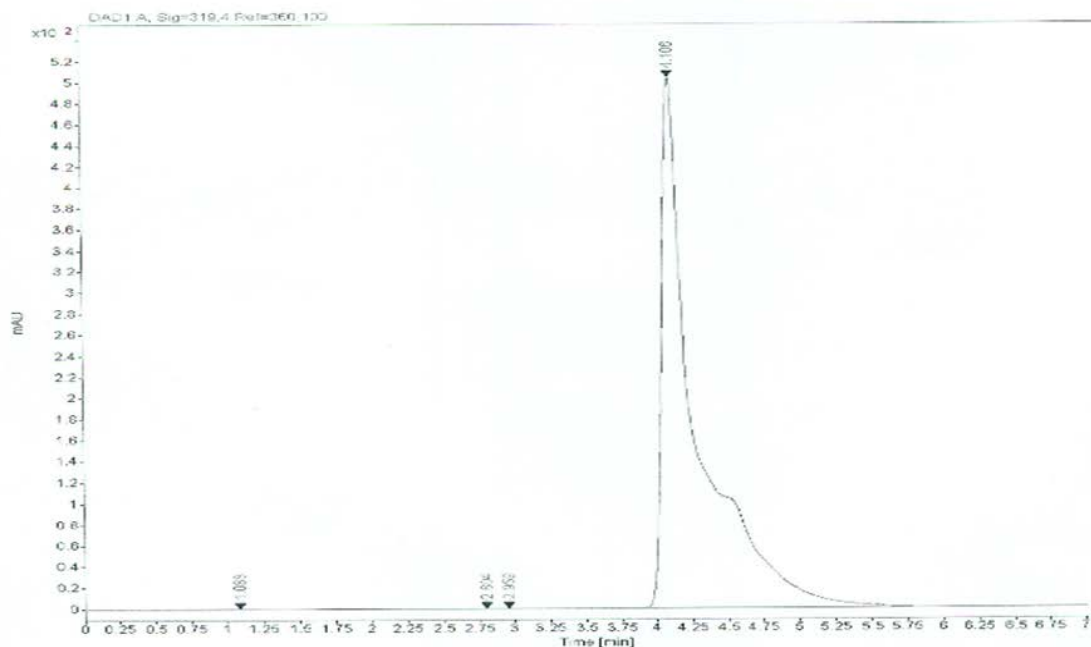


Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI.S\METRONI 2016-11-14 18-25-29\PRUEB2-005.D
Sample name: ESTANDAR
Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-18080803
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 2
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 **Sample type:** Unspecified

Instrument: HPLC 1260 **Location:** 61
Injection date: 11/14/2016 7:05:04 PM **Injection:** 5 of 6
Acq. method: METRONI.M **Injection volume:** 10.000
Analysis method: METRONI.M **Acq. operator:** Edyverto Choque
Last changed: 11/15/2016 6:57:55 PM (modified after loading)

Column name:
Serial #:
Diameter: **Length:**
Dead volume: **# Injections:**



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.088		0.19650	0.02296	0.27	0.1053	589		
2.804		0.14206	0.02282	1.17	0.1087	3694	9.46	2.58
2.959		0.36379	0.04601	0.59	0.1111	3929	0.84	1.06
4.106		8354.10938	504.62817	0.26	0.1513	4078	5.16	1.39

