

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**  
**ESCUELA DE POSGRADO**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA VERDE PARA  
LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM EN TABLETAS MEDIANTE  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO PERFORMANCE**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN  
QUÍMICA**

**AUTOR**

Gustavo Adolfo Ruiz Pacco

**ASESORA**

Emma Patricia Morales Bueno

San Miguel, 2019

## RESUMEN

En el presente estudio se diseñó una metodología analítica rápida y ecoamigable para la cuantificación de diazepam en tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) basada en el criterio de reemplazo de solventes peligrosos y optimización de los parámetros cromatográficos. La fase móvil resultante está constituida por una mezcla de etanol-agua (70 : 30), la velocidad de flujo de 1 mL/min, longitud de onda de detección de 254 nm y temperatura de horno de 60 °C; la fase estacionaria está compuesta por un soporte de octadecil silano (C18) de 5 µm de diámetro y 250 mm de longitud de columna. El tiempo de retención del diazepam es de 2,96 minutos y el tiempo de corrida por muestra es de 5 minutos. De acuerdo a los parámetros de validación aplicados, el intervalo de concentración para la detección de este analito se encuentra en el rango de 80 a 120 %, resultando exacto con porcentaje de recuperación mayores al 97 %, preciso con RSD menores al 2 %, selectivo al no presentar interferencias por parte del solvente extractivo y los excipientes, así también robusto al no ser afecto a pequeñas variaciones planteadas. Finalmente, al comparar con el método analítico normalizado de la farmacopea americana, se observa mediante las métricas verdes que el método validado es verde en los 4 parámetros de evaluación del pictograma NEMI y presenta mayor puntaje en la ecoescala analítica, por lo que se constituye en un método analítico con menor impacto al medio ambiente.

Palabras clave: desarrollo analítico, validación, método normalizado, pictograma, ecoescala, velocidad de flujo, HPLC

## ABSTRACT

In the present study, a rapid and eco-friendly analytical methodology was designed for the quantification of diazepam in tablets by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) based on the criterion of replacement of hazardous solvents and optimization of chromatographic parameters. The resulting mobile phase consists of a mixture of ethanol-water (70: 30), the flow rate of 1 mL / min, detection wavelength of 254 nm and oven temperature of 60 °C; The stationary phase is composed of an octadecyl silane support (C18) of 5 µm diameter and 250 mm column length. The retention time of diazepam is 2,96 minutes and the running time per sample is 5 minutes. According to the applied validation parameters, the concentration range for the detection of this analyte is in the range of 80 to 120 %, being accurate with recovery percentage greater than 97 %, accurate with RSD less than 2 %, selective for not present interferences by the extractive solvent and the excipients, as well as robust due to not being affected by small variations. Finally, comparing with the standardized analytical method of the American Pharmacopoeia, it is observed through the green metrics that the validated method is green in the 4 parameters of evaluation of the NEMI pictogram and has a higher score in the analytical eco-scale, so it is constituted in a analytical method with less impact on the environment.

Keywords: analytical development, validation, standardized method, pictogram, eco-scale, flow rate, HPLC



## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, Rosa por estar siempre presente pese a su delicada salud. Eres para mí un ejemplo de amor, fortaleza y perseverancia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco al CONCYTEC por la subvención otorgada por el convenio 231-2015-FONDECYT, que financió de forma integral mis estudios de Maestría en la Pontificia Universidad Católica del Perú.*

*A mi asesora la Prof. Patricia Morales, por su ímpetu, comprensión, consejos y don de buena persona. Tengo por seguro que las iniciativas en química verde seguirán y se verán cristalizadas en próximos proyectos e investigaciones.*

*A mis amigos del programa de maestría por el apoyo mutuo en las jornadas de experimentación que de hecho nos volverán a la larga unos excelentes científicos.*

*A grandes mis amigos del laboratorio CICOTOX de la UNMSM, por su apoyo incondicional, así como al Dr. Alberto López por la solvencia y pericia que sirvieron de mucho para este estudio*

*Al Dr. César Fuertes, gran amigo, colega y segundo padre, por su invaluable ayuda en la ejecución experimental de esta propuesta.*

## ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN Y ABSTRACT

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS

LISTADO DE TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Formulación del problema	3
1.2	Objetivos (General y Específicos)	4
II.	MARCO TEÓRICO	5
2.1	Ansiedad y aspectos epidemiológicos	5
2.2	Fármacos ansiolíticos, benzodiazepinas	6
2.2.1	El Diazepam	7
2.3	Control de calidad de medicamentos en la industria farmacéutica	8
2.4	Cromatografía líquida de alto performance	10
2.5	Desarrollo analítico	13
2.6	Validación de técnicas analíticas	14
2.7	La Química Verde	17
2.7.1	Principios de la química verde	17
2.7.2	Campos de la química verde	20
2.7.3	La química analítica verde	21
2.7.3.1	Principios de la química analítica verde	22
2.7.3.2	Sistema de métrica en la química analítica verde	24
2.7.3.3	Cromatografía líquida verde	26
III.	PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1	Equipos, materiales y reactivos	27
3.1.1	Equipos	27
3.1.2	Materiales	28
3.1.3	Reactivos	28
3.2	Desarrollo analítico	28
3.2.1	Condiciones analíticas preliminares según USP 40	28
3.2.1.1	Optimización de las condiciones cromatográficas	29
3.2.1.2	Modificación del sistema de solventes	29
3.2.1.3	Modificación de temperatura	30
3.2.1.4	Modificación de la velocidad de flujo	30
3.2.2	Preparación de muestras de trabajo	31
3.2.3	Selección del método analítico	31
3.3	Validación del método analítico verde	31
3.3.1	Procedimiento analítico	32

3.3.2	Parámetros de validación.....	33
3.3.2.1	Ensayo de adecuabilidad del sistema.....	33
3.3.2.2	Exactitud.....	33
3.3.2.3	Precisión.....	33
	Precisión del sistema.....	33
	Precisión del método.....	34
3.3.2.4	Linealidad.....	34
3.3.2.5	Robustez.....	35
3.3.2.6	Selectividad.....	36
3.3.2.7	Rango.....	37
3.4	Análisis Estadístico.....	37
3.5	Aplicación del sistema de métricas verdes.....	42
3.5.1	Pictogramas NEMI.....	42
3.5.2	Ecoescala analítica.....	43
IV.	RESULTADOS.....	45
V.	DISCUSIÓN.....	67
VI.	CONCLUSIONES.....	72
VII.	RECOMENDACIONES.....	73
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
IX.	ANEXOS.....	80

## ABREVIATURAS

**5-HTA:** Receptor de serotonina o de 5-hidroxitriptamina

**ACN:** Acetonitrilo

**BP:** British Pharmacopeia (Farmacopea Británica)

**C18:** Soporte de columna de octadecilsilano

**C8:** Soporte de columna de octilsilano

**Digemid:** Dirección de medicamentos, insumos y drogas

**EPA:** Environmental Protection Agency

**EtOH:** alcohol etílico o etanol

**FTIR:** Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

**GAC:** Green Analytical Chemistry (Química Analítica Verde)

**GAPI:** Green Analytical Procedure Index

**GC:** Green Chemistry (Química Verde) o Gas Chromatography (Cromatografía gaseosa)

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alto performance)

**IFA:** Ingrediente Farmacéutico Activo o Principio Activo

**JP:** Japanese Pharmacopeia (Farmacopea Japonesa)

**Kw/h:** KiloWatt por hora

**MeOH:** alcohol metílico o metanol

**NEMI:** National Environmental Methods Index

**OMS:** Organización Mundial de la salud

**PBT:** Persistent Bioaccumulative Toxics (Toxicos bioacumulables persistentes)

**PP:** Penalty points (Puntos de penalidad)

**RSD:** Relative Standard Deviation (Desviación estándar realativa)

**T1/2:** Tiempo de vida media

**THF:** Tetrahidrofurano

**USP:** United States Pharmacopeia (Farmacopea Americana)

**UV/Vis:** Espectroscopía Ultravioleta-visible

## LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Fig.1.</b> Clasificación química de los benzodiazepinas	6
<b>Fig. 2.</b> Clasificación de las benzodiazepinas de acuerdo al tiempo de vida media	7
<b>Fig.3.</b> Estructura química del diazepam (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona)	8
<b>Fig.4.</b> Comparación de métodos analíticos aplicados para análisis de fármacos a granel según la farmacopea europea Nro 4 y la USP 27	9
<b>Fig. 5.</b> Patrón de uso de diferentes técnicas cromatográficas empleadas para el análisis de impurezas y medicamentos	10
<b>Fig.6.</b> Componentes de un sistema de HPLC	11
<b>Fig.7.</b> Mecanismo de separación en una columna cromatográfica	12
<b>Fig. 8.</b> Parámetros considerados para la validación de técnicas analíticas	15
<b>Fig.9.</b> Principios de la química analítica verde propuestos por Anastas y Warner	19
<b>Fig.10.</b> Pentágono del pensamiento ecológicamente correcto	20
<b>Fig. 11.</b> Organización de análisis de muestras de acuerdo a los criterios verdes	21
<b>Fig. 12.</b> Los principios de la química verde aplicados a la química analítica verde	22
<b>Fig.13.</b> Progreso de la química analítica verde a través del tiempo	23
<b>Fig.14.</b> Evolución de sistemas métricos pictográficos usados en química verde	25
<b>Fig.15.</b> Ecuación aplicada al cálculo de la eco escala analítica	25
<b>Fig. 16.</b> Descripción de las reglas de decisión y técnicas estadísticas	41
<b>Fig. 17.</b> Modelo del pictograma NEMI para evaluación cualitativa verde	42
<b>Fig. 18.</b> Puntos de penalidad para algunos solventes y reactivos	44
<b>Fig. 19.</b> Método USP – Separación Nordazepam – Diazepam	48
<b>Fig. 20.</b> Método Verde – EtOH:H <sub>2</sub> O (50:50) Separación Nordazepam – Diazepam	48
<b>Fig.21.</b> Método Verde – EtOH:H <sub>2</sub> O (70:30) Separación Nordazepam – Diazepam	49
<b>Fig. 22.</b> Método Verde – EtOH:H <sub>2</sub> O (70:30) a flujo 1 mL/min-Nordazepam	49
<b>Fig. 23.</b> Método Verde – EtOH:H <sub>2</sub> O (70:30) a flujo 1 mL/min-Diazepam	50
<b>Fig. 24.</b> Cromatograma del diazepam con metodología verde desarrollada	52
<b>Fig. 25.</b> Curvas de calibración para linealidad del método verde	60
<b>Fig. 26.</b> Comparación de cromatogramas y parámetros analíticos del método USP y método verde propuesto	64
<b>Fig.27.</b> Pictogramas NEMI posterior al análisis realizado al método USP y verde	65

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación OMS de los ensayos analíticos	16
<b>Tabla 2.</b> Clasificación USP de los ensayos analíticos	16
<b>Tabla 3.</b> Parámetros requeridos para validación de acuerdo a la USP	17
<b>Tabla 4.</b> Consolidado de condiciones cromatográficas de trabajo	30
<b>Tabla 5.</b> Parámetros analíticos de la técnica analítica verde propuesta	32
<b>Tabla 6.</b> Valores referenciales para evaluación de la exactitud	33
<b>Tabla 7.</b> Valores referenciales para evaluación de la linealidad del método	34
<b>Tabla 8.</b> Factores y sus variantes para la evaluación de la robustez analítica	35
<b>Tabla 9.</b> Modelo factorial aplicado al diseño experimental de Youden- Steiner	36
<b>Tabla 10.</b> Análisis estadístico consolidado	40
<b>Tabla 11.</b> Requerimientos de evaluación verde por pictograma NEMI	42
<b>Tabla 12.</b> Puntos de penalidad aplicados al cálculo de la Eco-escala analítica	43
<b>Tabla 13.</b> Características de columna empleada	45
<b>Tabla 14.</b> Evaluación preliminar de la presión en relación a temperatura y flujo para la proporción EtOH / H <sub>2</sub> O (50:50)	45
<b>Tabla 15.</b> Evaluación preliminar de la presión en relación a temperatura y flujo para la proporción EtOH / H <sub>2</sub> O (100:0)	46
<b>Tabla 16.</b> Evaluación preliminar de la velocidad de flujo en relación a la proporción de solventes	46
<b>Tabla 17.</b> Descripción de parámetros analíticos observados en el análisis de flujo a diversas proporciones de solventes.	47
<b>Tabla 18.</b> Condiciones cromatográficas seleccionadas para la TAV	51
<b>Tabla 19.</b> Resultados de las inyecciones de estándar de diazepam	53
<b>Tabla 20.</b> Resultados de las inyecciones de estándar de diazepam para exactitud	54
<b>Tabla 21.</b> Porcentajes de recuperación en evaluación de exactitud de muestras	54
<b>Tabla 22.</b> Resultados del estándar de diazepam para la precisión del sistema	55
<b>Tabla 23.</b> Resultados del estándar de diazepam para evaluación de repetibilidad	56
<b>Tabla 24.</b> Resultados para la evaluación de repetibilidad en muestras	56
<b>Tabla 25.</b> Resultados del estándar de diazepam por analista para la prueba de precisión intermedia	57
<b>Tabla 26.</b> Resultado de precisión intermedia entre analistas aplicado a muestras	58
<b>Tabla 27.</b> Resultados individuales de elaboración de curvas de calibración y determinación de la linealidad del método	59

<b>Tabla 28.</b> Evaluación de resultados de linealidad	60
<b>Tabla 29.</b> Resultados de la prueba de selectividad	61
<b>Tabla 30.</b> Resultados de parámetros individualizados	62
<b>Tabla 31.</b> Resultados de la prueba de Youden-Steiner	63
<b>Tabla 32.</b> Evaluación de la significancia de efectos individualizados	63
<b>Tabla 33.</b> Consolidación del rango analítico del método verde propuesto	63
<b>Tabla 34.</b> Evaluación de parámetros verde la asignación en pictograma NEMI	65
<b>Tabla 35.</b> Comparación de puntos de penalidad para método verde y USP	66



## I. INTRODUCCIÓN

Los benzodiazepinas son sedantes hipnóticos aplicados en el tratamiento de trastornos del sueño, tratamiento coadyuvante en síndromes convulsivos y epilépticos, así como en el trastorno de ansiedad<sup>1</sup>. Según la OMS, una de cada cinco personas padece de depresión y ansiedad, esta cifra ha ido en aumento con el pasar de los años, para ello es requerido en sus casos más leves, el tratamiento ansiolítico, siendo los benzodiazepínicos los fármacos de mayor demanda y prescripción médica<sup>2</sup>. Se observa que la producción mundial de benzodiazepinas, especialmente del diazepam, es de interés de la industria farmacéutica, por ello se producen medicamentos que contienen estos principios activos bajo diferentes presentaciones: tabletas, cápsulas, inyectables, entre otros; los cuales deben ser sometidos a procedimientos minuciosos para garantizar la calidad del producto, desde su génesis como materia prima<sup>3</sup>.

En los departamentos de control de calidad de medicamentos es habitual que la valoración de activos se realice mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) ya sea por técnica analítica normalizada (USP, BP, JP, etc) o no normalizada (técnica propia validada), que permite separar y cuantificar analitos de interés, además, los cromatógrafos pueden trabajar en serie por jornadas amplias<sup>4</sup>. Se utiliza un sistema en fase reversa: fase estacionaria apolar (C8, C18, entre otros empaquetamientos) y fase móvil polar, siendo los solventes más empleados el metanol, agua y acetonitrilo, mientras que el THF, acetona y soluciones buffer se usan en menor proporción<sup>5</sup>. Estos solventes son colectados, tratados y eliminados mediante algún sistema de tratamiento de residuos<sup>6</sup>, sin embargo, generan impacto negativo al medio ambiente siendo más representativo el caso del acetonitrilo<sup>7</sup>, según las guías de clasificación de solventes de la química verde, lo consideran como un solvente “problemático”<sup>8</sup>. Por otro lado, de acuerdo a las pruebas de dosis letal media, el acetonitrilo resulta ser un solvente nocivo en caso de ingestión o contacto con la piel que puede provocar irritación ocular grave y a la vez nocivo en caso de inhalación, por tanto, puede afectar al analista operador en su manipulación<sup>9</sup>.

Dentro de los principios de la química analítica verde, se recomienda la sustitución de solventes, enfocándose en el caso de la cromatografía líquida en el reemplazo del acetonitrilo por otros que presenten un menor impacto<sup>10</sup>. Así también, estos principios destacan la optimización cromatográfica a través de la reducción de tiempos de análisis

por el uso de columnas más cortas y de menor tamaño de partícula, también por la aplicación de temperaturas mayores a la del ambiente (25 °C) para disminuir los tiempos de retención de los analitos y optimizar su separación<sup>11</sup>. Para garantizar la eficacia de las técnicas analíticas modificadas (no normalizadas) se aplica un plan de validación<sup>12</sup> y además se verifica cuán ecoamigable es dicha técnica por medio de un sistema de métricas. En química analítica verde estas métricas pueden ser cualitativas (pictogramas NEMI) o cuantitativas (Eco-escala de puntaje)<sup>13</sup>.

Para el caso de los fármacos benzodiazepínicos existen algunas propuestas de técnicas analíticas propias basadas en el reemplazo de solventes<sup>14-17</sup>, como en el estudio de Eldin Ahmed et al. (2014) quienes realizaron el desarrollo de un método en HPLC para determinar clonazepam y sustancias relacionadas (impurezas por degradación en el tiempo) en formulados farmacéuticos. Para ello aplicaron criterios de la química analítica verde (GAC), reemplazaron la fase móvil de referencia: buffer fosfato de amonio pH = 8; metanol: tetrahidrofurano (60 : 52 : 13) por solventes alternativos: dodecilsulfato de sodio, buffer acetato de sodio pH = 3,5 e isopropanol (25 : 55 : 20)<sup>18</sup>. Según la farmacopea americana (USP), el sistema de solventes para la valoración de una benzodiazepina de interés como el diazepam (tanto en la forma de principio activo como de tabletas) es acetonitrilo: agua: metanol (2 : 2 : 1)<sup>19</sup>, ante la poca literatura sobre nuevas técnicas analíticas verdes, se busca a través del presente estudio efectuar el desarrollo analítico y validación de una propuesta verde por HPLC para la determinación del diazepam bajo la forma de principio activo, basado en el principio de reemplazo de solvente (acetonitrilo) y optimización de los parámetros analíticos, así como la aplicación de las métricas correspondientes para verificar cuán verde resultará la técnica desarrollada a fin de ser aplicada en los análisis de rutina en laboratorios de control de la industria farmacéutica.

El control de calidad de medicamentos es bastante estricto y riguroso, ello implica que las técnicas aplicadas para la valoración (cuantificación) de principios activos sean de fuentes normalizadas (farmacopeas) o en su defecto, sean validadas. La gran mayoría de laboratorios aplican las técnicas de las farmacopeas y solo en casos excepcionales (cuando no está referenciado el activo) realizan la validación. Las técnicas analíticas de valoración habituales emplean en su mayoría la cromatografía líquida de alto performance (HPLC), utilizando los solventes en las proporciones que se indican en las farmacopeas; sin embargo, muchos de estos como es el caso del tetrahidrofurano o el acetonitrilo, implican exposición a la salud del analista químico e impactan negativamente al medio ambiente cuando son desechados. Un compuesto de interés

para la industria farmacéutica como el diazepam (bajo la forma de materia prima de principio activo y producto terminado tipo tableta) según la farmacopea americana (USP), emplea en su sistema de solventes al acetonitrilo, compuesto considerado como “peligroso” al medio ambiente.