Performance Report

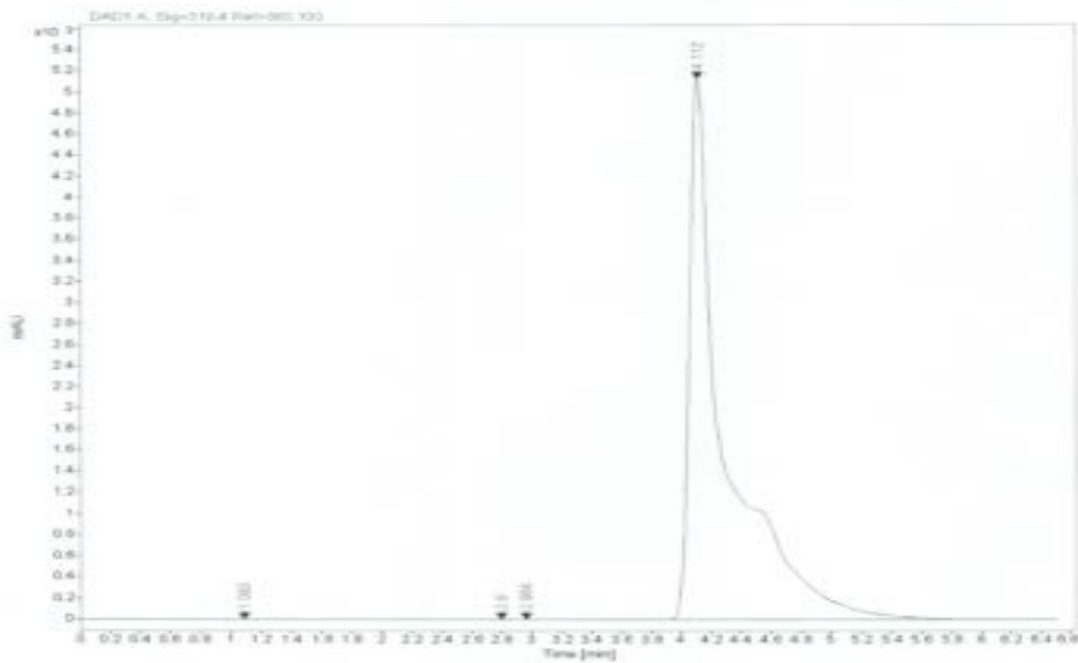


Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI.S\METRONI 2016-11-14 15-25-29\PRUEB2--005.D
 Sample name: ESTANDAR
 Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16060803
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 2
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260 Location: 61
 Injection date: 11/14/2016 7:13:41 PM Injection: 6 of 6
 Acq. method: METRONI.M Injection volume: 10.000
 Analysis method: METRONI.M Acq. operator: Edyverto Choque
 Last changed: 11/15/2016 6:57:55 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name: Length:
 Serial #: # Injections:
 Diameter:
 Dead volume:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319.4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.093		0.30560	0.02967	0.36	0.1217	440		
2.800		0.15968	0.02754	0.97	0.1103	3573	8.68	2.96
2.964		0.58544	0.05440	0.47	0.1240	3181	0.83	1.06
4.112		8330.83691	513.40607	0.26	0.1461	4398	5.02	1.39

Performance Report

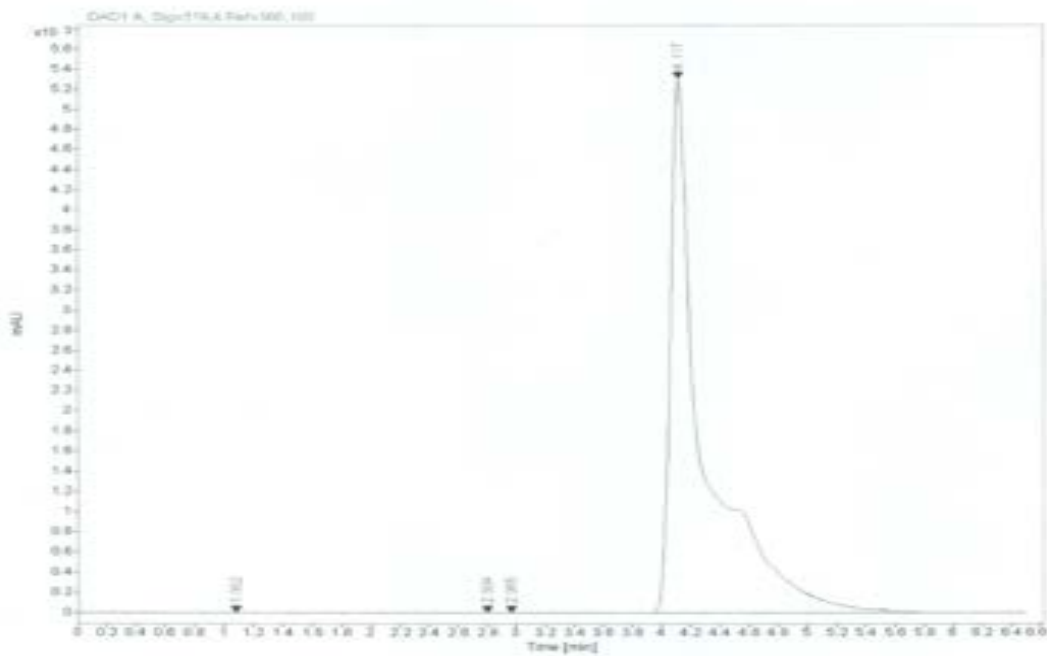


Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI.S\METRONI_2016-11-14_18-25-29\PRUEBA2--007.D
 Sample name: ESTANDAR
 Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16080503
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 2
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260 Location: 2
 Injection date: 11/14/2016 7:21:49 PM Injection: 1 of 1
 Acq. method: METRONI.M Injection volume: 10.000
 Analysis method: METRONI.M Acq. operator: Edyverto Choque
 Last changed: 11/15/2016 6:57:55 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name:
 Serial #:
 Diameter:
 Dead volume:
 Length:
 # Injections:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.082		0.48917	0.03651	0.39	0.0967	657		
2.804		0.14851	0.02353	1.00	0.1107	3556	9.80	2.59
2.995		0.51370	0.05265	0.42	0.1111	3942	0.65	1.05
4.117		8313.27051	530.87915	0.27	0.1398	4806	5.42	1.39

Performance Report

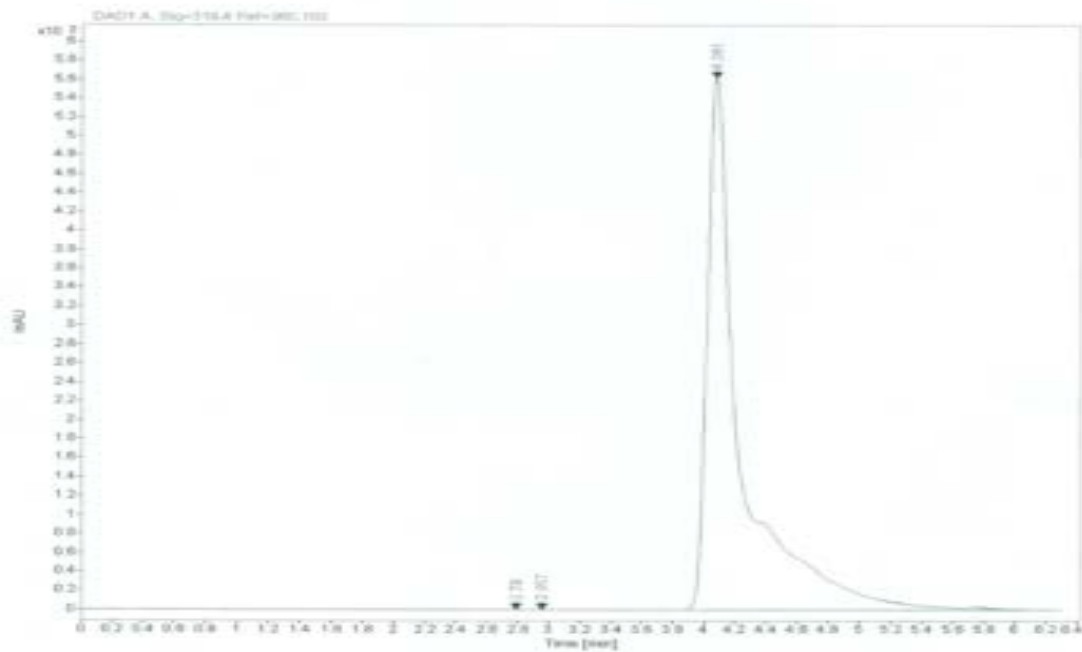


Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEBA2-009.D
 Sample name: ESTANDAR
 Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16060603
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 2
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260 Location: 61
 Injection date: 11/15/2016 8:04:34 PM Injection: 1 of 1
 Acq. method: METRONI.M Injection volume: 10.000
 Analysis method: METRONI.M Acq. operator: Edyberto Choque
 Last changed: 11/15/2016 7:45:00 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name: Length: # Injections: Diameter: Dead volume:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319.4 Ref=360,100

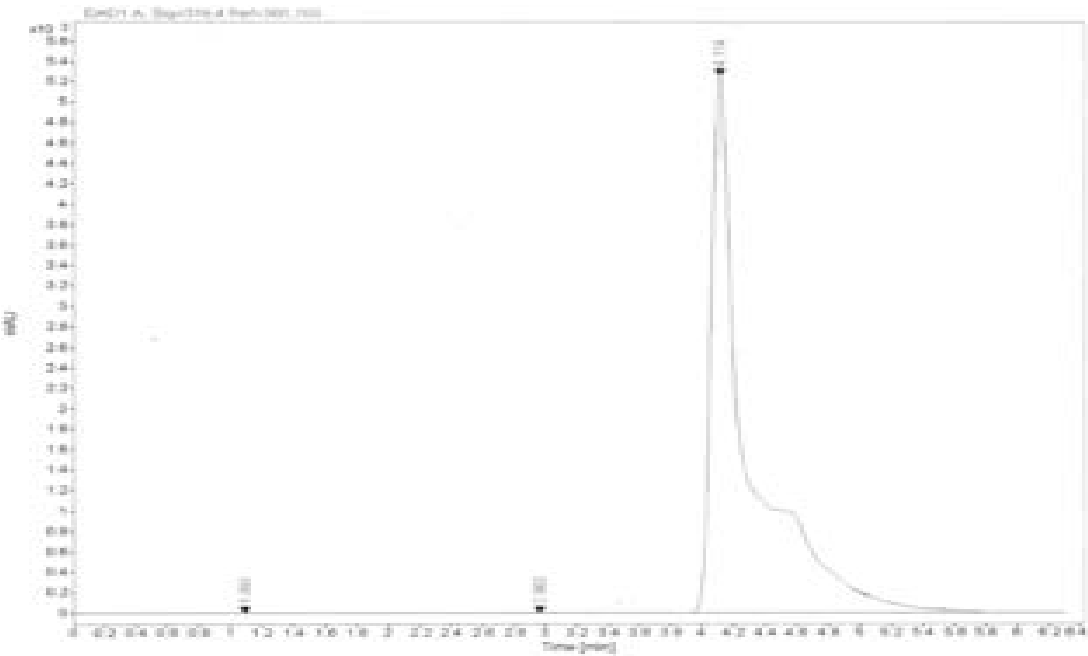
RT [min]	N	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
2.790		0.15181	0.02524	1.06	0.0993	4370		
2.957		0.28793	0.03608	0.75	0.1111	3923	0.83	1.06
4.081		8414.36914	562.12140	0.33	0.1553	3817	4.98	1.38