## **1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

En la revisión de literatura realizada, se observó que al ser la química analítica verde un campo nuevo dentro de la química, hay pocos casos de estudios con propuestas verdes validadas para la determinación de principios activos de interés como es el caso de los benzodiazepínicos, por lo que se considera imperioso, realizar un estudio completo que establezca el desarrollo y validación de una propuesta analítica verde para la valoración de diazepam, fármaco ansiolítico de amplio uso, por cromatografía líquida de alto performance HPLC y que además considere las métricas verdes, porque en general la gran mayoría de estudios de este corte, solo presentan los resultados de la validación y obvian considerar las métricas que propone la química verde para evaluar en realidad cuán verde resultó el nuevo método desarrollado.

## 1.2 OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollar y validar una técnica analítica, según los parámetros y métricas de la química verde, para la determinación de diazepam en tabletas mediante cromatografía líquida de alta performance.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una propuesta verde (según los principios de la GAC) a la técnica analítica normalizada de la Farmacopea Americana para la valoración de diazepam en tabletas
- Evaluar el desempeño de la técnica verde propuesta (Fase de desarrollo analítico)
- Establecer y ejecutar los parámetros de validación en función a criterios quimiométricos y estadísticos
- Comparar el desempeño de la propuesta analítica verde respecto a la técnica normalizada de la Farmacopea Americana para valoración de diazepam en tabletas
- Definir y ejecutar las métricas cuali-cuantitativas para determinar cuán ecoamigable es la técnica analítica verde propuesta.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANSIEDAD Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

La ansiedad es un fenómeno mental que se manifiesta por medio de procesos defensivos del organismo del sujeto, puede ser volitivo al potencial del desarrollo de la personalidad, la consecución de metas y para mantener el rendimiento a nivel laboral y comportamental. Esta al presentarse de forma excesiva puede ser contraproducente para la salud mental, conduciendo a enfermedades y afectando al adecuado desenvolvimiento del sujeto<sup>20</sup>.

De acuerdo a la clasificación internacional de las enfermedades y problemas relacionados a la salud (décima revisión), en el capítulo V dedicado a los trastornos mentales y del comportamiento, la ansiedad se ubica principalmente dentro de los trastornos neuróticos secundarios a situaciones estresantes y somatomórficas, destacando el trastorno mixto de ansiedad y depresión, el trastorno de ansiedad orgánico y el trastorno de ansiedad generalizada<sup>21</sup>.

Las enfermedades y trastornos mentales comunes tales como la ansiedad y la depresión son muy frecuentes, tal es así que estudios epidemiológicos realizados en nuestro país, a cargo del Instituto Especializado en Salud Mental Honorio Hideyo Noguchi indican que un 37 % de la población tiene la posibilidad de padecer un trastorno mental en alguna etapa de su vida<sup>22</sup>.

Aproximadamente el 50 % de personas que padecen depresión evidencian además episodios de ansiedad, es decir que ambas se encuentran correlacionadas<sup>23</sup>.

Actualmente el abordaje de la salud mental constituye una de los principales ejes de acción del Ministerio de Salud, siendo la reciente ley N° 30947 Ley de Salud Mental, uno de los principales logros para democratizar el acceso a servicios de salud mental comunitarios y especializados a nivel nacional. Destacándose que ahora los establecimientos farmacéuticos de todo el Perú deberán contar con un 30 % de su stock en medicamentos psicofármacos del listado de medicamentos esenciales priorizados por el Ministerio de Salud y la Digemid, quien se encargará de fiscalizar la ejecución de esta norma<sup>24</sup>.

## 2.2 FARMACOS ANSIOLÍTICOS. BENZODIACEPINAS

Los fármacos ansiolíticos son aquellos que atenúan o eliminan la sensación de ansiedad, sin provocar sedación o sueño en el paciente. Sin embargo, dosis aumentadas de estas sustancias pueden generar la sedación, sueño, anestesia y hasta la muerte<sup>25</sup>.

Los fármacos ansiolíticos se clasifican en sedantes hipnóticos: benzodiazepinas, barbitúricos y meprobamato; agonistas parciales de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>: buspirona, ipsapirona y gepirona; los que producen bloqueo de componentes vegetativos: neurolépticos, antidepresivos<sup>25</sup>.

Los benzodiazepinas se caracterizan por tener en común el núcleo del anillo benzodiazepínico. La mayoría poseen los N del anillo en la posición 1 y 4. Además de tener el radical cloro en posición 7 como es el caso del diazepam, flurazepam, oxazepam y temazepam o NO<sub>2</sub> como el clonazepam<sup>25</sup> (Ver figuras 1 y 2).

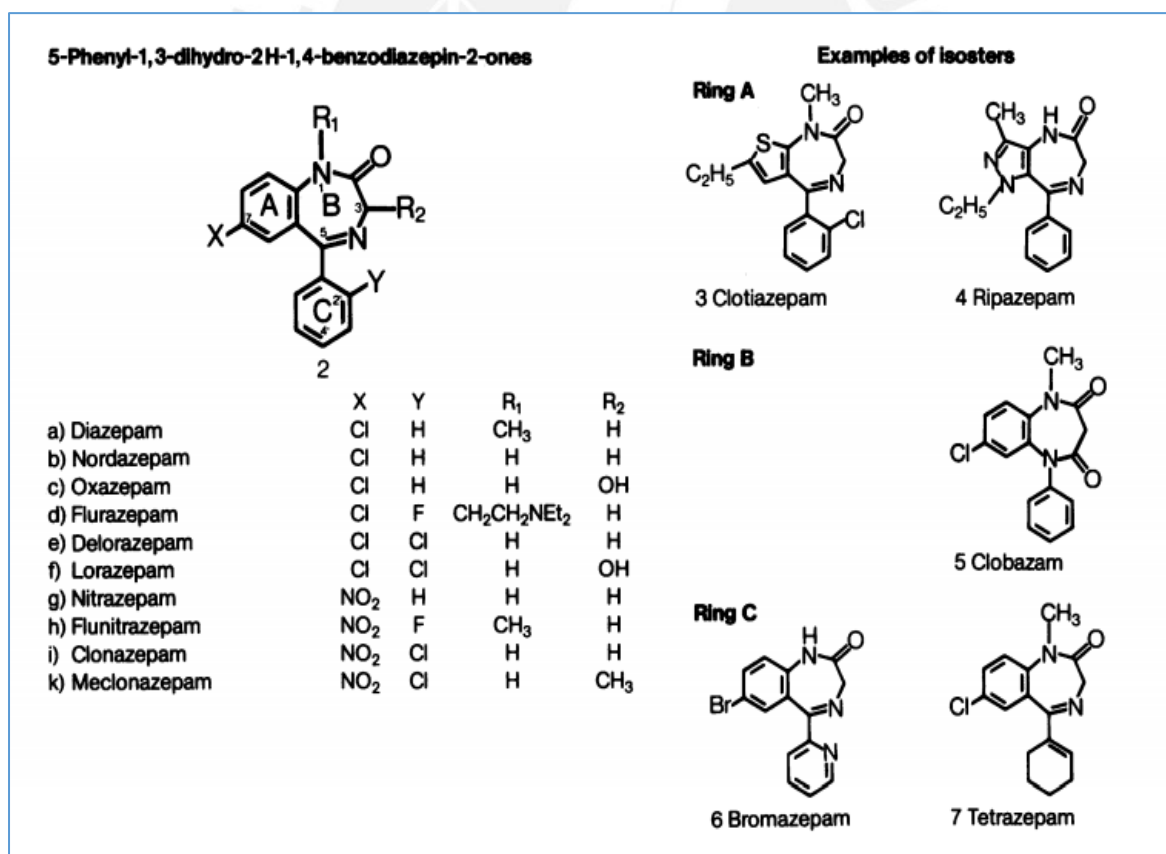


Fig.1. Clasificación química de las benzodiazepinas<sup>26</sup>

<b>T<sup>1/2</sup> corta (&lt; 6 h)</b>			
<i>Midazolam (R)</i> H: 7,5-1,5 mg/24 h	<i>Brotizolam (R)</i> H: 0,25-0,5 mg/24 h	<i>Clotiazepam (R)</i> A: 5 mg/8 h	<i>Bentazepam (R)</i> A: 25 mg/8 h
<i>Triazolam (I)*</i> H: 0,125 mg/24 h	<i>Loprazolam (I)</i> H: 1 mg/24 h		
<i>Zolpidem (L)</i> H: 10 mg/24 h	<i>Zopiclona (L)</i> H: 7,5 mg/24 h		
<b>T<sup>1/2</sup> intermedia (6-24 h)</b>			
<i>Temazepam (R)</i> A: 5 mg/8 h			
<i>Lorazepam (I)*</i> H: 1-2 mg/24 h	<i>Flunitrazepam (I)*</i> H: 0,5-1 mg/24 h	<i>Lormetazepam (I)</i> H: 1 mg/24 h	<i>Nitrazepam (I)</i> H: 5-10 mg/24 h
<i>Alprazolam (I)*</i> A: 0,25-0,5 mg/8 h	<i>Bromazepam (I)</i> A: 1,5 mg/8 h	<i>Halazepam (I)</i> A: 20-40 mg/8 h	
<i>Oxazepam (L)</i> A: 10-30 mg/8 h			
<b>T<sup>1/2</sup> prolongada (&gt; 24 h)</b>			
<i>Clorazepato (R)*</i> A: 5-15 mg/8 h H: 15 mg/24 h	<i>Diazepam (R)*</i> A: 5-10 mg/8 h H: 5-10 mg/24 h M: 5 mg/8 h	<i>Flurazepam (R)</i> H: 15-30 mg/24 h	<i>Tetrazepam (R)</i> M: 50 mg/8 h
<i>Clordiazepóxido (I)</i> A: 5-25 mg/8 h	<i>Clobazam (I)</i> A: 10 mg/12 h	<i>Clonazepam (I)</i> A: 0,5 mg/8 h	<i>Medazepam (I)</i> A: 2-4 cáps/24 h (asociación)
<i>Quazepam (I)</i> H: 7,5-15 mg/24 h			
<i>Prazepam (L)</i> H: 20 mg/24 h			
<i>Ketazolam</i> H: 15-60 mg/24 h	<i>Pinazepam</i> A: 2,5-10 mg/12 h	<i>Camazepam</i> A: 10-20 mg/12 h	

Fig. 2. Clasificación de las benzodiazepinas de acuerdo al tiempo de vida media<sup>27</sup>

Las benzodiazepinas son consideradas dentro del formulario nacional como medicamentos esenciales debido a su importancia en la salud pública, de allí que se requieran en todos los establecimientos de salud y oficinas farmacéuticas del país <sup>28,29</sup>.

### 2.2.1 EL DIAZEPAM

El diazepam es una benzodiazepina de potencia media que es usada comúnmente como anticonvulsivante, ansiolítico, sedativo y para la miorelajación. Se constituye como la benzodiazepina más usada para tratar los síntomas de la ansiedad; está disponible en presentaciones intramusculares e intravenosas (inyectables), orales (tabletas y cápsulas), rectales y en geles. Habitualmente las dosis de 2 a 10 mg vía oral 2 a 4 veces por día, es utilizada para tratar la ansiedad, esto es ajustable al nivel de severidad sintomatológica del paciente <sup>30</sup>. En la figura 3 se muestra la estructura química del diazepam.

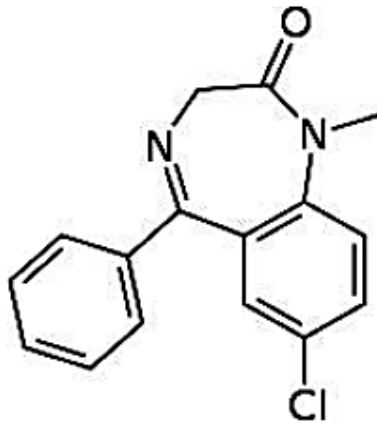


Fig.3. Estructura química del diazepam (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona)<sup>30</sup>

### 2.3 CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El control de calidad es una actividad esencial para la industria farmacéutica. Los medicamentos que salen al mercado deben garantizar que sean seguros y terapéuticamente efectivos en presentaciones o formulaciones que aseguren su desempeño. Para ello, los principios activos son producidos en condiciones inocuas y además se demuestra la estabilidad del producto a través del tiempo para determinar el tiempo de vida útil del mismo. De igual manera, equipos de vanguardia por medio de métodos analíticos desarrollados y validados dan la confiabilidad de la calidad de la forma farmacéutica, de acuerdo a normatividad internacional<sup>31</sup>.

En el área de la investigación farmacéutica, los procesos analíticos para determinaciones en materia prima, intermediarios, producto terminado, impurezas, productos de degradación y muestras biológicas que contienen a los principios activos y sus metabolitos principales. Los métodos analíticos oficiales involucran técnicas comprendidas en monografías que ayudan a caracterizar e identificar la calidad de productos y fármacos, así como del principio activo. Los métodos empleados en las monografías son diversos como electroquímicos, espectroscópicos (UV y FTIR), separativos (cromatográficos y electroforéticos); de acuerdo a la naturaleza y propiedades del analito<sup>32</sup> (ver figura 4).

**Table 2** Proportion of various analytical methods prescribed for the assay of bulk drug materials in Ph. Eur. 4 and USP XXVII.

Method	Ph. Eur. 4 (%)	USP 27 (%)
HPLC	15.5	44
GC	2	2.5
Titration	69.5	40.5
Acid–base	57.5	29.5
Aqueous mixtures	21	5.5
Indicator	6.5	4.5
Potentiometric	14.5	1
Non-aqueous	36.5	24
Indicator	9.5	14
Potentiometric	27	10
Redox (Iodometry, Nitritometry, etc.)	6.5	5.5
Other (complexometry, argentometry, etc.)	5.5	5.5
UV–vis spectrophotometry	9.5	8.5
Microbiological assay (antibiotics)	3	2.5
Other (IR, NMR, polarimetry, fluorimetry, atomic absorption spectroscopy, polarography, gravimetry etc.)	0.5	2

Source: S. Gorog/Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36 (2005) 931–937.

Fig.4. Comparación de métodos analíticos aplicados para análisis de fármacos a granel según la farmacopea europea Nro 4 y la USP 27.<sup>32</sup>

Las especificaciones de calidad de un producto farmacéutico involucran cierto tipo de especificaciones que se adecúan de acuerdo al tipo de forma farmacéutica, siendo las principales<sup>33</sup>:

- Características físicas: dureza, friabilidad.
- Identificación del principio activo
- Cuantificación de constituyente(s) con actividad terapéutica
- Ensayos en excipientes: colorantes usados, agentes antimicrobianos, antioxidantes, preservantes de acuerdo a límites de aceptación.
- Ensayos de pureza
- Test de performance: disolución
- Ensayos de seguridad o evaluación de toxicidad, principalmente aplicables a productos biológicos

En la figura 5 se muestra gráficamente el porcentaje de uso de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de impurezas en medicamentos.

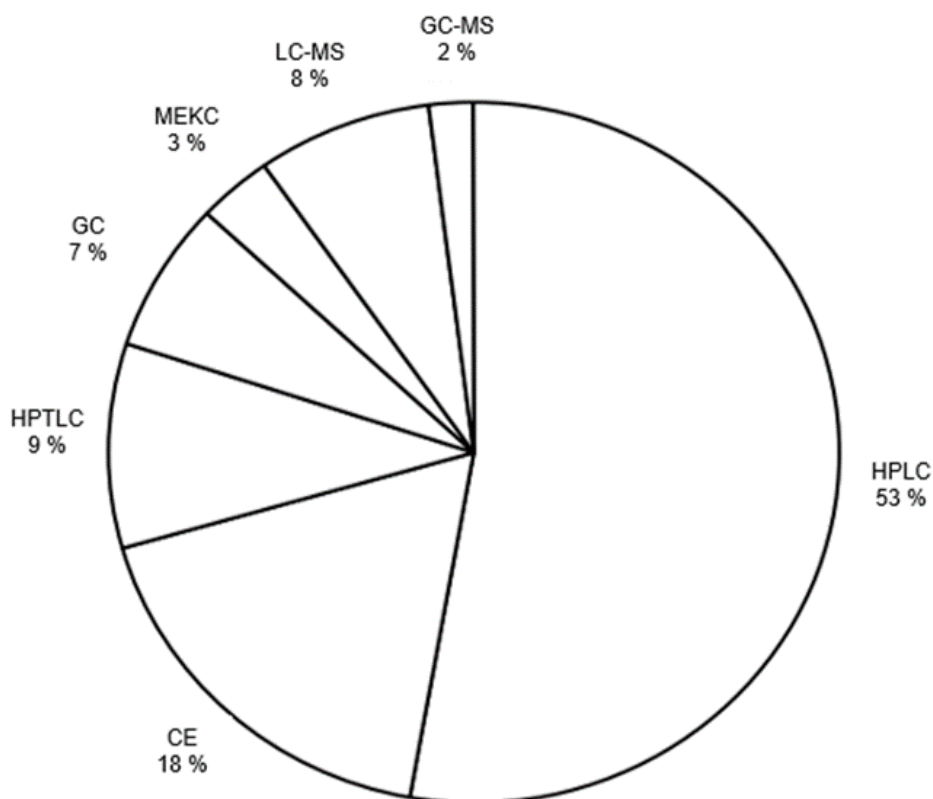


Fig. 5. Patrón de uso de diferentes técnicas cromatográficas empleadas para el análisis de impurezas en medicamentos<sup>33</sup>

## 2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) deriva de la tradicional cromatografía en columna y se constituye en una de las herramientas más importantes en la química analítica. Preferentemente utilizada por la industria farmacéutica como una herramienta analítica integral aplicada en diversas etapas del desarrollo de un medicamento, así como en su producción. Empleada para el monitoreo de la pureza de principios activos, reacciones en el proceso de escalamiento industrial, contaminaciones cruzadas, así como la posible interacción con los excipientes e identificación de intermediarios y compuestos de degradación<sup>34</sup>.

## Instrumentación<sup>35</sup>

El sistema instrumental del HPLC está constituido por una bomba, inyector, columna, detector, sistema de integración (Ver figura 6).

- Reservorio de solvente: la fase móvil está presente en un contenedor de vidrio. La fase móvil puede estar constituida por una mezcla de solventes polares y no polares; las proporciones variarán de acuerdo a los criterios de desarrollo analítico.
- Bomba. Este componente ejerce succión de la fase móvil y la impele hacia la columna para que pase a través de esta a un flujo y presión determinados. La presión generada irá de acuerdo a las características de la columna: dimensiones, tamaño de partícula, flujo, composición y viscosidad de la fase móvil.
- Inyector. Manual o automatizado, impele la muestra o analito de interés hacia la columna para que se someta al proceso separativo. Impele el contenido en volúmenes definidos.
- Columna cromatográfica. Habitualmente de 50 mm a 300 mm de longitud. Generalmente con una fase estacionaria cuyo tamaño de partícula va entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ .

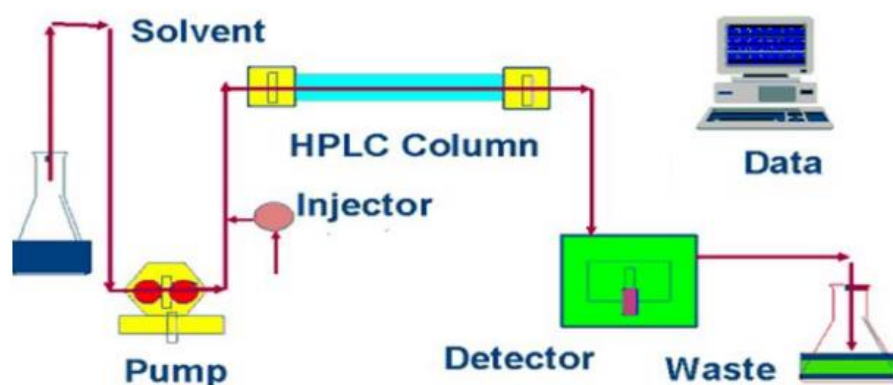


Fig.6. Componentes de un sistema de HPLC<sup>34</sup>

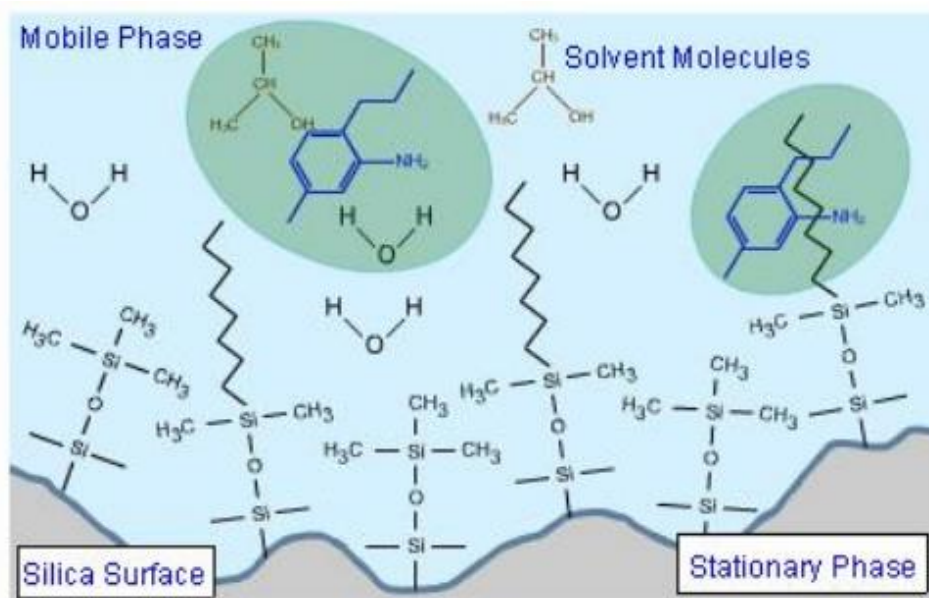


Fig.7. Mecanismo de separación en una columna cromatográfica<sup>36</sup>

En la cromatografía líquida en HPLC tanto el equipo como los parámetros químicos asociados a la columna deben ser optimizados para garantizar un proceso separativo óptimo, que se manifestará en los reportes cuali-cuantitativos del analista (Ver figura 7).

Parámetros a considerar:

- Composición de la fase móvil
- Química de la fase ligada
- Columna y empaquetamiento
- Pretratamiento y concentración de la muestra
- Flujo, temperatura y longitud de onda de trabajo

## 2.5 DESARROLLO ANALÍTICO<sup>37</sup>

Aspectos a considerar en el desarrollo de un método analítico por HPLC:

### 1. Conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del analito

Las propiedades fisicoquímicas del analito tales como la solubilidad, polaridad, pKa y pH juegan un rol primordial en el desarrollo analítico porque ayudarán en la selección del tipo de solvente(s) a utilizar en la composición de la fase móvil, así como en la elección de la fase estacionaria.

### 2. Selección de las condiciones cromatográficas

#### - Selección de columna cromatográfica

La columna cromatográfica es la pieza central en el análisis por HPLC, una selección apropiada garantizará buenas condiciones de separación. Una mala selección, generaría datos inexactos y separaciones deficientes. Su selección implica la consideración de la química de la fase estacionaria, tamaño de partícula y dimensiones de columna. Las matrices más comunes para HPLC son preparadas a base de sílica y se caracterizan por su robustez, fácil derivatización, preparación y esfericidad. Además, el sistema de fase reversa (fase estacionaria apolar: C8, C18 y fase móvil polar: EtOH, MeOH, ACN) es el más empleado por su practicidad y buenas características resolutivas.

#### - Optimización de la fase móvil (efecto del pH, selección de buffer, modificadores orgánicos)

Si el analito se ioniza, la propiedad del pH de la fase móvil basada en el pKa adquiere un rol fundamental, así como el pH de trabajo que debe ser regulado.

Selección del detector y longitud de onda. La aplicación de los solventes puede ser en sistema en gradiente o continuo.

#### - Selección del detector y longitud de onda

El tipo de detector a seleccionar dependerá de las propiedades del analito. El detector más empleado es el ultravioleta (UV), aunque también se usa el de fluorescencia, electroquímico, de índice de refracción y espectrometría de masas. La longitud de onda habitualmente se selecciona luego de un barrido espectral, donde indica la longitud de onda máxima del analito.

3. Desarrollo del enfoque de análisis  
Selección de los parámetros analíticos a utilizar basado en pilotos de investigación considerando criterios de idoneidad como RSD, número de platos teóricos, factor cola, asimetría.
4. Preparación de la muestra  
Etapa crítica del proceso, porque el analito de interés muchas veces no radica en muestras de materia prima de disolución directa, sino que requiere de sistemas extractivos y de filtración que garanticen la completa obtención de la sustancia y la aplicación pertinente de sus alícuotas.
5. Optimización del método analítico  
Basado principalmente en la mejora de las condiciones cromatográficas empleadas previamente a fin de definir los parámetros definitivos como composición de la fase móvil, flujo, temperatura de trabajo, sistema de solventes, uso de buffer, flujo, volumen de inyección entre otros.

## **2.6 VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS**

La validación de métodos es una condición vital en la práctica analítica-química. Trata del proceso para establecer un método analítico y la verificación de que es consistente y presenta adecuado desempeño. La validación tal cual, se manifiesta en un procedimiento documentado.

La validación del método permite al analista químico y/o laboratorio demostrar que un método resulta adecuado para el uso destinado.

Un método se valida cuando es preciso demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso destinado. Habitualmente se valida: métodos no normalizados, métodos desarrollados por el propio laboratorio (técnicas propias), métodos normalizados empleados fuera de su esfera de aplicación (así mismo ampliaciones y/o modificaciones) y cuando se desea comparar la equivalencia entre dos métodos (método desarrollado y normalizado)<sup>38,39</sup>.

Para el desarrollo de pruebas de validación, el analista debe conocer el procedimiento de ensayo, el total de pruebas o mediciones a realizar de acuerdo a un plan de validación, previamente establecido. El personal a realizar el programa de validación debe estar calificado y los equipos calibrados. Los parámetros de validación (Fig.8) deben ser debidamente registrados y almacenados para su posterior análisis matemático y estadístico, mediante el empleo de software estadístico o plantillas de cálculo preestablecidas<sup>39</sup>.

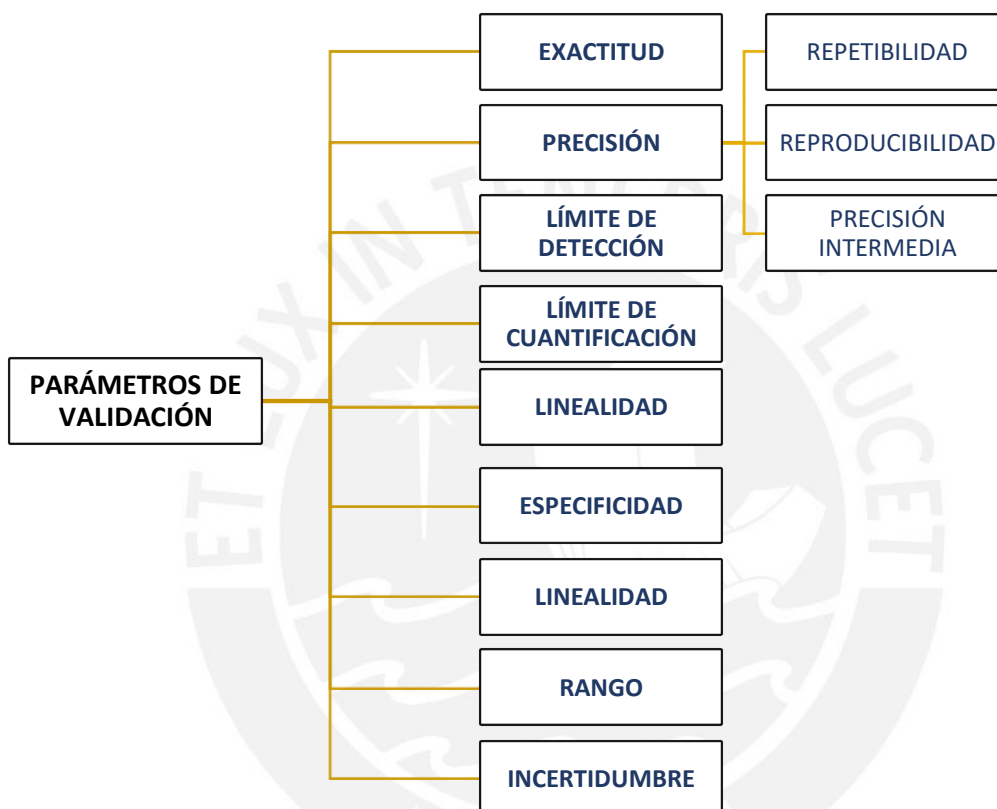


Fig. 8. Parámetros considerados para la validación de técnicas analíticas

Los parámetros de validación o procedimientos analíticos de validación se deben aplicar considerando la naturaleza del material farmacéutico o propósito del procedimiento, es por ello que, dependiendo de la categoría de clasificación, se aplicarán determinados parámetros. Las categorías en general dividen a los compuestos de interés por si se desea realizar identificación cualitativa, cuantitativa, evaluación de las trazas de impurezas o compuestos de degradación, así como parámetros de desempeño establecidos para el producto terminado<sup>40</sup>. En las tablas 1 a 3 se presenta la clasificación de los ensayos analíticos de acuerdo con la OMS y la USP, así como los parámetros de validación según la USP.

Tabla 1. Clasificación OMS de los ensayos analíticos<sup>41</sup>

<b>CLASIFICACIÓN DE ENSAYOS ANALÍTICOS SEGÚN OMS</b>	
<b>CLASE A</b>	Para establecer identidad
<b>CLASE B</b>	Para detectar y cuantificar impurezas
<b>CLASE C</b>	Para determinar cuantitativamente concentración
<b>CLASE D</b>	Para evaluar características de disolución, uniformidad de contenido

Tabla 2. Clasificación USP de los ensayos analíticos<sup>40</sup>

<b>CLASIFICACIÓN DE ENSAYOS ANALÍTICOS SEGÚN USP</b>	
<b>CATEGORÍA I</b>	Cuantificación de principios activos en producto terminado (incluye conservantes).
<b>CATEGORÍA II</b>	Determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en productos farmacéuticos.
<b>CATEGORÍA III</b>	Determinación de características de desempeño: disolución, liberación de principio activo, etc.
<b>CATEGORÍA IV</b>	Ensayos de identificación

Tabla 3. Parámetros requeridos para validación de acuerdo a la USP<sup>40</sup>

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III (Características de desempeño, disolución)	CATEGORÍA IV (Pruebas de identificación)
	(Prod. Terminado, materia prima y conservantes)	Prueba límite cuantitativa (Impurezas en fármacos)	Prueba límite cualitativa (Metales pesados, etc)		
EXACTITUD	X	X	*		
PRECISIÓN	X	X		X	
SELECTIVIDAD	X	X	X		X
LIMITE DE DETECCIÓN			X		
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN		X			
LINEALIDAD	X	X			
INTERVALO	X	X	*		

\*Puede requerirse de acuerdo a la naturaleza de la prueba

## 2.7 LA QUÍMICA VERDE

De acuerdo a la definición de la EPA (Environmental Protection Agency) la química verde es aquella división de la química que diseña productos y procesos químicos que son menos lesivos al medio ambiente, evitando la formación de agentes contaminantes.

La química verde no es una división aislada de la química, sino que su enfoque es interdisciplinar basado en principios químicos, ecológicos y de responsabilidad social, evidenciados en propuestas creativas e innovación científica<sup>42-44</sup>.

### 2.7.1 PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE<sup>45</sup>

En los años 90, Paul Anastas y John Warner postularon los 12 principios de la Química Verde, los cuáles aún se utilizan en la actualidad, que se basan principalmente en la disminución o no uso de solventes tóxicos en procesos químicos y analíticos. Estos principios promueven acciones directas con un impacto favorable en el medio ambiente, sobre las síntesis, procesos, análisis y destino de uso de sustancias químicas, con el fin de minimizar el impacto ambiental y ocupacional (laboral) inherente a la práctica química.

Los 12 principios de la química verde son (Ver figura 9):

1. PREVENCIÓN

“Es preferible evitar la producción de un residuo que reciclarlo, tratarlo o disponer de él una vez que se haya formado”

2. ECONOMÍA ATÓMICA

“Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que se incorporen al máximo los reactivos en el producto final, minimizando la formación de subproductos, lo que favorece al principio 1”

3. USO DE METODOLOGÍAS QUE GENEREN PRODUCTOS DE TOXICIDAD REDUCIDA

“Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente”

4. GENERACIÓN DE PRODUCTOS EFICACES, PERO NO TÓXICOS

“Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad”

5. REDUCCIÓN DEL USO DE SUSTANCIAS AUXILIARES

“Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (solventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen, que sean lo más inocuos posible”

6. DISMINUCIÓN DEL CONSUMO ENERGÉTICO

“Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible”

7. USO DE MATERIAS PRIMAS RENOVABLES

“Las materias primas han de ser preferiblemente renovables en vez de agotables, siempre que sean técnica y económicamente viables”

8. EVITAR EL USO INNECESARIO DE LA DERIVATIZACIÓN

“Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos)”

## 9. POTENCIACIÓN DE LA CATÁLISIS

“Se emplearán catalizadores (lo más selectivos), reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos”

## 10. GENERACIÓN DE PRODUCTOS BIODEGRADABLES

“Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos”

## 11. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA MONITORIZACIÓN EN TIEMPO REAL

“Las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir el monitoreo y control en tiempo real de procesos, previo a la formación de productos secundarios”

## 12. MINIMIZAR EL POTENCIAL DE ACCIDENTES QUÍMICOS

“Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas emanaciones, explosiones e incendios”



Fig.9. Principios de la química analítica verde propuestos por Anastas y Warner<sup>45</sup>

### 2.7.2 CAMPOS DE LA QUÍMICA VERDE<sup>42-44</sup>

- a) Investigación en el área de reacciones catalíticas y biocatalíticas con el fin de obtener compuestos con mayor selectividad, pureza y sin formación de productos tóxicos.
- b) Búsqueda de nuevos materiales, no contaminantes y renovables
- c) Diseño de sustancias químicas menos tóxicas y ecoamigables
- d) Búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas, no tóxicas y ecológicas para los medios de reacción tales como agua, líquidos iónicos y fluidos supercríticos.
- e) Búsqueda y desarrollo de condiciones novedosas para las reacciones químicas y que garanticen rendimientos tales como uso de microondas, ultrasonido o aplicación de luz.
- f) Búsqueda de rutas alternativas para la purificación de aire y agua contaminados para mejorar su calidad

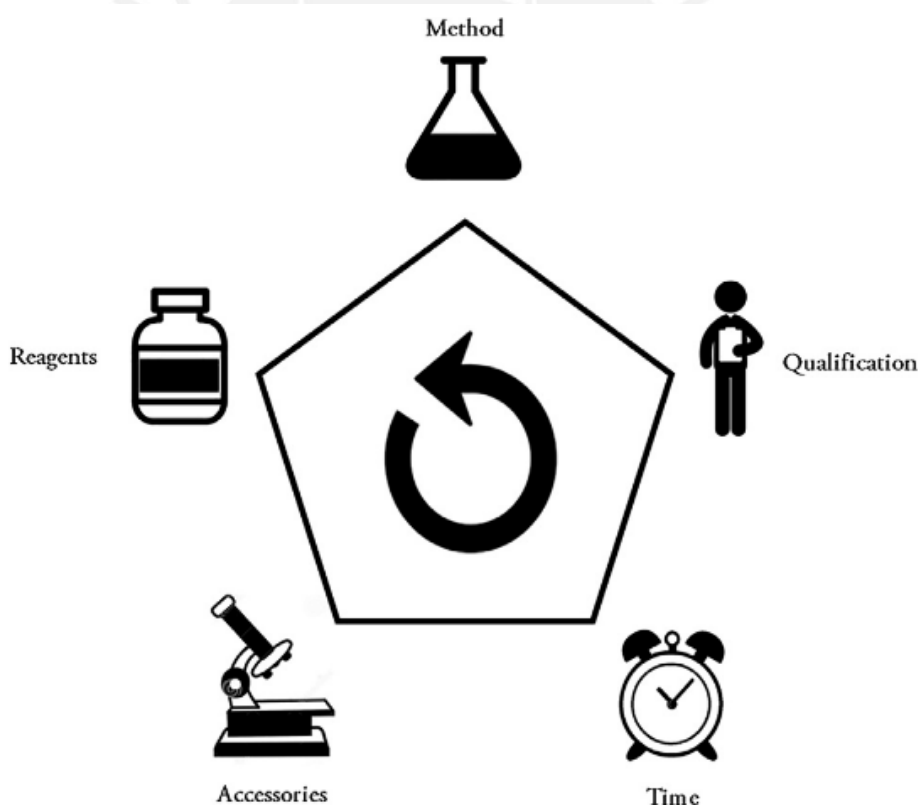


Fig.10. Pentágono del pensamiento ecológicamente correcto<sup>45</sup>

### 2.7.3 LA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE<sup>46-48</sup>

La aplicación de procedimientos analíticos puede causar un potencial impacto negativo al medio ambiente y serios riesgos para la salud e integridad de los operarios, este aspecto siempre ha sido de interés de los investigadores (Ver figura 10). Desde un abordaje económico, las metodologías analíticas y el riesgo inherente al procesamiento de muestras, uso de alícuotas de reactivos, empleo masivo de solventes, consumo de energía conforme avanza la sofisticación de la instrumentación, despertaron el interés de los químicos analíticos y de las empresas con el fin de optimizar procedimientos y reducir la producción de residuos que implican tratamientos posteriores y mayor gasto. Ante estas necesidades es que los químicos analíticos vieron conveniente aplicar el término de Química Analítica Verde (GAC: Green Analytical Chemistry).

La química analítica verde es una sección de la química verde que busca contribuir a través de los medios analíticos a disminuir el impacto negativo contra el medio ambiente. Para ello trata que los reactivos a utilizar sean no tóxicos, seguros y en lo posible de fuentes renovables. Uso mínimo de muestras, que sean analizadas en instrumentos eficientes por medio de métodos analíticos automatizados, in situ, que no impliquen tratamiento o derivatizaciones, garantizando una menor producción de desechos a ser tratados o eliminados, así como la seguridad en todo momento del operador. Su principal objetivo es obtener (lo mejor posible) información acerca de una muestra sin alterarla o producirle daño (Ver figura 11).