Performance Report



Data file: C:\CHEM32\DATA\METRONL\M\METRONL 2016-11-14 16:25:26\PRUEBA 2-006.D
Sample name/Description: ESTANDAR
 PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16090603
 ANALISIS: 201716 PRUEBA 2
 FOR:733601
Sample amount: 0.000 **Sample type:** Unspecified
Instrument: HPLC 1260 **Location:** B1
Injection date: 11/14/2016 7:29:56 PM **Injection:** 1 of 2
Acq. method: METRONLM **Injection volume:** 10.000
Analysis method: METRONLM **Acq. operator:** Edyvert Choque
Last changed: 11/15/2016 6:57:55 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name:
Serial #:
Diameter:
Dead volume: **Length:**
Injections:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319.4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.092		0.34684	0.02791	0.28	0.0850	917		
2.962		0.32931	0.04345	0.57	0.1000	4854	11.93	2.71
4.114		8328.93068	528.63019	0.27	0.1404	4752	5.65	1.39

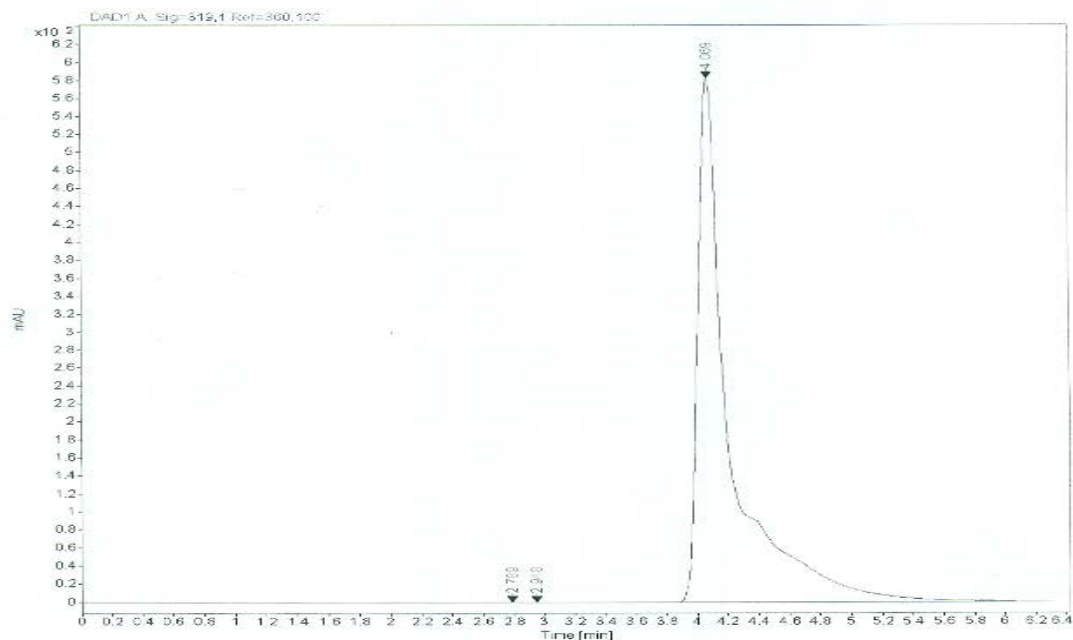
Anexo N° 2 Cromatogramas del análisis con Acetonitrilo

Performance Report



Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEB3--002.D
Sample name: ESTANDAR
Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16060803
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 3
 H2O: ACN (89:11)
 FOR: 733801
Sample amount: 0.000
Sample type: Unspecified
Instrument: HPLC 1260
Injection date: 11/15/2016 7:24:50 PM
Acq. method: METRONI.M
Analysis method: METRONI.M
Last changed: 11/15/2016 6:57:55 PM (modified after loading)
Location: 61
Injection: 2 of 6
Injection volume: 10.000
Acq. operator: Edyverto Choque

Column name:
Serial #:
Diameter:
Dead volume:
Length:
Injections:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