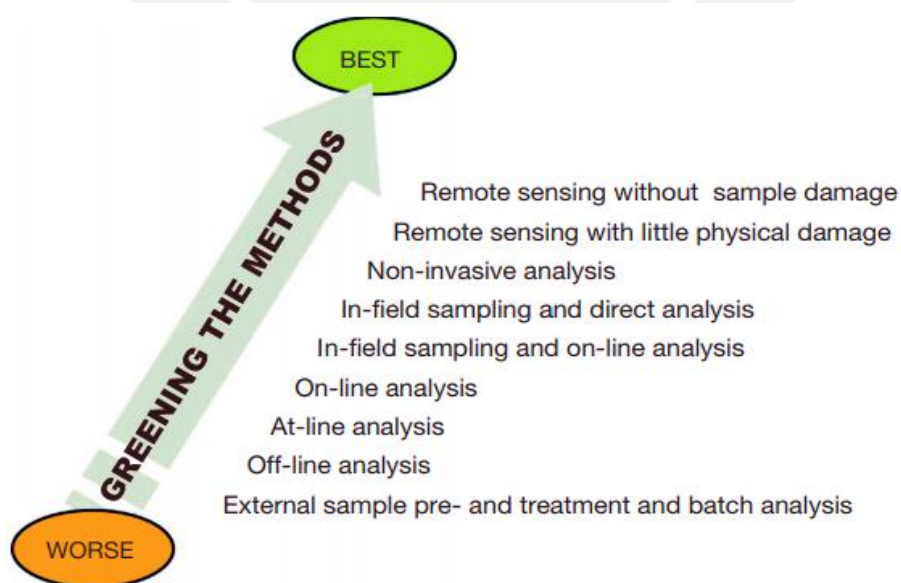


Fig. 11. Organización jerárquica del análisis de muestra según criterios verdes<sup>46</sup>.

### 2.7.3.1 PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE<sup>49,50</sup>

En la figura 12 se presenta los doce principios de la química verde aplicados a la química analítica.

1. Seleccionar una técnica analítica directa
2. Integración analítica de procesos y operaciones
3. Generar la menor cantidad de residuos posibles y tratarlos adecuadamente
4. Evitar el gasto innecesario de energía
5. Implementar automatización y miniaturización de métodos
6. Reactivos obtenidos a partir de recursos renovables
7. Incrementar la seguridad al operador
8. Llevar a cabo mediciones in situ
9. Evitar la derivatización
10. Reducir al mínimo el número de muestras
11. Escoger métodos multianalitos o multiparámetros
12. Eliminar o reemplazar reactivos tóxicos

Fig. 12. Los principios de la química verde aplicados a la química analítica verde

En la figura 13 se pueden observar los esfuerzos realizados a través del tiempo para posicionar la temática verde en el campo de la química, comenzando desde temas genéricos hasta otros más precisos como es la definición de los 12 principios de la química analítica verde.

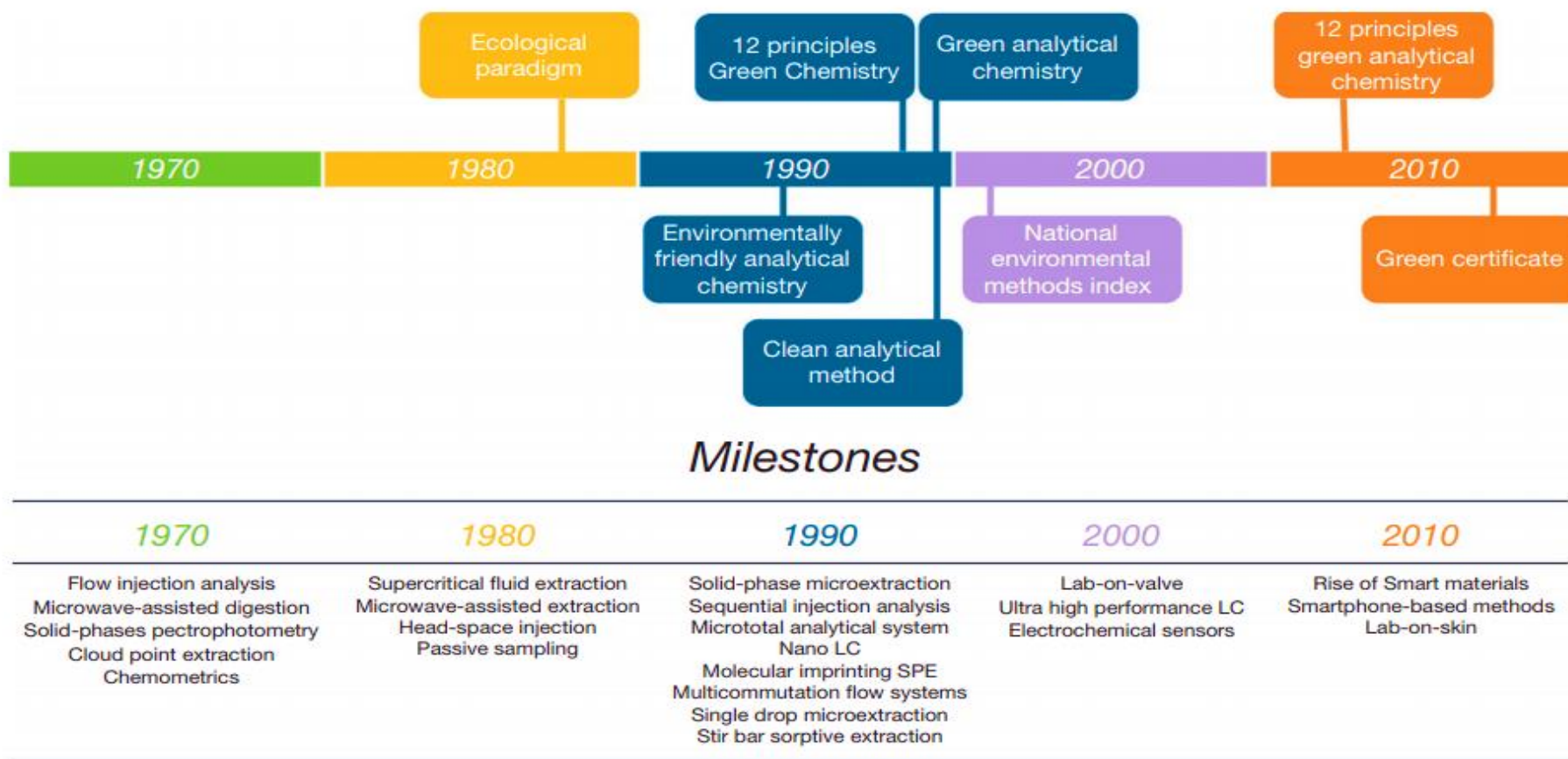


Fig.13. Progreso de la química analítica verde a través del tiempo 4<sup>6</sup>

### 2.7.3.2 SISTEMAS DE MÉTRICAS EN LA QUÍMICA ANALÍTICA VERDE<sup>51,52</sup>

Actualmente muchos analistas químicos publican investigaciones enfocadas en el desarrollo de nuevas metodologías de corte eco amigable indicando que su nuevo procedimiento es verde, sin embargo, muchos no ofrecen una evaluación a través de métricas, así como comparación con el método convencional o estándar. Con el fin de evitar el sesgo y brindar mayor soporte a los estudios llevados a cabo por los investigadores, es que se han desarrollado herramientas para medir cuán ecoamigable resulta un método.

Las métricas más utilizadas en la química verde son el factor de impacto ambiental, la economía atómica y la reacción masa-eficiencia, estas son empleadas para determinar el carácter verde de reacciones de síntesis orgánica.

Para el caso de la evaluación del comportamiento verde de determinados procedimientos analíticos, hay diversos métodos de medición (Ver figura 14), tales como:

#### a) ETIQUETADO NEMI (CUALITATIVO)

Consiste en un círculo de cuatro campos, cada uno refleja diferentes aspectos de la metodología analítica descrita y es llenado de color verde si cumple ciertos requisitos establecidos. Primero, ninguno de los reactivos presenta bioacumulación o efecto tóxico. Segundo, ninguno de los reactivos utilizados está listado como peligroso. Tercero, el pH de las muestras debe estar entre 2 – 12 para evitar efectos corrosivos al medio ambiente. Cuarto, durante el proceso menos de 50 g de desecho es producido.

#### b) ECO ESCALA ANALÍTICA (CUANTITATIVO)

El resultado de la métrica analítica de Ecoescala es el puntaje que se calcula al restar puntos de penalización desde la base de 100 puntos (Ver figura 15). Los puntos de penalización se asignan para grandes cantidades y altos riesgos relacionados con el uso de productos químicos, el alto consumo de energía, los riesgos ocupacionales y la generación de desechos. Los puntos de penalización para cada reactivo se calculan multiplicando el número de pictogramas de peligro GHS por grado de peligro (multiplicación de "advertencia" por 1 y multiplicación por "peligro" por 2).

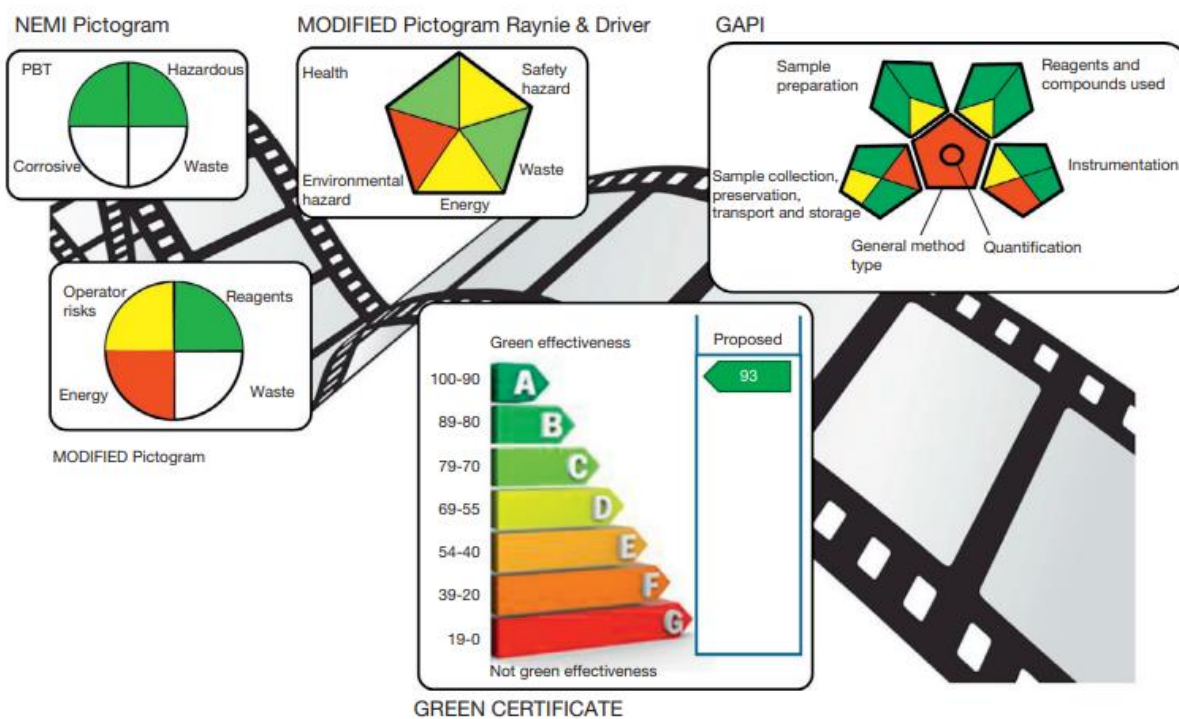


Fig.14. Evolución de los sistemas métricos pictográficos aplicados en la química verde<sup>46</sup>

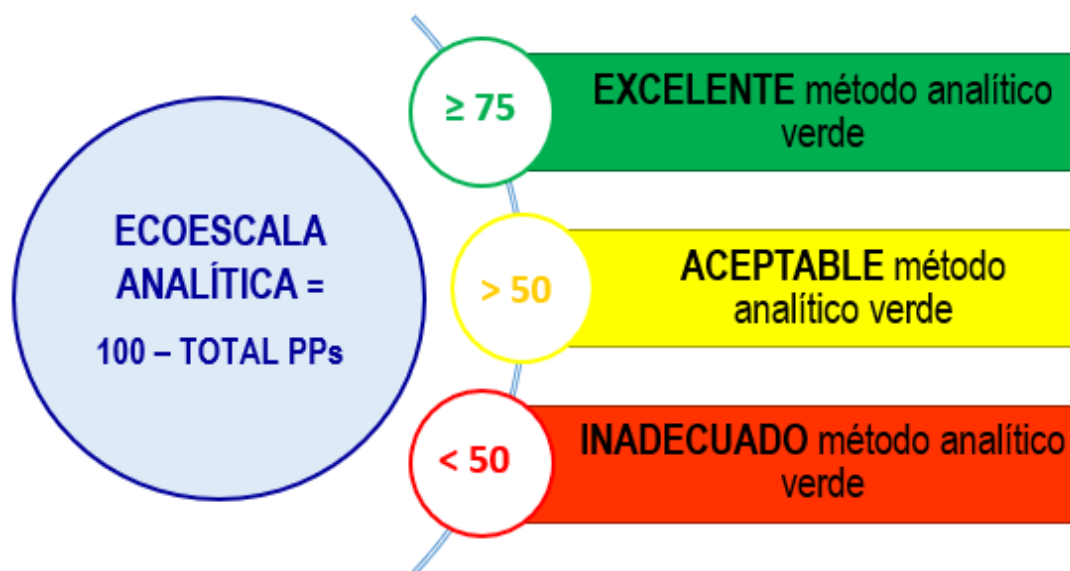


Fig.15. Ecuación aplicada al cálculo de la eco escala analítica. (PPs: puntos de penalidad)

### 2.7.3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA VERDE<sup>53</sup>

La cromatografía líquida no es considerada del todo una técnica verde, debido al uso de solventes para las separaciones. Un cromatógrafo equipado con una columna convencional (15 – 25 cm de largo; 4,6 mm de diámetro y empacada con partículas de 5  $\mu\text{m}$ ) operado a un flujo de 1 mL/min produce aproximadamente 1500 mL de desechos al día, es decir, 500 L al año. Por ello una de las estrategias consiste en la reducción del consumo de solventes orgánicos, así como la modificación de parámetros cromatográficos relevantes (velocidad de flujo, temperatura, tamaño de columna, diámetro de partícula).

Un parámetro que puede ser empleado como una poderosa variable es la temperatura. Es bien conocido que la temperatura afecta la selectividad, eficiencia y detectabilidad de la columna. Se pueden realizar cambios de temperatura durante el desarrollo analítico para comparar otros parámetros como la composición de la fase móvil. La elevación de la temperatura se ha convertido en un parámetro ampliamente utilizado en la HPLC verde. Los cambios de temperatura pueden ser especialmente útiles para compuestos polares y ionizables. Los beneficios de emplear elevadas temperaturas en LC son los siguientes:

1. **VISCOSIDAD:** Las temperaturas elevadas reducen la viscosidad de sistema de solventes, lo cual impacta en la reducción de la presión de columna.
2. **CONTRAPRESIÓN:** La reducción de la contrapresión por el incremento de temperatura permite mayor flujo de la fase móvil, resultando en reducción de tiempos de análisis, optimizando las separaciones.
3. **SOLVENTES ALTERNATIVOS:** Permite el empleo de agua y alcohol como solventes en las fases móviles, debido a la reducción de presión y viscosidad de estos al elevar la temperatura. Su empleo de por sí ya se considera como cromatografía verde.
4. **POLARIDAD:** Mejora de simetría de picos porque el incremento de temperatura reduce las interacciones secundarias el soporte de sílica.
5. **TRANSFERENCIA DE MASA:** la transferencia de masa producida entre la fase móvil y la fase estacionaria es más eficiente por el incremento de temperatura. Permite altos flujos sin pérdida de eficiencia.
6. **FASE ESTACIONARIA:** se pueden sintetizar FE dependientes de temperatura para separaciones más selectivas.
7. **ANALITO:** muchas de sus propiedades son temperaturas dependientes, lo cual puede ser empleado como un criterio separativo importante.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

El estudio es de corte analítico y experimental para lo cual se empleó un estándar primario de referencia de diazepam que sirvió para trazar uno secundario de materia prima utilizado en una fórmula estándar (incluye excipientes) para tabletas de diazepam de 10 mg.

#### **POBLACIÓN Y UNIDAD DE ANÁLISIS**

La población está comprendida por un piloto de formulación para tabletas de diazepam de 10 mg, mientras la unidad de análisis es un piloto de formulación para tabletas de diazepam de 10 mg empleado para la validación del método verde propuesto mediante cromatografía líquida de alta performance.

#### **LABORATORIO EXPERIMENTAL**

El presente estudio fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Química de Carbohidratos del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **METODOLOGÍA APLICADA**

Se desarrolló un método VERDE (ecológico) alternativo al disponible en la monografía de la Farmacopea Americana N° 40 para la valoración (cuantificación) de diazepam en tabletas, basado en el criterio de reemplazo de solvente y modificación de condiciones de temperatura.

#### **3.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

Se contó con equipos calificados y materiales con especificación de alta pureza, necesarios para la aplicación en Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

##### **3.1.1 EQUIPOS**

- Balanza analítica – Acculab Sartorius
- Bomba de vacío – VP34 Rocker 300
- Agitador de tubos y microtubos – Scilogex MX-S
- Potenciómetro – Orion Star A111 ThermoScientific

- Baño de ultrasonido – AMSCO Reliance Sonic 250
- Sistema de filtración al vacío marca Agilent
- Cromatógrafo Líquido marca LaChrom Elite de inyección manual (horno modelo L-2350, bomba cuaternaria modelo L-2130, arreglo de diodos modelo L-2455)
- Software: EZChrome Elite

### 3.1.2 MATERIALES

- Columna cromatográfica marca MERCK modelo LiChrospher 100 RP18e
- Filtros de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , marca Agilent
- Matraces simples de 100 y 250 mL
- Vasos de precipitación de 100 y 250 mL
- Micropipeta de 100 - 1000  $\mu\text{L}$  marca Brand
- Jeringas de 0,3 mL
- Viales ámbar de 20 mL
- Espátulas odontológicas de acero quirúrgico
- Tubos de microprecipitación
- Parafilm

### 3.1.3 REACTIVOS

- Diazepam estándar primario USP
- Diazepam estándar secundario (materia prima)
- Nordazepam marca Cerilleant 1mg/mL (estándar primario)
- Alcohol etílico grado HPLC
- Alcohol metílico grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC

## 3.2 DESARROLLO ANALÍTICO

### 3.2.1 CONDICIONES ANALÍTICAS PRELIMINARES DE ACUERDO A LA FARMACOPEA AMERICANA (USP 40)

Los medios de verificación de la aptitud del sistema cromatográfico consisten en la determinación de tiempos de retención del diazepam y nordazepam, factor resolución no menor a 4 y eficiencia de columna no menor de 5000 platos teóricos, factor asimetría; en general con un RSD no mayor del 2 %.

Preparación de la solución de aptitud del sistema

Se disuelven cantidades apropiadas de estándar de referencia de diazepam USP y nordazepam en metanol, sometidos a baño con ultrasonido para generar una solución con 0,1 mg/mL de cada analito.

Preparación de estándar

Se disuelve cantidad exacta de estándar de referencia de diazepam USP en metanol y se diluye hasta obtener una concentración conocida de 0,1 mg/mL.

- Concentración de trabajo del diazepam : 1 mg/mL
- Velocidad de flujo : 1 mL/min
- Volumen de inyección : 10 µL
- Longitud de onda : 254 nm (arreglo de diodos – UV)
- Longitud de columna : C18; 3,9 mm x 15 cm
- Tamaño de poro (L1) : 5 µm
- Sistema de solventes : MeOH/ACN/Agua (20:40:40)

### 3.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

De acuerdo a la disponibilidad de material y equipamiento, se decidió mantener el tipo de columna cromatográfica, sistema presurizado y longitud de onda de trabajo:

COLUMNA CROMATOGRÁFICA	LiChrospher 100, octadecilsilano, tamaño de partícula de 5 µm, 25 cm de longitud
SISTEMA PRESURIZADO	Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)
LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO	254 nm

#### 3.2.2.1 MODIFICACIÓN DEL SISTEMA DE SOLVENTES

La monografía de la farmacopea americana emplea agua, acetonitrilo y metanol para la cuantificación de diazepam en tabletas, sin embargo, el acetonitrilo, solvente lesivo para el medio ambiente y tóxico para el operario, según las recomendaciones de la cromatografía líquida verde, debe ser reemplazado por otros de fácil eliminación y que no impliquen exposición a trabajador.

Para tal fin primordialmente se ha considerado el etanol grado HPLC de alta pureza el cual fue empleado en diversas proporciones con agua grado HPLC para determinar la performance de las corridas analíticas.

Además, se consideraron otras propuestas como sustancias buffer y líquidos iónicos disponibles.

### 3.2.2.2 MODIFICACIÓN DE TEMPERATURA

La modificación de temperatura brinda ventajas en la disminución de la viscosidad del solvente lo cual se ve reflejado en mayor resolución y menores contrapresiones de columna. Para tal fin se evaluó el comportamiento de las proporciones de solvente empleadas a temperaturas variables considerando la capacidad máxima de temperatura a emplear de acuerdo al tipo de columna utilizada (60 °C)

### 3.2.2.3 MODIFICACIÓN DEL FLUJO

La velocidad de flujo impacta directamente en el tiempo de aparición del pico del analito y por tanto en el gasto global de solvente a utilizar. Para tal fin se emplearon 3 propuestas de sistema de solvente partiendo de 0,5 mL/min hasta 1 mL/min.

Tabla 4. Consolidado de condiciones cromatográficas de trabajo

PARÁMETRO ANALÍTICO		FARMACOPEA AMERICANA (USP)	PROPUESTA ANALÍTICA
<b>A</b>	SISTEMA DE SOLVENTES	MeOH : ACN : H <sub>2</sub> O (20 : 40 : 40)	EtOH (100) EtOH : H <sub>2</sub> O (70:30) EtOH : H <sub>2</sub> O (50:50)
<b>B</b>	TEMPERATURA	25 °C	25 °C, 45 °C, 60 °C
<b>C</b>	VELOCIDAD DE FLUJO	1 mL/min	0,5; 0,75; 1 mL/min
<b>D</b>	TIPO DE COLUMNA	C-18	
<b>E</b>	SISTEMA PRESURIZADO	HPLC	
<b>F</b>	PILOTO DE SELECTIVIDAD	Separación adecuada de picos de diazepam entre otras benzodiazepinas.	

### **3.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TRABAJO**

Las condiciones de extracción del principio activo de los pilotos de tabletas se mantienen de acuerdo a la monografía para valoración de diazepam en tabletas de la farmacopea americana.

#### **PARA TABLETAS COMERCIALES**

Se redujo a polvo alrededor de 20 tabletas, de las cuales se toma una cantidad aproximada al contenido de 10 mg de diazepam, se pasa a un matraz de 100 mL, se añadió 40 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 10 minutos y agitación por 10 minutos a 800 RPM a 25 °C. La muestra fue filtrada y aforada en un matraz.

#### **PARA PILOTO DE FORMULACIÓN**

Se tomó una porción en peso del piloto que contiene excipientes y el principio activo para una cantidad equivalente a 10 mg de diazepam, se pasó a un matraz de 100 mL, se añade 40 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 10 minutos y agitación por 10 minutos a 800 RPM a 25 °C. La muestra fue filtrada y aforada en una fiola.

### **3.2.4 SELECCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Los criterios de selección se basaron de acuerdo a los establecidos por la farmacopea americana, además se realizó el monitoreo de las condiciones de presión, tiempo de retención, resolución de pico y volumen de solvente utilizado. No fue prioritario el factor separación, debido a que la técnica propuesta tiene como fin los análisis de rutina empleados para la valoración de un solo principio activo presente en tabletas.

### **3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO VERDE**

El método analítico seleccionado fue sometido al programa de validación planteado de acuerdo a la normativa internacional para valoración (cuantificación) de ingredientes farmacéuticos activos en presentaciones farmacéuticas (Categoría I), que comprende los parámetros analíticos de exactitud, precisión, selectividad, linealidad, robustez e intervalo.

El registro de la data se realiza en consolidados en tablas EXCEL diseñadas para el procesamiento estadístico y análisis de esta información. Así mismo, la significancia de las pruebas fue procesada en el paquete estadístico MINITAB 17.

## CONDICIONES DE TRABAJO

Se llevó a cabo en condiciones habituales de trabajo a temperatura ambiente de  $25 \pm 5$  °C y humedad relativa no mayor al 70 %.

### 3.3.1 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

La técnica analítica verde para la determinación de diazepam en tabletas comprende las condiciones que se presentan en la tabla 5:

Tabla 5. Parámetros analíticos de la técnica analítica verde propuesta

Sistema presurizado	HPLC
Columna cromatográfica	LiChrospher 100 -C18e 4,6 x 250 mm x 5 $\mu$ m
Longitud de onda	254 nm
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Flujo	1 mL/min
Sistema de solventes	Etanol: H <sub>2</sub> O (70:30)

#### FASE MÓVIL

Se mezclaron los solventes en las proporciones arriba indicadas, se desgasificaron en baño de ultrasonido con posterior filtración al vacío.

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

##### PARA PILOTO DE FORMULACIÓN

Se tomó una porción en peso el piloto que contiene excipientes y el principio activo para una cantidad equivalente a 10 mg de diazepam, se pasó a un matraz de 100 mL, se añadió 40 mL de metanol, se somete a ultrasonido por 10 minutos y agitación por 10 minutos a 800 RPM a 25 °C. La muestra fue filtrada y aforada en una fiola de 100 mL.

#### SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Se transfirió 10 mg de diazepam a una fiola de 100 mL y se agregó metanol hasta enrasar. Se realizaron diluciones sucesivas para lectura.

Observación: durante la preparación de las muestras se debe evitar la aplicación de calor durante el baño de ultrasonido.

### 3.3.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 3.3.2.1 ENSAYO DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Antes de comenzar el programa de validación se aplica la solución de adecuabilidad de sistema (solución estándar de diazepam), que se lleva a cabo mediante 6 inyecciones sucesivas, teniendo como parámetro de evaluación el RSD de las áreas obtenidas.

Especificación: RSD < 2,0 %  
ASIMETRÍA < 2,0 %

#### 3.3.2.2 EXACTITUD

Se evaluó mediante la aplicación de 9 determinaciones en tres niveles de concentración (80 %, 100 % y 120 %). Los valores referenciales para evaluación de la exactitud se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Valores referenciales para evaluación de la exactitud

Concentración	mg de principio activo (diazepam)	mg de placebo (excipientes)
80 %	8 mg	143,6 mg
100 %	10 mg	141,6 mg
120 %	12 mg	139,6 mg

Se considera un peso promedio de tableta de 151,6 mg (incluye excipientes y principio activo)

El principio activo presente en cada muestra es calculado y se determina su porcentaje de recuperación.

Se considera el RSD < 2 % de las áreas obtenidas, así como la prueba T-Student para la comparación de medias al 95 % del nivel de confianza.

#### 3.3.2.3 PRECISIÓN

##### A) PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se realizan 10 mediciones de la solución estándar de diazepam. Se evalúa el RSD de las áreas obtenidas.

Especificación: RSD < 2 %

## B) PRECISIÓN DEL MÉTODO

### REPETIBILIDAD

Se evalúa la solución estándar de diazepam y un grupo de 6 muestras individuales de piloto de formulación de diazepam (peso equivalente a concentración aproximada al 100 %). La solución estándar es inyectada por triplicado y la de muestra por duplicado.

Se considerará el RSD < 2 % así como la prueba de homogeneidad de varianzas al 95 % de confianza.

### PRECISIÓN INTERMEDIA

De manera semejante al ensayo de repetibilidad, se analizan la solución estándar y un grupo de 6 muestras individuales de piloto de formulación de diazepam (peso equivalente a concentración aproximada al 100 %) por cada analista y las determinaciones serán en 2 días distintos.

Se considerará el RSD < 2 % así como la prueba de homogeneidad de varianzas al 95 % de confianza.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	6 muestras individuales	-----
DIA 2	-----	6 muestras individuales

**REPRODUCIBILIDAD** (No aplica)

### 3.3.2.4 LINEALIDAD

Se evalúan 3 curvas de calibración obtenidas al analizar 5 concentraciones de principio activo presente en el piloto de formulación de diazepam. En la tabla 7 se muestra los valores referenciales para evaluación de la linealidad del método.

Tabla 7. Valores referenciales para evaluación de la linealidad del método

Concentración	mg de Principio Activo (Diazepam)	mg de Placebo
80 %	8 mg	143,6 mg
90 %	9 mg	142,6 mg
100 %	10 mg	141,6 mg
110 %	11 mg	140,6 mg
120 %	12 mg	139,6 mg

Se considera un peso promedio de tableta de 151,6 mg (incluye excipientes y principio activo)

Se consideran los siguientes parámetros:

- Curva de calibración: linealidad
- Recta de Regresión:  $y = bx + a$
- Coeficiente de Correlación:  $r > 0,995$
- Coeficiente de determinación:  $r^2 > 0,995$
- Significancia estadística de la varianza de la pendiente b:  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$
- Intervalo de confianza la ecuación propuesta

### 3.3.2.5 ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico indica su capacidad para no resultar afectado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método y así brindar la confiabilidad durante su uso.

Se preparó una muestra a la concentración teórica de 100 % y se evaluó la influencia de los siguientes factores de acuerdo al método de Youden-Steiner, asimismo como en efectos individualizados intragrupo (Ver tablas 8 y 9):

Tabla 8. Factores y sus variantes para la evaluación de la robustez analítica

FACTOR		ESTANDAR	VARIACIÓN 1 (Mayúscula)	VARIACIÓN 2 (Minúscula)
A	Velocidad de flujo	1 mL/min	0,9 mL/min	1,1 mL/min
B	Tiempo de sonicado	10 min	12 min	15 min
C	Temperatura de horno	60 °C	57 °C	55 °C
D	Temperatura de baño maría	25 °C	20 °C	22 °C
E	Tiempo de agitación	10 min	12 min	15 min
F	Longitud de onda	254 nm	252 nm	256 nm
G	Estabilidad	Tiempo 0	Tiempo 12 h	Tiempo 24 h

Tabla 9. Modelo factorial aplicado al diseño experimental de Youden - Steiner

PARÁMETROS	EXPERIMENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	g	g	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g

Se considera un parámetro de efecto significativo cuando presenta un valor mayor a 2,4 veces la desviación estándar relativa (de la repetibilidad):  $> 2,4 Sr$ .

$$\text{Efecto de variable} = + \left| \frac{\sum \text{Variable (+)} - \sum \text{Variable (-)}}{4} \right|$$

Donde:

Variable (+) : Variable en mayúscula (VARIACIÓN 1)

Variable (-) : Variable en minúscula (VARIACIÓN 2)

La Sr (desviación estándar relativa) de la repetibilidad se obtiene al realizar el análisis de la precisión del método.

### 3.3.2.6 SELECTIVIDAD

Se evalúa la presencia de picos anómalos mediante la evaluación de los componentes de la fórmula piloto.

PRUEBA 1	Placebo
PRUEBA 2	Diluyente
PRUEBA 3	Principio activo
PRUEBA 4	Principio activo + placebo

### **Preparación de la muestra 1: Placebo**

El placebo está constituido por los siguientes excipientes: almidón de maíz, lactosa monohidratada, gelatina granulada, caolín, estearato de magnesio y talco en proporciones de acuerdo a fórmula reservada. El procedimiento de trabajo es el mismo para la extracción en tabletas como solución de trabajo: se trasvasa y enrasa a una fiola de 50 mL para su posterior análisis. Previamente a la inyección, la muestra es filtrada.

### **Preparación de la muestra 2: Diluyente**

El metanol utilizado para la extracción del principio activo de la formulación de piloto, es empleado para evaluar su posible interferencia en la lectura analítica realizada.

### **Preparación de la muestra 3: Principio activo**

Se evalúa la solución de estándar de diazepam, según el procedimiento de preparación descrito previamente: 10 mg de diazepam en una fiola de 100 mL, se usa como diluyente metanol, de requerirlo se emplea baño de ultrasonido y posterior paso por filtros de membrana de 0,45 µm.

### **Preparación de la muestra 4: Principio activo + Placebo**

Se utiliza la solución de trabajo pesada para una cantidad aproximada de 10 mg de diazepam, el cual es extraído en metanol mediante la aplicación de baño de ultrasonido y posterior agitación a 800 rpm por 10 minutos. La muestra es filtrada y enrasada a una fiola de 100 mL.

El criterio de evaluación se basa en la aparición de picos anómalos correspondientes a al placebo, diluyente o por la interacción principio activo – placebo.

### **3.3.2.7 RANGO**

Se establece a partir de los valores obtenidos de la curva lineal validada. Debe cumplir con el intervalo analítico establecido por la farmacopea americana para diazepam < 90 – 100 >.

## **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Pruebas estadísticas a aplicar, regla de decisión y pruebas de hipótesis

(Para todos los casos se considera un nivel de confianza del 95 %)

A. PRUEBA DE NORMALIDAD DE ANDERSON DARLING (PRUEBA A-D)

Se basa en las desviaciones de las distribuciones acumuladas experimentales respecto a las teóricas o supuestas.

$H_0$ : Los datos presentan distribución normal

$H_1$ : Los datos no presentan distribución normal

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

## B. PRUEBAS DE COMPARACIÓN DE MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL PARA 1 GRUPO CON 1 VALOR

PRUEBA DE T-STUDENT (si presenta distribución normal)

$H_0: \bar{X} = \mu_0$

$H_1: \bar{X} \neq \mu_0$

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

PRUEBA DE WILCOXON (si no presenta distribución normal)

$H_0: Me = \mu_0$

$H_1: Me \neq \mu_0$

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

## C) PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

PRUEBA DE BARLETT (si presenta distribución normal)

$H_0: S_1 = S_2$

$H_1: S_1 \neq S_2$

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

PRUEBA DE LEVENE (si no presenta distribución normal)

$H_0: S_1 = S_2$

$H_1: S_1 \neq S_2$

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

## D. PRUEBAS PARA COMPARACIÓN DE MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL PARA 2 GRUPOS

PRUEBA DE T-STUDENT (comparación de 2 medias si presentan distribución normal)

$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$

$H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$

Si el p-valor  $< 0,05$  se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

PRUEBA DE MANN WHITNEY (comparación de 2 mediana si no presenta distribución normal)

$$H_0: Me_1 = Me_2$$

$$H_1: Me_1 \neq Me_2$$

Si el p-valor < 0,05 se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_1$

#### E. PRUEBAS PARA COMPARACIÓN DE MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL TRES O MÁS GRUPOS

PRUEBA ANOVA (Comparación de 3 a más medias)

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 \dots$$

$$H_1: \sim (\bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 \dots)$$

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS (Comparación de 3 a más medianas)

$$H_0: Me_1 = Me_2 = Me_3 = Me_4 \dots$$

$$H_1: \sim (Me_1 = Me_2 = Me_3 = Me_4 \dots)$$

#### F. ANALISIS POR REGRESIÓN LINEAL

Del modelo  $y = ax + b$

La correlación (R) entre variable independiente y dependiente debe ser mayor al 0,995, mientras el porcentaje de correlación (% R) debe ser mayor al 99.5 %.

Se analizarán los residuos obtenidos a partir de los datos ingresados para obtener la curva de regresión.

Supuestos que deben cumplir los residuos:

- Independencia
- Homocedasticidad (igualdad de varianzas)
- Normalidad

Finalmente, se establece el intervalo considerando un nivel de confianza del 95 %.

En la tabla 10 se presenta el análisis estadístico consolidado para cada parámetro de validación. En la figura 16 se muestra gráficamente la descripción de las reglas de decisión y técnicas estadísticas a aplicar para la evaluación de 2 o más grupos de acuerdo con el criterio de análisis previo de la distribución normal, homogeneidad de varianzas y finalmente comparación de medias o medianas.