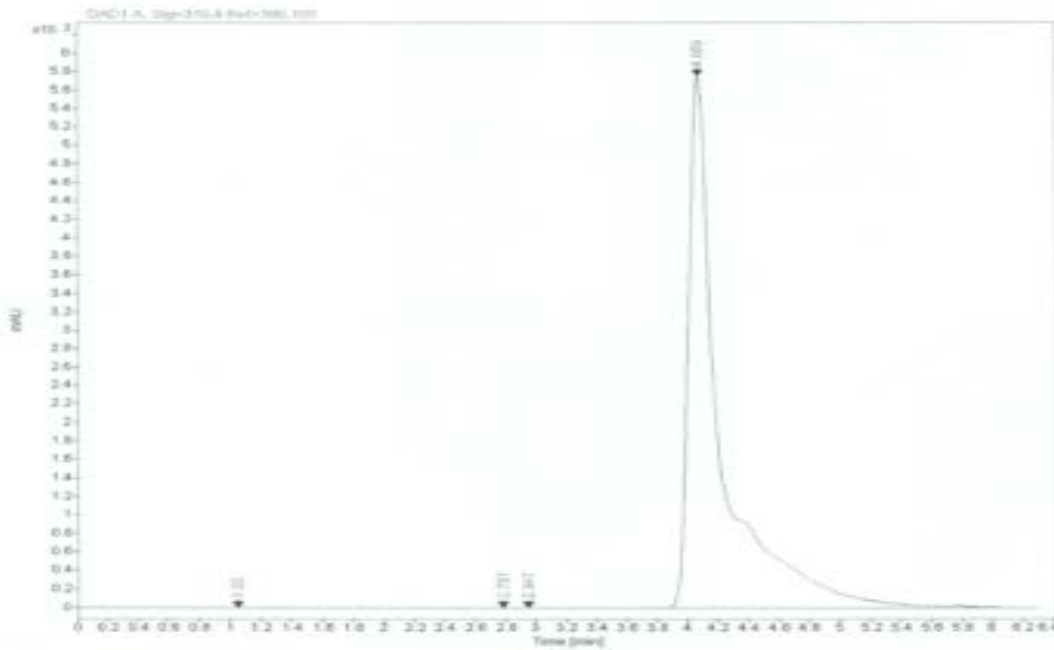
RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
2.789		0.12938	0.02264	0.91	0.1060	3842		
2.948		0.43341	0.04350	0.46	0.1280	2932	0.80	1.06
4.069		8430.90039	583.99799	0.34	0.1497	4099	4.77	1.38

Performance Report



Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEBA3-004.D
Sample name: ESTANDAR
Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-18060803
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 3
 H2O: ACN (89:11)
 FOR:733801
Sample amount: 0.000 **Sample type:** Unspecified
Instrument: HPLC 1260 **Location:** 61
Injection date: 11/15/2016 7:40:43 PM **Injection:** 4 of 6
Acq. method: METRONI.M **Injection volume:** 10.000
Analysis method: METRONI.M **Acq. operator:** Edyverto Choque
Last changed: 11/15/2016 7:45:00 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name:
Serial #:
Diameter: **Length:**
Dead volume: **# Injections:**



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.050		0.15508	0.01825	0.41	0.1160	454		
2.781		0.13611	0.02328	0.94	0.1000	4204	9.48	2.85
2.947		0.32837	0.04311	0.62	0.1019	4624	0.97	1.06
4.069		8428.45020	576.15320	0.34	0.1514	4008	5.23	1.38

Performance Report



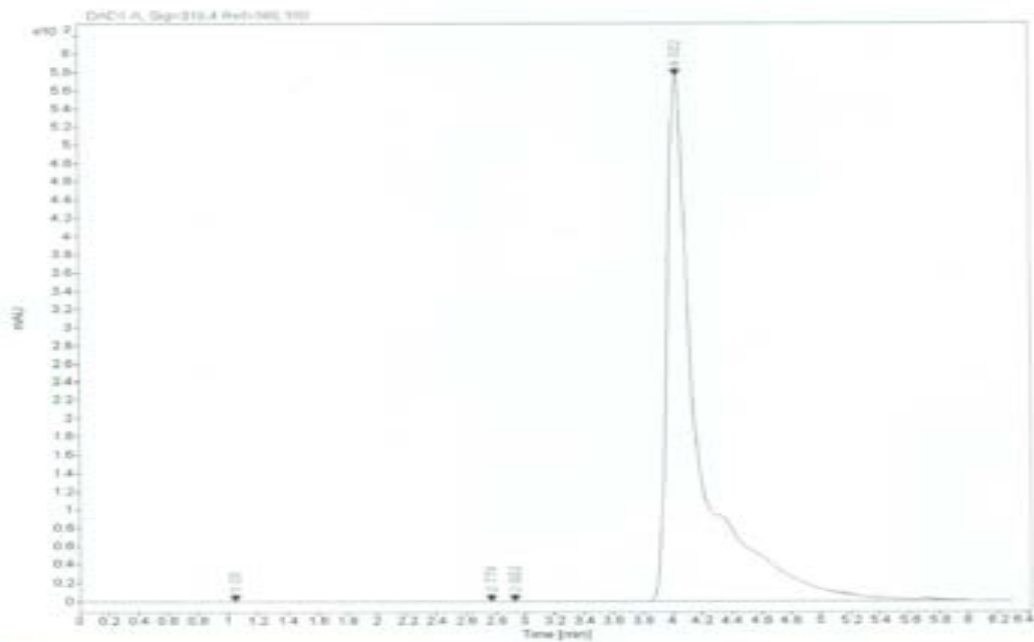
Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEBA3-005.D
 Sample name: ESTANDAR
 Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16060803
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 3
 H2O: ACN (89:11)
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260 Location: 61
 Injection date: 11/15/2016 7:48:41 PM Injection: 5 of 6
 Acq. method: METRONI.M Injection volume: 10.000
 Analysis method: METRONI.M Acq. operator: Edyverto Choque
 Last changed: 11/15/2016 7:45:00 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name:
 Serial #:
 Diameter:
 Dead volume:

Length:
 # Injections:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.050		0.18599	0.01763	0.69	0.1263	367		
2.774		0.13083	0.02215	1.11	0.1093	3560	8.56	2.64
2.932		0.32572	0.04057	0.65	0.1189	3369	0.82	1.06
4.032		8409.90289	575.86815	0.34	0.1513	3933	4.80	1.38

Performance Report

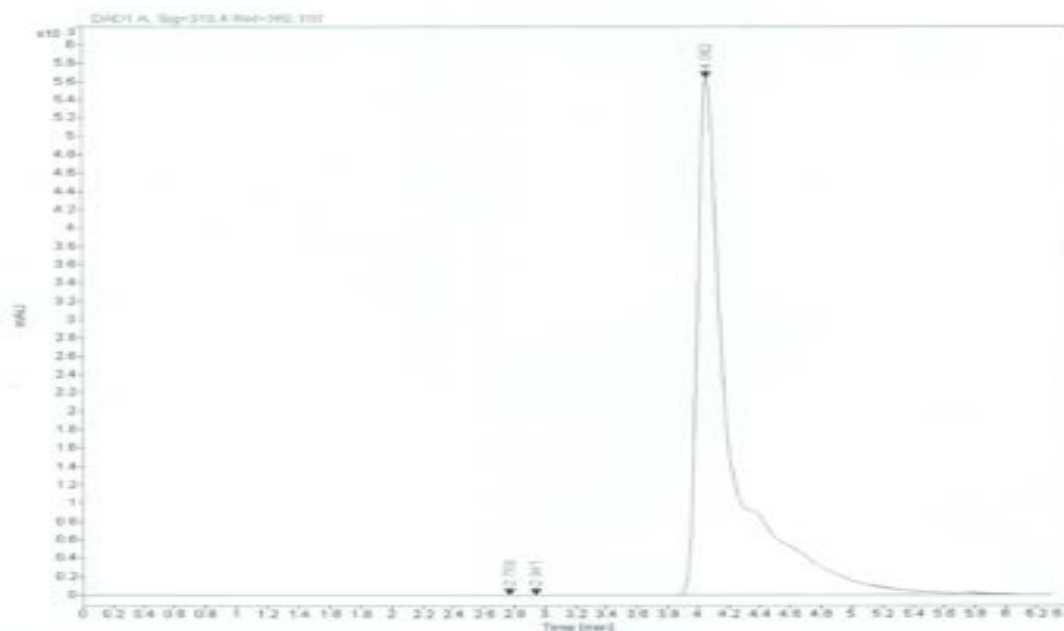


Data file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEB3-006.D
 Sample name: ESTANDAR
 Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-15060603
 ANALISIS: 20/1/16 PRUEBA 3
 H2O: ACN (89:11)
 FOR:733801

Sample amount: 0.000 Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260 Location: 61
 Injection date: 11/15/2016 7:56:38 PM Injection: 6 of 6
 Acq. method: METRONI.M Injection volume: 10.000
 Analysis method: METRONI.M Acq. operator: Edyverto Choque
 Last changed: 11/15/2016 7:45:00 PM
 (modified after loading) (Current integration events modified)

Column name: Length:
 Serial #: # Injections:
 Diameter:
 Dead volume:



Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Symm.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
2.768		0.14338	0.02410	1.02	0.0003	4394		
2.941		0.20299	0.03979	0.83	0.1166	3591	0.95	1.06
4.002		6415.40039	563.60811	0.34	0.1546	3814	4.89	1.38

Performance Report



Date file: C:\CHEM32\1\DATA\METRONI2.S\METRONI2 2016-11-15 19-15-00\PRUEBA3-003.D
Sample name: ESTANDAR
Description: PRODUCTO: METRONIDAZOL
 LOTE: W-16060903
 ANALISIS: 201/16 PRUEBA 3
 H2O: ACN (89:11)
 FOR: 733801