Tabla 10. Análisis estadístico consolidado

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION
<b>ESPECIFICIDAD</b>	Cualitativo (presencia o ausencia de interferencia)
<b>EXACTITUD</b>	• Porcentaje de recuperación Entre 90 a 110 %
	• RSD < a 2 %
	• Test de T de Student exp < T tablas
<b>PRECISIÓN</b>	• <b>Precisión del Sistema:</b> RSD < 2 %
	• <b>Precisión del Método:</b> - Repetibilidad: RSD < 2 % - Intervalo de Confianza - Precisión intermedia: CV entre 2 analistas < 2 %
<b>LINEALIDAD</b>	<b>Curva de Calibración</b>
	• $y = bx + a$
	• "r": Mínimo 0,99
	• "r <sup>2</sup> ": Mínimo 0,99
	• <b>Análisis de la Varianza</b>
	• Test de G de Cochran exp < G tablas
	• <b>Test de linealidad</b>
	C.V. F. Respuesta < 5 %
	T exp > T tablas
• <b>Test de proporcionalidad</b>	
Límite de Confianza del Intercepto debe incluir al cero. T exp < T tablas	
<b>ROBUSTEZ</b>	FACTOR SIGNIFICATIVO > 2,4 Sr

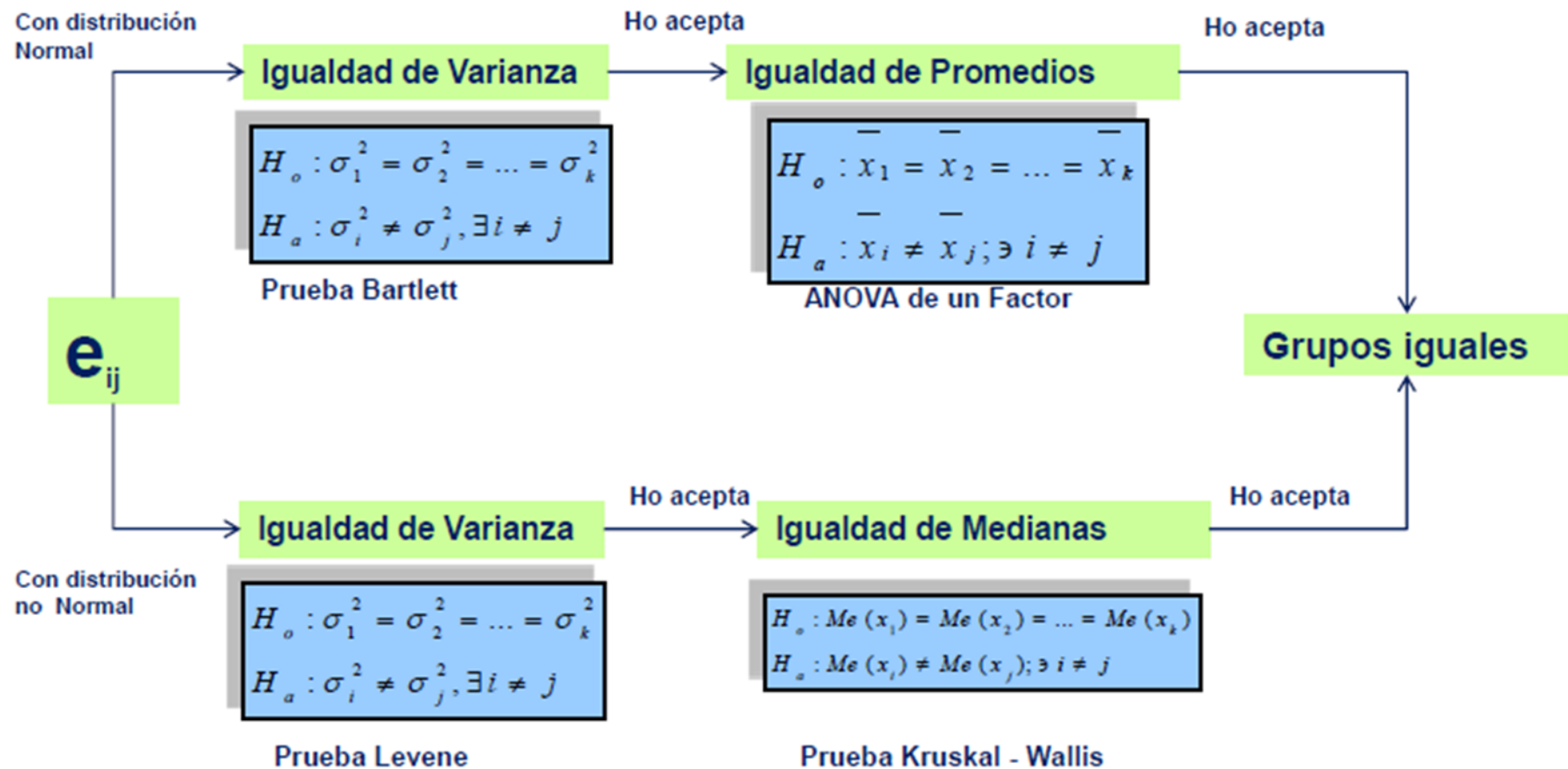


Fig. 16. Descripción de las reglas de decisión y técnicas estadísticas a aplicar para la evaluación de 2 o más grupos de acuerdo al criterio de análisis previo de la distribución normal, homogeneidad de varianzas y finalmente comparación de medias o medianas (J. Camero)

### 3.5 APLICACIÓN DEL SISTEMA DE MÉTRICAS VERDES

#### 3.5.1 PICTOGRAMAS NEMI

Está constituido por cuatro campos (Ver figura 17). Cada uno refleja un aspecto de la metodología analítica y este campo es llenado de color verde si cumple con los requerimientos que se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Requerimientos de evaluación verde por pictograma NEMI

<b>1er REQUERIMIENTO: PBTs</b> (sustancias persistentes bioacumulativas y tóxicas)	Ninguno de las sustancias químicas empleadas está presente en la lista de sustancias persistentes, bioacumulativas y tóxicas de la EPA.
<b>2do REQUERIMIENTO</b> <b>Hazardous análisis</b> (análisis de la peligrosidad)	Ninguna de las sustancias químicas empleadas está en las listas de desechos peligrosos de la EPA.
<b>3er REQUERIMIENTO</b> <b>Corrosividad</b>	El pH de la muestra debe estar entre 2 – 12 para evitar un ambiente altamente corrosivo durante el análisis
<b>4to REQUERIMIENTO</b> <b>Desperdicios</b>	Durante el proceso, se producen menos de 50 g de desechos

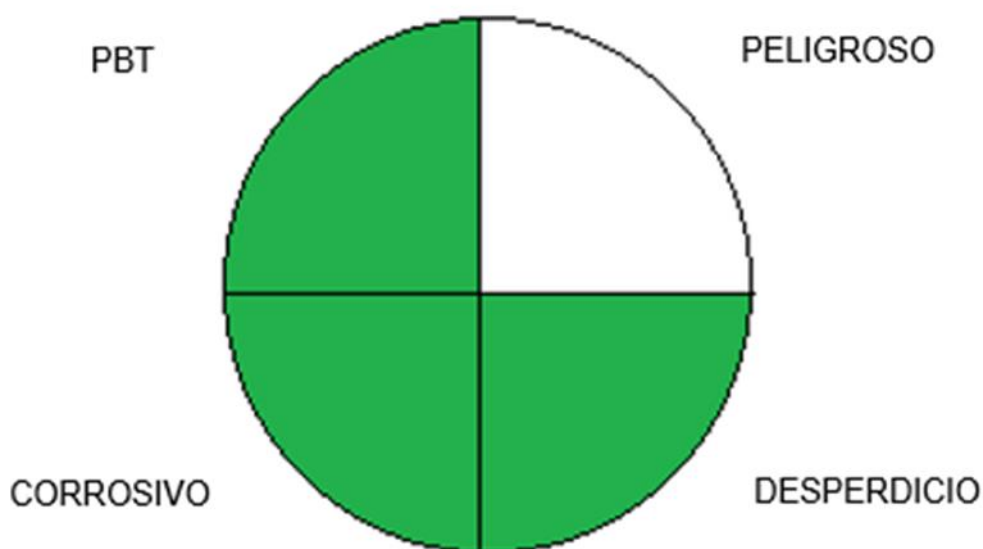


Fig. 17. Modelo del pictograma NEMI para evaluación cualitativa verde.

### 3.5.2 ECOESCALA ANALÍTICA

En la tabla 12 se presenta los criterios para la determinación de los puntos de penalidad aplicados al cálculo de la Eco-escala analítica.

Tabla 12. Puntos de penalidad aplicados al cálculo de la ecoescala analítica

		PUNTOS DE PENALIDAD	
		SUBTOTAL	TOTAL
<b>REACTIVOS</b>			
<b>CANTIDAD</b>	< 10 mL (<10 g)	1	$PP_{(CANTIDAD)} \times$ $PP_{(PELIGRO)}$
	10 - 100 mL (10 - 100 g)	2	
	> 100 mL (> 100 g)	3	
<b>PELIGRO</b>	Ninguno	0	
	Poco severo	1	
	Muy severo	2	
<b>INSTRUMENTOS</b>			
<b>ENERGÍA</b>	< 0,1 kWh por muestra	0	
	< 1,5 kWh por muestra	1	
	> 1,5 kWh por muestra	2	
<b>RIESGO OCUPACIONAL</b>	Hermetización del proceso analítico	0	
	Emisión de vapores a la atmósfera	3	
<b>DESPERDICIO</b>	Ninguno	0	
	< 1 mL (< 1 g)	1	
	(1 - 10 g) o mL	3	
	> 10 mL (> 10 g)	5	
	Reciclaje	0	
	Degradación	1	
	Pasivación	2	
	No tratamiento	3	

Los puntos de penalidad para los solventes orgánicos a emplear en las técnicas analíticas cromatográficas se calculan mediante el número de pictogramas en su etiquetado, si presentan el rótulo de WARNING se multiplica por 1 y si presentan el rótulo de DANGER se multiplica por 2 (Ver figura 18).

Solvents/Reagents	Pictograms	Signal	Penalty Points
dichloromethane		warning	2
hexane		danger	8
diethyl ether		danger	4
methanol		danger	6
ethyl acetate		danger	4
MTBE		danger	4
acetone		danger	4
benzene		danger	6
isooctane		danger	8
acetonitrile		danger	4
isopropanol		danger	4
toluene		danger	6
chloroform		danger	2
elemental mercury		danger	8

Fig. 18. Puntos de penalidad para algunos solventes y reactivos<sup>51</sup>

## IV. RESULTADOS

### DESARROLLO ANALÍTICO

La columna recomendada y descrita por la farmacopea americana N° 40 para la valoración de diazepam en tabletas corresponde a la L1 con relleno de C18 (octadecilsilano), la columna utilizada fue del mismo tipo de soporte, pero dimensiones diferentes. En la tabla 13 se presenta las características de la columna empleada y la recomendada por el método normalizado USP.

Tabla 13. Características de columna empleada

CARACTERÍSTICA	COLUMNA CROMATOGRÁFICA	
	METODO NORMALIZADO USP	METODO VERDE PROPUESTO
RELLENO	Octadecilsilano (C18)	Octadecilsilano (18)
DIMENSIONES	3,9 mm x 15 cm	4,6 x 25 cm
DIAMETRO DE PARTICULA	5 – 10 µm	5 µm
RANGO DE pH	No especifica	2 – 7.5
PRESIÓN MÁXIMA	No especifica	250 bar
VOLUMEN DE MUESTRA	No especifica	5 – 80 µL
TEMPERATURA MÁXIMA DE TRABAJO	No especifica	60 °C

En las tablas 14 y 15 se muestra los resultados de la evaluación preliminar de la presión en relación con la temperatura y flujo para diferentes proporciones EtOH/H<sub>2</sub>O.

Tabla 14. Evaluación preliminar de la presión en relación a temperatura y flujo para la proporción EtOH / H<sub>2</sub>O (50:50)

Solvente	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)	Presión (psi, bar)
EtOH / H <sub>2</sub> O 50:50	25	0,5	3300 psi (227 bar)
		0,75	> 3600 psi (248 bar)
		1	> 3600 psi (248 bar)
	45	0,5	2545 psi (175 bar)
		0,75	> 3600 psi (248 bar)
		1	> 3600 psi (248 bar)
	60	0,5	1700 psi (117 bar)
		0,75	3300 psi (227 bar)
		1	> 3600 psi (248 bar)

Tabla 15. Evaluación preliminar de la presión en relación a temperatura y flujo para la proporción EtOH / H<sub>2</sub>O (100:0)

Solvente	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)	Presión (psi, bar)
EtOH / H <sub>2</sub> O (100 : 0)	25	0,5	1540 psi (106 bar)
		0,75	2375 psi (163 bar)
		1	3220 psi (221 bar)
	45	0,5	1180 psi (80.9 bar)
		0,75	1832 psi (126 bar)
		1	2498 psi (172 bar)
	60	0,5	1020 psi (70 bar)
		0,75	1375 psi (94.8 bar)
		1	1840 psi (126 bar)

De los resultados obtenidos se desprende que las proporciones de etanol-H<sub>2</sub>O deberán ir en el rango de 100 : 0 a 50 : 50, considerando que la temperatura y el flujo a seleccionar influyen en la presión ejercida a la columna.

En la tabla 16 se muestra los resultados de la evaluación preliminar de la velocidad de flujo en relación a la proporción de solventes.

Tabla 16. Evaluación preliminar de la velocidad de flujo en relación a la proporción de solventes

GRUPO	EtOH : H <sub>2</sub> O	FLUJO (mL/min)
GRUPO 1	50 : 50	0,50
		0,75
GRUPO 2	60 : 40	0,50
		0,75
GRUPO 3	70 : 30	0,50
		0,75
		1,00

El análisis se realiza con el estándar de diazepam a 10 mg/mL según tiempos de retención y asimetría de picos a 60 °C.

En la tabla 17 se describe los parámetros analíticos observados en el análisis de flujo para las diferentes proporciones de solventes.

Tabla 17. Descripción de parámetros analíticos en el análisis de flujo a diversas proporciones de solventes.

<b>ANALITO: Diazepam</b>					
<b>Proporción EtOH - H<sub>2</sub>O</b>	<b>FLUJO (mL/min)</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>ASIMETRÍA</b>	<b>N° PLATOS</b>	<b>OBSERVACIÓN</b>
50 - 50	0,5	11,25	1,085	6144	Pico ligeramente ensanchado en la base (lado derecho e izquierdo)
	0,75	7,22	0,97	5056	Asimetría ligera en zona lateral derecha
60 - 40	0,50	7,52	1,01	4516	Pico ensanchado en la base (lado derecho e izquierdo)
	0,75	4,87	0,97	4504	Pico más uniforme y base menos ensanchada
	1,00	3,70	1,19	4088	Pico muy asimétrico en lado derecho
70 - 30	0,50	-	-	-	Pico demasiado ancho
	0,75	4,92	1,18	5626	Pico definido, cubre área de selección
	1,00	2,96	1,22	5680	Pico mejor definido, cubierto por el área de selección para integración

Los valores presentados corresponden a los promedios de 3 lecturas

De lo reportado, desde un análisis de platos teóricos, se podría optar por la proporción EtOH-H<sub>2</sub>O 50:50 a un flujo de 0,75 mL/min, así como a la proporción 70 : 30 a 1 mL/min. Posteriormente, se considera referencialmente la capacidad separativa para poder discriminar, entre otros, benzodiazepinas, se usa como comparativo el nordazepam, empleado en la farmacopea americana para las pruebas de aptitud.

#### FACTOR SELECTIVIDAD (CUALITATIVO)

Las figuras 19 a 23 muestran los cromatogramas obtenidos en los ensayos para determinar el factor de selectividad.

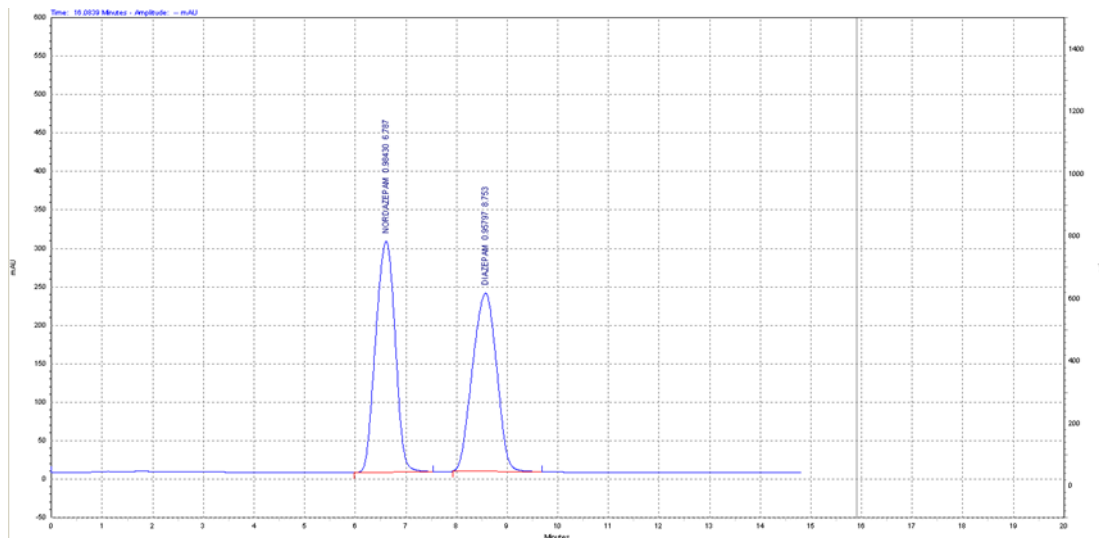


Fig. 19. Método USP – Separación Nordazepam – Diazepam  
 $[t_R(\text{nordazepam}): 6,787 \quad ; \quad t_R(\text{diazepam}): 8,753]$

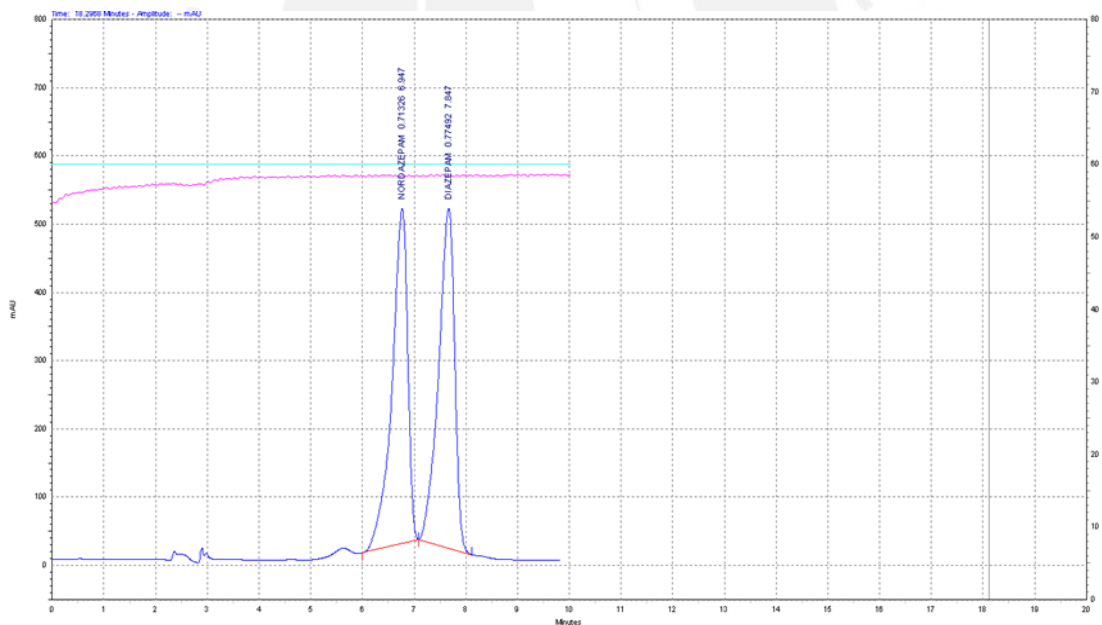


Fig. 20. Método VERDE – EtOH:H<sub>2</sub>O (50:50) Separación Nordazepam – Diazepam  
 $[t_R(\text{nordazepam}): 6,947 \quad ; \quad t_R(\text{diazepam}): 7,847]$