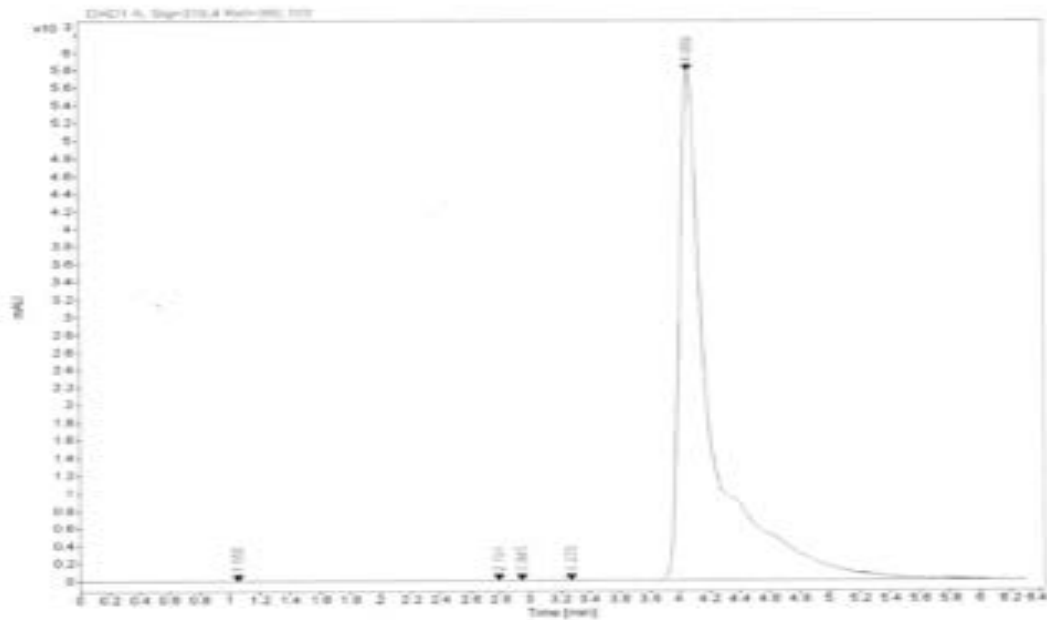
Sample amount: 0.000
Sample type: Unspecified

Instrument: HPLC 1260
Injection date: 11/15/2016 7:32:47 PM
Acq. method: METRONI.M
Analysis method: METRONI.M
Last changed: 11/15/2016 7:45:00 PM (modified after loading)

Location: 61
Injection: 3 of 6
Injection volume: 10.000
Acq. operator: Eddyberto Choque

Column name:
Serial #:
Diameter: +
Dead volume:

Length:
Injections:



Performance.rtf [Rev. 1]

Printed: 11/15/2016 7:48:03 PM

Page 1 of 2

Performance Report



Signal: DAD1 A, Sig=319,4 Ref=360,100

RT [min]	k'	Area	Height	Sym.	Width (50%)	Plates	Resolution	Selectivity
1.058		0.21156	0.01772	0.78	0.1233	411		
2.791		0.15334	0.02339	1.23	0.1241	2799	8.27	2.84
2.945		0.41330	0.04478	0.91	0.1208	3299	0.74	1.06
3.278		0.14000	0.01595	0.91	0.1444	2849	1.48	1.11
4.069		8434.17960	579.84912	0.34	0.1508	4032	3.16	1.24

Anexo N° 3 Equipo de “CLAR” con el cual se realizó el trabajo



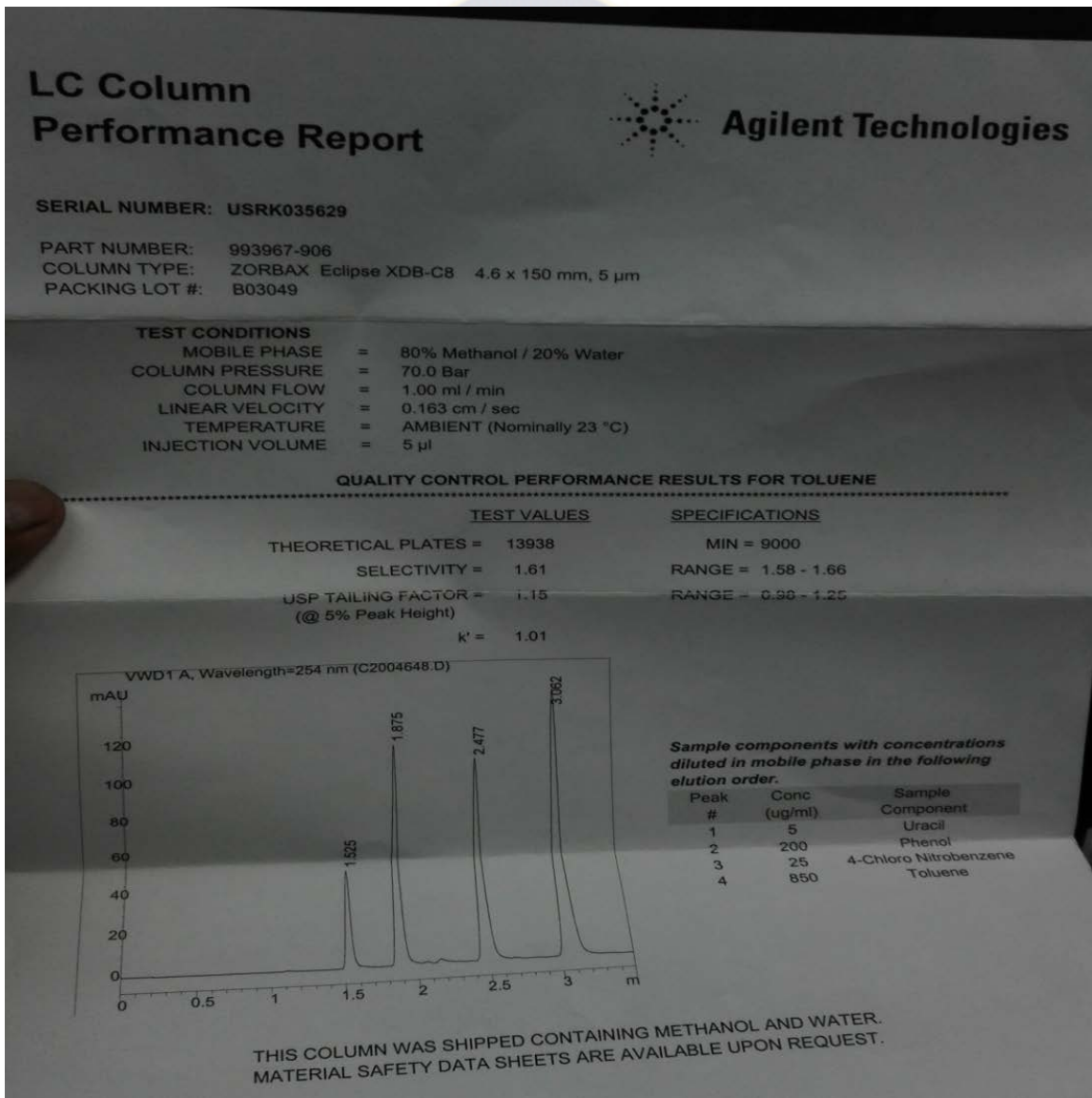
Anexo N° 4 Evidencia de la calificación del equipo



Anexo N° 5 columna y precolumna con la que se trabajo



Anexo N° 6 Certificado de análisis de la columna con que se trabajó.



Anexo N° 7 Certificado de análisis del estándar utilizado

HUANGGANG YINHE AARTI PHARMACEUTICAL CO.,LTD.
 湖北省黄冈市黄州大道100号
 NO.100, HUANGZHOU ROAD, HUANGGANG, HUBEI, CHINA.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

质检专用章

品名 Name of product:		批重量 Batch weight:	300kgs
批号 Batch Number:	W-16060803	包装规格 Packing in:	25kg/drum
生产日期 Manufacturing Date:	JUN.08,2016 ✓	报告日期 Report Date:	JUN.09,2016
保质期 Expiry Date:	JUN.07,2020 ✓	储存条件 Storage:	Store in a well-closed container, protected from light

分析结果
 RESULT OF ANALYSIS

项目 ITEMS	标准 STANDARDS	结果 (RESULTS)
外观 Appearance	White or yellowish, crystalline powder	COMPLY
溶解度 Solubility	Slightly soluble in water, in acetone, in alcohol and in methylene chloride	COMPLY
鉴别 Identification	First Identification: C Second Identification: A, B, D a) Between 159°C to 163°C b) The specific absorbance at the maximum is 365 to 395. c) Comparison Metronidazole CRS. d) The solution gives the reaction of primary aromatic amines.	a) 160.8-161.3°C b) 380 c) COMPLY d) COMPLY
溶液澄清度与颜色 Appearance of solution	SUSPENSION II AND SOLUTION GY6	COMPLY
相关物质 Related Substances	单一杂质 Any individual impurity	0.1% MAX
	总杂质 Total impurities	0.2% MAX
重金属 Heavy Metals	20PPM MAX	<20PPM
残留溶剂 Residual solvents	Methylene oxide (LOD 0.15ppm) Formic acid (LOD 124ppm)	Not detected Not detected
干燥失重 Loss on drying	0.5% MAX	0.15%
硫酸盐灰分 Sulphated ash	0.1% MAX	0.05%
含量 Assay	99.0%-101.0% C ₆ H ₉ N ₃ O ₃ (On dried basis).	99.68% C ₆ H ₉ N ₃ O ₃
结论 Conclusion	Comply with the requirement of EP6 standard. (化验) Inspector: 01	