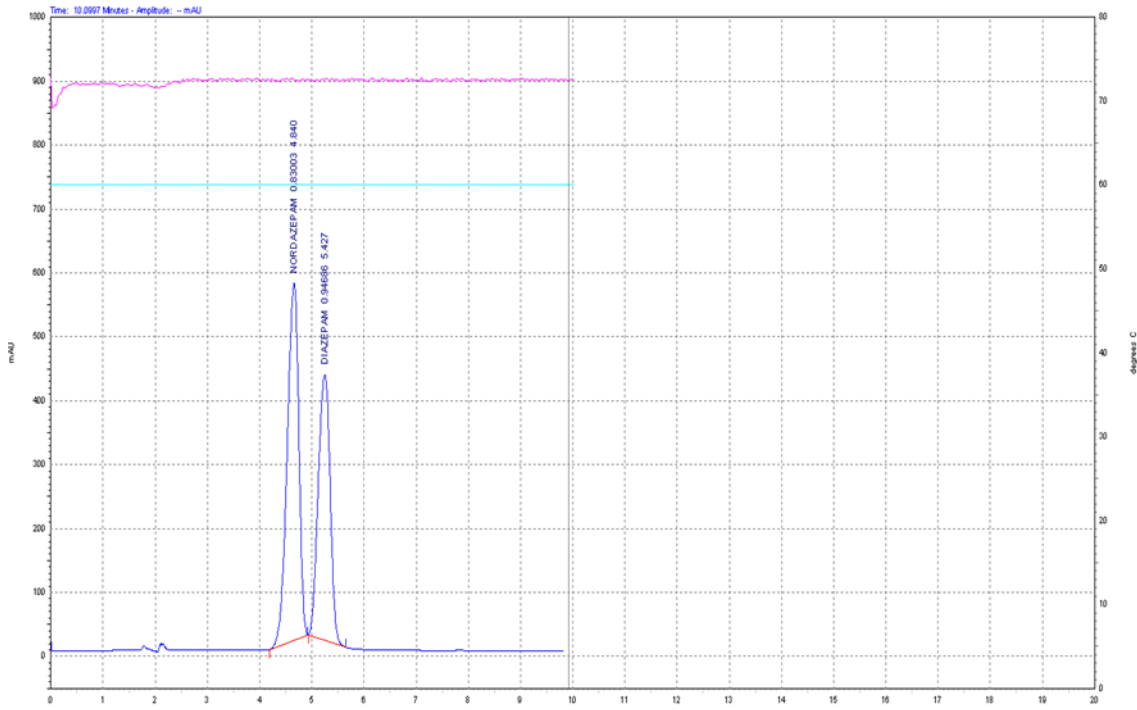


Fig.21. Método VERDE – EtOH:H<sub>2</sub>O (70:30) Separación Nordazepam – Diazepam  
 [t<sub>R</sub>(nordazepam): 4,840 ; t<sub>R</sub>(diazepam): 5,422]

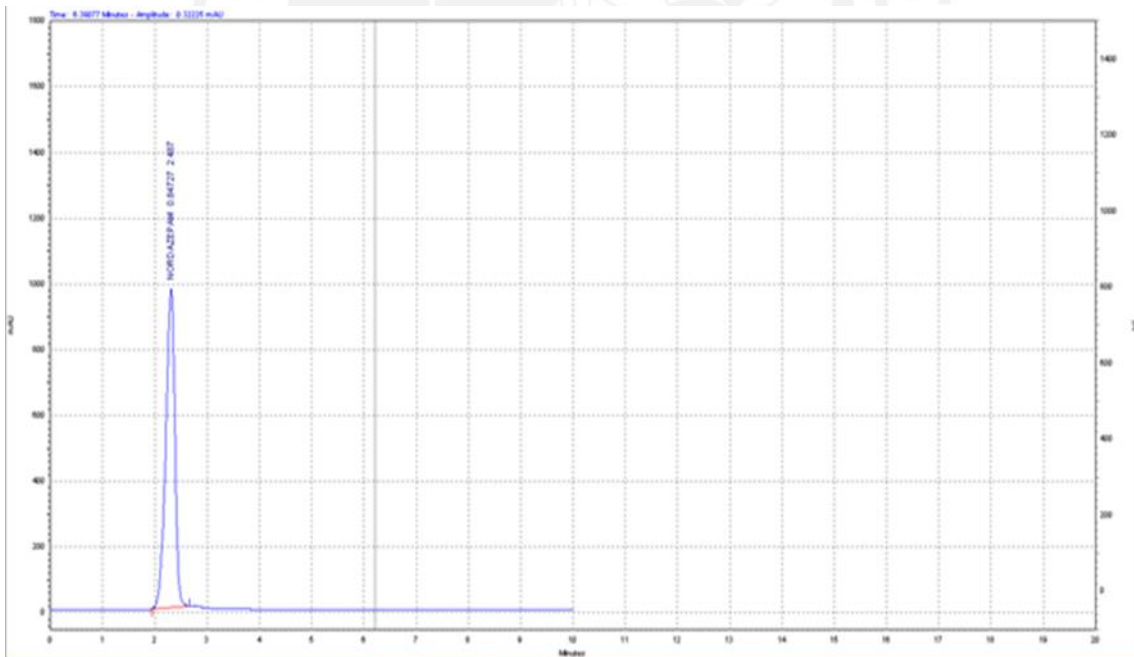


Fig. 22. Método VERDE – EtOH:H<sub>2</sub>O (70:30) a flujo 1 mL/min [t<sub>R</sub>(nordazepam): 2,487]

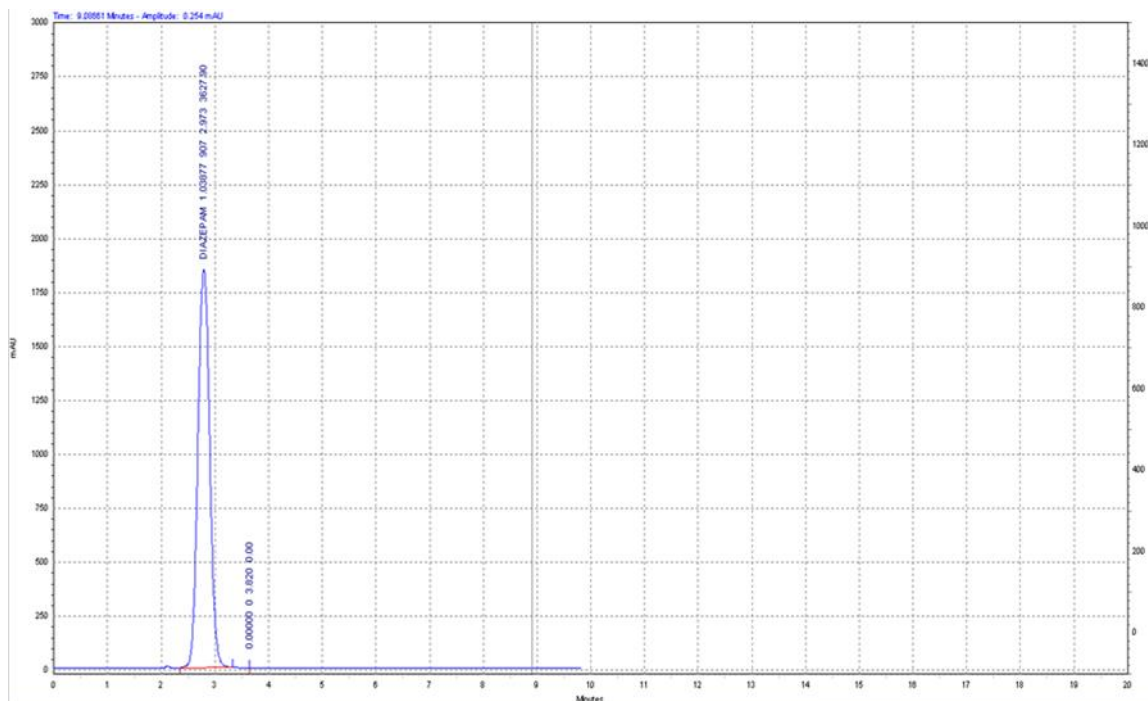


Fig. 23. Método VERDE – EtOH:H<sub>2</sub>O (70:30) a flujo 1 mL/min.  $t_R$ (diazepam): 2,973

Si bien el método normalizado es más marcado en la separación, mediante el método verde aplicado también se pueden identificar ambas benzodiazepinas, pese a la cercanía. Además, el método en sí se focaliza más en la capacidad de identificación y cuantificación, mas no en la separación selectiva de varias benzodiazepinas.

Al realizar las réplicas se observó que la proporción EtOH : H<sub>2</sub>O (50:50) tendían a ensancharse en la base luego de la 5<sup>ta</sup> aplicación, por lo que dejaban de ser reproducibles, situación que no se presentaba con la proporción EtOH : H<sub>2</sub>O (70:30).

### PROPUESTAS DE OPTIMIZACIÓN

Se emplearon en la fracción acuosa del solvente EtOH : H<sub>2</sub>O (70:30).

- Aplicación de buffer fosfato 0,01M; pH = 3

Requería filtraciones periódicas, lavados extensos para evitar restos de buffer en los conductos y columna.

Generó pobre resolución de pico, produciéndose ensanchamiento.

Necesariamente se debía trabajar a 60 °C, por el incremento de la viscosidad de la fase móvil.

- Aplicación de buffer acetato 2 %; pH = 3,5

Requería filtraciones periódicas, lavados extensos para evitar restos de buffer en los conductos y columna.

Generó pobre resolución de pico, se produjo ensanchamiento.

Necesariamente se debía trabajar a 60 °C, por el incremento de la viscosidad de la fase móvil.

- Aplicación de líquido iónico (IL: [BMIm]BF<sub>4</sub>) al 1 %

Requería filtraciones periódicas, lavados extensos para evitar restos de solución en los conductos y columna.

Generó pobre resolución de pico, produciéndose ensanchamiento

Necesariamente debía prepararse en un solo recipiente porque la incorporación del líquido iónico al etanol tiende a producir abundantes burbujas por lo que requiere desgasificación previa.

Necesariamente debía trabajarse a 60 °C, por el incremento de la viscosidad de la fase móvil.

En la tabla 18 se presenta las condiciones cromatográficas seleccionadas para la técnica analítica verde propuesta. En la figura 24 se muestra el cromatograma obtenido para el diazepam aplicando la técnica analítica verde propuesta.

Tabla 18. Condiciones cromatográficas seleccionadas para la técnica analítica verde

PARAMETROS	CARACTERÍSTICAS
MODO DE ELUCIÓN	Isocrático
COLUMNA	Octadecilsilano (C18), 5 µm Dimensiones: 4,6 mm x 250 mm
SISTEMA PRESURIZADO	HPLC
TEMPERATURA DEL HORNO	60 °C
FLUJO	1 mL/min
SISTEMA DE SOLVENTES	EtOH: H <sub>2</sub> O (70:30)
VOLUMEN DE INYECCIÓN	10 µL
LONGITUD DE ONDA	254 nm
MUESTREO	manual
TIEMPO DE CORRIDA	5 minutos

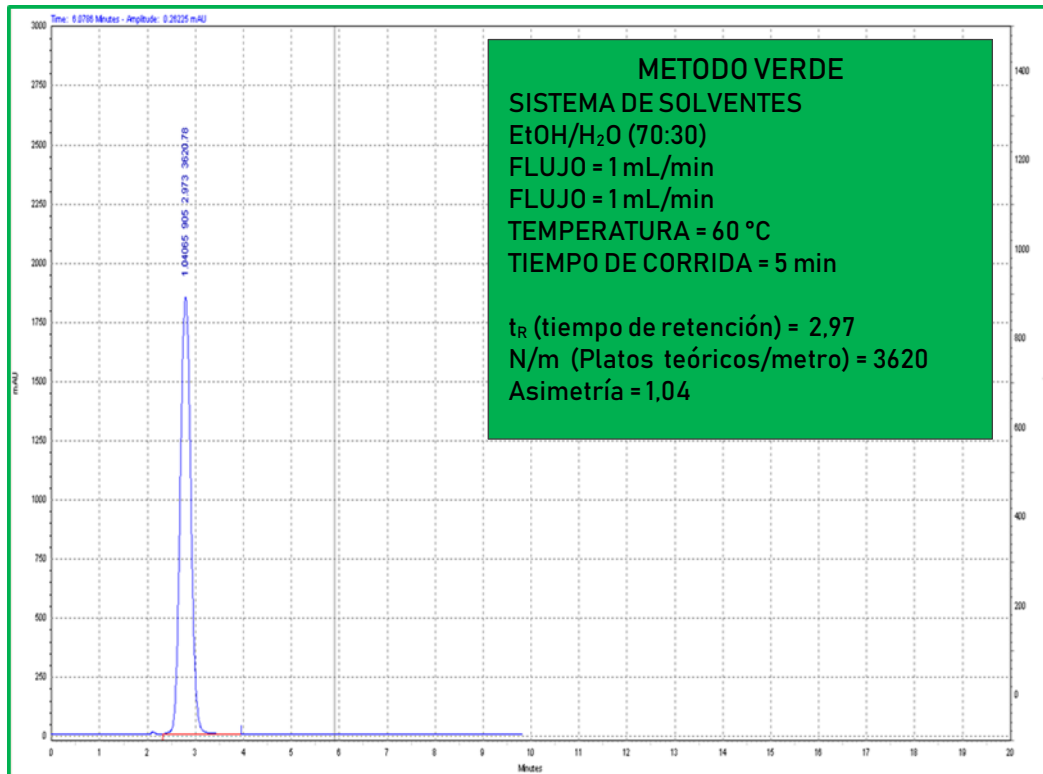


Fig. 24. Cromatograma del diazepam aplicando de metodología verde desarrollada

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO VERDE

### APTITUD DEL SISTEMA

Estándar de referencia	
Nombre:	DIAZEPAM
Lote:	JOJ208
Pot. P/T (%):	99,99
St1 (mg):	10,18

Tabla 19. Resultados de las inyecciones de estándar de diazepam

Nro de Inyección	Área de Diazepam	Cantidad
1	1423,908076	0,000007147219
2	1434,894156	0,000007092497
3	1431,233088	0,000007110639
4	1436,034745	0,000007086863
5	1427,173033	0,000007130868
6	1429,047285	0,000007121515
	Promedio	0,000007114934
	CV (%) o RSD	<b>0,324</b>

**ESPECIFICACION:** CV o RSD < 2 %

#### Diluciones de Estándar

$$\frac{10,2}{100} \times \frac{1}{10} \times \frac{99,99}{100} = 0,010$$

En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos a partir de inyecciones sucesivas del estándar de diazepam, realizadas para evaluar la aptitud del sistema cromatográfico, operación previa al proceso de validación.

## 1. EXACTITUD

VALORACIÓN DE: :Diazepam  
 MÉTODO :HPLC - UV/VIS  
 TÉCNICA ANALÍTICA : TVAL-PUCP2018-V01

Estándar de referencia	
Nombre	DIAZEPAM
Pot. (%)	99,99
WST1=	10,2
WST2=	10,4

Tabla 20. Resultados de las inyecciones de estándar de diazepam para exactitud

N° de Inyecciones	Área de Diazepam	Cantidad
1	1406,4717	0.007229
2	1415,8318	0.007181
3	1400,3321	0.007260
1	1447,5499	0.007165
2	1459,3041	0.007107
3	1439,0481	0.007207
<b>Promedio</b>		<b>0,007191</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>0,745806</b>

Tabla 21. Porcentajes de recuperación para la evaluación de exactitud en muestras

Porcentaje de Analito Teórico	Peso (mg)	Área de Diazepam	mg de Analito hallado	Porcentaje de recuperación (%)
<b>Exactitud 80 %</b>	7,9865	1118,6242	8,044	100,72558
	8,0039	1125,0220	8,090	101,08144
	8,0006	1121,2424	8,063	100,78341
<b>Exactitud 100 %</b>	10,0061	1404,2796	10,099	100,92548
	10,0641	1411,5992	10,151	100,86687
	10,0495	1406,3099	10,113	100,63491
<b>Exactitud 120 %</b>	12,0131	1689,0402	12,147	101,11066
	12,0131	1683,8990	12,110	100,80290
	12,0329	1687,6912	12,137	100,86333
<b>PROMEDIO</b>				<b>100,86607</b>
<b>RSD(%)</b>				<b>0,15428</b>

En las tablas 20 y 21 se observan los resultados correspondientes a los análisis realizados a muestras en 3 porcentajes de concentración y el estándar de comparación, para la prueba de exactitud del método analítico.

## 2. PRECISIÓN

### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Estándar de referencia	
<b>Nombre:</b>	DIAZEPAM
<b>Lote:</b>	JOJ208
<b>Pot. P/T (%):</b>	<b>99,99</b>
<b>St1 (mg):</b>	10,18

Tabla 22. Resultados del estándar de diazepam para la precisión del sistema

Nro de Inyección	Área de Diazepam	Cantidad
1	1423,90808	0,00000715
2	1434,89416	0,000007092
3	1420,01047	0,000007167
4	1431,23309	0,000007111
5	1418,74264	0,000007173
6	1454,16176	0,000006999
7	1444,13886	0,000007047
8	1436,03474	0,000007087
9	1427,17303	0,000007131
10	1429,04728	0,000007122
	Promedio	0,000007108
	CV (%)	<b>0,761</b>

**ESPECIFICACION:** CV o RSD < 2 %

En la evaluación de la precisión se considera la precisión del sistema cromatográfico (tabla 22) la cual se evalúa a través de la evaluación del RSD de los resultados de inyecciones sucesivas de estándar de diazepam.

**PRECISIÓN DEL MÉTODO**  
**REPETIBILIDAD**

Estándar de referencia		
Nombre	DIAZEPAM	
Lote	J0J208	
Potencia (%)	99,99	
Peso (mg)	ST 1	10,2
	ST 2	10,4

Tabla 23. Resultados del estándar de diazepam para evaluación de repetibilidad

N° de Inyección	Área de Diazepam	Cantidad
1	1406,4717	0.007229
2	1415,8318	0.007181
3	1400,3321	0.007260
1	1447,5499	0.007165
2	1459,3041	0.007107
3	1439,0481	0.007207
Promedio		0,007191
RSD (%)		0,745806

Tabla 24. Resultados para la evaluación de repetibilidad en muestras

MUESTRA	Peso de Muestra (mg)	Área de Diazepam	g/100 g
1	151,70	14235,3402	6,7476
		14211,7927	6,7365
2	151,80	14463,7377	6,8514
		14608,8413	6,9201
3	152,10	13948,1758	6,5941
		14007,9900	6,6224
4	151,80	14003,6651	6,6334
		14067,4990	6,6637
5	151,70	14255,9723	6,7574
		14254,5702	6,7567
6	152,00	14122,7561	6,6810
		14138,3626	6,6884
		<b>PROMEDIO</b>	<b>6,7211</b>
		<b>s</b>	<b>0,0952</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>1,4159</b>

CV o RSD < 2 %

Especificación: 5.93 - 7.26 g de PA por cada 100 g de tableta (90,0 – 110,0 %)

$$g/100 g = \frac{\text{Factor st} \times \text{Factor MP} \times \text{Área de MP}}{\text{peso de muestra} \times \text{Área de estándar}}$$

Intervalo de Confianza:  $X \pm t s / \sqrt{n}$   
 X= 6,7211 (promedio)  
 $t_{\text{tabla}} = 2,571$  (para n-1 grado de libertad y  $\alpha = 0,05$ )  
 s= 0,0952 (desviación estandar)  
 n= 6,0000 (número de muestra)

Intervalo de Confianza = 6,62116152 - 6,820973885

En las tablas 23 y 24 se observan los resultados correspondientes a los análisis realizados a muestras y el estándar de diazepam, para la prueba de repetibilidad del método analítico propuesto.

### PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla 25. Resultados del estándar de diazepam por analista para la prueba de precisión intermedia

PRIMER ANALISTA			SEGUNDO ANALISTA		
Estándar de Referencia Nombre :DIAZEPAM Lote :J0J208 'Pot. % :99,99 St1 (mg): 10,167 St2 (mg): 10,371			Estándar de Referencia Nombre :DIAZEPAM Lote :J0J208 'Pot. % :99,99 St1 (mg): 10,259 St2 (mg): 10,198		
RESULTADOS			RESULTADOS		
Estándar	Área de Diazepam	Cantidad	Estándar	Área de Diazepam	Cantidad
1	1406,4717	0,007229	1	1437,4067	0,0071372
2	1415,8318	0,007181	2	1436,4077	0,0071421
3	1400,3321	0,007260	3	1437,2204	0,0071381
1	1447,5499	0,007165	1	1421,4760	0,0071742
2	1459,3041	0,007107	2	1421,6426	0,0071734
3	1439,0481	0,007207	3	1448,6636	0,0070396
	<b>PROMEDIO</b>	0,007191		<b>PROMEDIO</b>	0,007134
	<b>CV (%)</b>	0,745806		<b>CV (%)</b>	0,691717

Tabla 26. Resultado de la prueba de precisión intermedia entre analistas aplicado a muestras

Muestra	Peso de Muestra (mg)		Área de Diazepam		g de DIAZEPAM /100 g TAB	
	1er Analista	2do Analista	1er Analista	2do Analista	1er Analista	2do analista
Muestra 1	151,70	151,96	14235,3402	14245,6298	6,7420	6.6579
			14211,7927	14120,5012		
Muestra 2	151,80	152,92	14463,7377	14507,2258	6,8857	6.7726
			14608,8413	14529,8764		
Muestra 3	152,10	151,80	13948,1758	14157,5896	6,6083	6.6664
			14007,9900	14215,0284		
Muestra 4	151,80	151,60	14003,6651	13895,5568	6,6486	6.5442
			14067,4990	13920,2646		
Muestra 5	151,70	152,40	14255,9723	14384,7707	6,7571	6.7615
			14254,5702	14506,3476		
Muestra 6	152,00	151,20	14122,7561	14286,5976	6,6847	6.7530
			14138,3626	14340,9150		
<b>PROMEDIO</b>					6,7211	6,6926

<b>PROMEDIO TOTAL ANALISTA</b>	6.7068
<b>CV (%) o RSD</b>	0.3000

g DIAZEPAM /100 g = Promedio Area MP x Factor de St x Factor Dilución / Peso de muestra

En la tabla 25 se observa los resultados de los análisis al estándar de diazepam interanalistas, mientras en la tabla 26 los resultados interanalistas para muestras de diazepam en tabletas, aspectos considerados en la evaluación de la precisión intermedia.

### 3. LINEALIDAD

Tabla 27. Resultados individuales de elaboración de curvas de calibración y determinación de la linealidad del método

St1	mg/ mL	Área DIAZEPAM				Factor Respuesta (f)
	xi	yi	xi <sup>2</sup>	yi <sup>2</sup>	xiyi	yi/xi
80 %	0,0080	1115,62430	0,00006	1244617,58	8,9099	139688,762286358
90 %	0,0090	1296,42730	0,00008	1680723,74	11,6696	144026,314088315
100 %	0,0100	1427,74060	0,00010	2038443,22	14,2861	142687,020917240
110 %	0,0110	1561,70950	0,00012	2438936,56	17,1814	141952,257921720
120 %	0,0120	1695,6397	0,00014	2875193,99	20,3699	141149,220434359
Σ	0,05001	7097,1414	0,00051	10277915,10	72,4169	709503,5756

St2	mg/ mL	Área DIAZEPAM				Factor Respuesta (f)
	xi	yi	xi <sup>2</sup>	yi <sup>2</sup>	xiyi	yi/xi
80 %	0,0080	1121,2424	0,00006	1257184,52	8,9743	140087,00758380
90 %	0,0090	1302,6851	0,00008	1696988,47	11,7329	144635,46023215
100 %	0,0101	1429,6063	0,00010	2043774,17	14,3877	142050,08892996
110 %	0,0110	1556,2523	0,00012	2421921,22	17,1248	141427,32214564
120 %	0,0120	1694,1702	0,00014	2870212,67	20,3522	141026,89563893
Σ	0,0501	7103,9563	0,0005	10290081,05	72,5720	709226,77453047

St3	mg/ mL	Área DIAZEPAM				Factor Respuesta (f)
	xi	yi	xi <sup>2</sup>	yi <sup>2</sup>	xiyi	yi/xi
80 %	0,0080	1125,022	0,00006	1265674,50	9,0009	140617,20370972
90 %	0,0090	1306,0131	0,00008	1705670,22	11,7583	145060,34336570
100 %	0,0100	1430,1157	0,00010	2045230,92	14,3719	142307,14960943
110 %	0,0110	1575,0265	0,00012	2480708,48	17,3209	143220,38686257
120 %	0,0120	1694,1749	0,00014	2870228,59	20,3859	140794,76005033
Σ	0,0501	7130,3522	0,0005	10367512,70	72,8380	711999,84359775

Σ	0,1502	21331,4	0,0015	30935508,8	217,8268	2130730,1938
				<b>Promedio</b>	14,5218	142048,6796
				<b>Varianza</b>	17,1901	2629073,7780
				<b>D,S,</b>	4,1461	1621,4419

<b>CV (%) o RSD</b>	1,1415
---------------------	--------

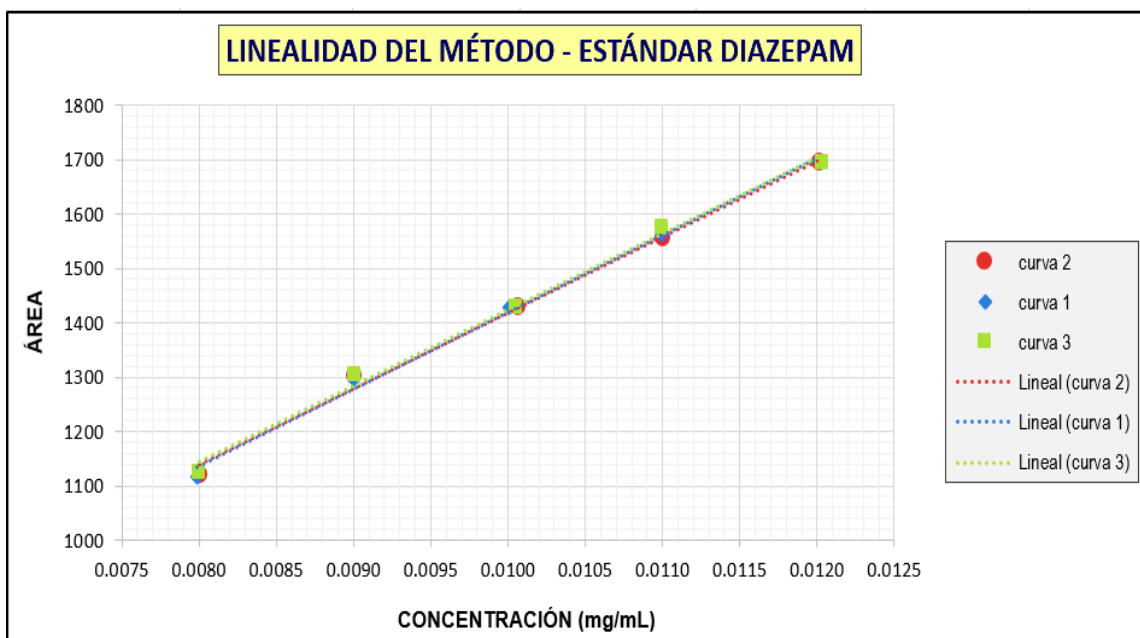


Fig. 25. Curvas de calibración para linealidad del método verde

En la tabla 27 se observan los valores obtenidos para la obtención de cada una de las curvas de calibración de comparación, así mismo en la tabla 28 la correspondiente evaluación estadística complementaria. Luego, la correspondencia de las 3 curvas de calibración de diazepam puede observarse en la figura 25.

Tabla 28. Evaluación de resultados de linealidad

Recta de Regresión	
140469,8132 X + 15,6768	
Coeficiente de Correlación	Conforme
r > 0,999	0,99749
Coeficiente de determinación	Conforme
r <sup>2</sup> > 0,998	0,99500
Análisis de la Varianza	Conforme
G <sub>exp</sub> < G <sub>tabla</sub>	0,5773 < 0,6800
Test de linealidad	Conforme
CV < 5 %	1,1415
Test de t de Student	Conforme
t <sub>exp</sub> > t <sub>tabla</sub>	50,7942 > 2,1600
Test de proporcionalidad	Conforme
Límite de confianza del intercepto debe incluir al 0	Conforme
-44,729 < a < 76,083	
Test de t de Student	Conforme
t <sub>exp</sub> < t <sub>tabla</sub>	0,5606 < 2,1600

#### 4. SELECTIVIDAD

Estándar de referencia	
Nombre	DIAZEPAM
Lote	J0J208
Pot.(%)	99,99
St1 (mg)	10,1670
St2 (mg)	10,3710

N° de Inyección	Área de Diazepam	Cantidad
1	1406,4717	0,0072287
2	1415,8318	0,0071809
3	1400,3321	0,0072604
1	1447,5499	0,0071645
2	1459,3041	0,0071068
3	1439,0481	0,0072068
<b>Promedio</b>		0,00719
<b>RSD (%)</b>		0,74581

Tabla 29. Resultados de la prueba de selectividad

<b>PRUEBA 1: PLACEBO (EXCIPIENTES)</b>			
Muestra	1	Muestra	2
Peso de muestra (mg)	141,70 mg	Peso de muestra (mg)	141,60 mg
Área de interferencia	0,0000	Área de interferencia	0,0000
%Interferencia	0,0000 %	%Interferencia	0,0000 %
<b>PRUEBA 2: DILUYENTE (METANOL)</b>			
Muestra	diluyente	Muestra	diluyente
Cantidad	10 µL	Peso de muestra (mg)	10 µL
Área de interferencia	0,0000	Área de interferencia	0,0000
%Interferencia	0,0000 %	%Interferencia	0,0000 %
<b>PRUEBA 3: PRINCIPIO ACTIVO</b>			
Muestra	1	Muestra	2
Peso de muestra (mg)	10,16 mg	Peso de muestra (mg)	10,04 mg
Área de interferencia	0,0000	Área de interferencia	0,0000
%Interferencia	0,0000 %	%Interferencia	0,0000 %
<b>PRUEBA 4: PRINCIPIO ACTIVO + PLACEBO (EXCIPIENTES)</b>			
Muestra	1	Muestra	2
Peso de muestra (mg)	151,70	Peso de muestra (mg)	151,60
Área de interferencia	0,0000	Área de interferencia	0,0000
%Interferencia	0,0000 %	%Interferencia	0,0000 %

En la tabla 29 se observan los resultados correspondientes a las evaluaciones cualitativas de la prueba de selectividad, donde evidencia que tanto los excipientes como el diluyente no se constituyen en interferencias de las lecturas analíticas.

## 5. ROBUSTEZ

Tabla 30. Resultados de parámetros individualizados

PARAMETRO ANALITICO		Peso (mg)	Área de Diazepam	mg de Analito hallado	Porcentaje de recuperación (%)
VELOCIDAD DE FLUJO	A	10,394	1444,4279	10,3874	99,94
		10,394	1446,0828	10,3993	100,05
	a	10,253	1420,8176	10,2176	99,66
		10,253	1422,8329	10,2321	99,80
TIEMPO DE SONICADO	B	10,198	1416,0673	10,1835	99,86
		10,198	1410,3854	10,1426	99,46
	b	10,145	1405,6582	10,1086	99,64
		10,145	1413,2426	10,1632	100,18
TEMPERATURA DE BAÑO MARÍA	C	10,377	1440,8566	10,3617	99,85
		10,377	1438,0349	10,3415	99,66
	c	10,210	1419,3562	10,2071	99,97
		10,210	1419,9889	10,2117	100,02
TEMPERATURA DE HORNO	D	10,183	1408,1713	10,1267	99,45
		10,183	1413,3191	10,1637	99,81
	d	10,227	1422,7461	10,2315	100,04
		10,227	1425,3919	10,2505	100,23
TIEMPO DE AGITACIÓN	E	10,230	1412,7794	10,1598	99,31
		10,230	1406,1089	10,1119	98,85
	e	10,096	1397,9646	10,0533	99,58
		10,096	1401,7375	10,0804	99,85
LONGITUD DE ONDA	F	10,272	1426,4510	10,2581	99,87
		10,272	1414,7130	10,1737	99,04
	g	10,255	1422,0721	10,2267	99,72
		10,255	1429,9618	10,2834	100,28
ESTABILIDAD	G	10,359	1435,7509	10,3250	99,67
		10,359	1438,3766	10,3439	99,85
	g	10,201	1416,1145	10,1838	99,83
		10,201	1418,2133	10,1989	99,98

En la tabla 29 se observan los resultados expresados en porcentaje de recuperación del diazepam al ser sometido a pequeñas variaciones previstas para la evaluación de la robustez del método analítico propuesto. Estos resultados corresponden a la evaluación de parámetros individualizados.

Tabla 31. Resultados de la prueba de Youden- Steiner

PARÁMETROS	EXPERIMENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	g	g	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADO	99,976	99,827	99,853	99,437	99,348	99,865	99,726	99,607

Tabla 32. Evaluación de la significancia de efectos individualizados

EFECTO	PROM		DIF	RESULTADO
	MAY	MIN		
EFECTO A	99,77358198	99,63659443	0,136987549	NO SIGNIFICATIVO
EFECTO B	99,75446713	99,65570928	0,098757852	NO SIGNIFICATIVO
EFECTO C	99,72594109	99,68423532	0,04170577	NO SIGNIFICATIVO
EFECTO D	99,78428587	99,62589054	0,158395327	NO SIGNIFICATIVO
EFECTO E	99,82552044	99,58465598	0,240864465	SIGNIFICATIVO
EFECTO F	99,59234949	99,81782693	0,225477444	SIGNIFICATIVO
EFECTO G	99,75113801	99,6590384	0,092099613	NO SIGNIFICATIVO
<b>VALOR COMPARATIVO: 2,24 x S<sub>Rep</sub></b>				0,213170494

En la tabla 31 se observan los resultados del diseño experimental de Youden-Steiner, estos al ser comparado al valor comparativo de la desviación estándar relativa permite obtener los resultados de efectos individualizados vistos en la tabla 32.

## 6. RANGO ANALÍTICO

Tabla 33. Consolidado del rango analítico del método verde propuesto

ELEMENTOS	RANGO	RESULTADO
Exactitud	80 % - 120 %	Cumple
Precisión	80 % - 120 %	Cumple
Linealidad	80 % - 120 %	Cumple
Resultado: Rango: 80 % - 120 %		

Para establecer el rango analítico se consideraron los resultados previos obtenidos en la evaluación de los parámetros de linealidad, exactitud y precisión. Estableciendo un intervalo analítico entre 80 y 120 % (Tabla 33).

## COMPARACIÓN MÉTODO NORMALIZADO Y MÉTODO VERDE

### PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

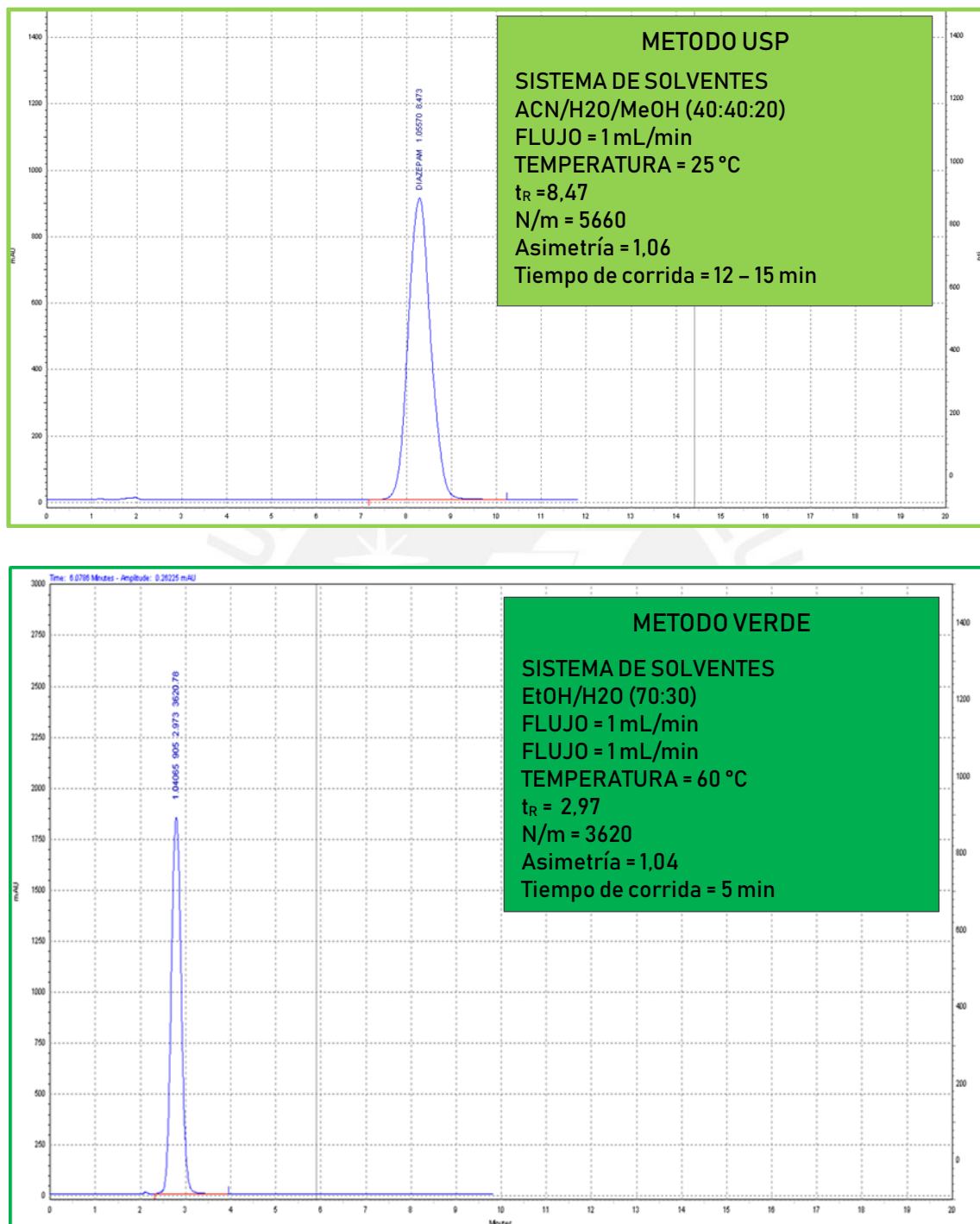


Fig. 26. Comparación de cromatogramas y parámetros analíticos del método USP y método verde propuesto

En la figura 26 se observan los cromatogramas y parámetros separativos obtenidos al comparar la metodología recomendada por la USP y el método verde validado para la determinación de diazepam en tabletas.

## MÉTRICAS VERDES

En la tabla 34 se observa la evaluación de parámetros verdes para la elaboración de los pictogramas NEMI y así comparar la ventaja ecológica del método verde respecto al de la farmacopea americana para la determinación de diazepam en tabletas.

Tabla 34. Evaluación de parámetros verde la asignación en pictograma NEMI

PARÁMETROS	MÉTODO VERDE	MÉTODO USP
<b>PARAMETRO 1: *PBT (tóxicos bioacumulativos persistentes)</b>	Etanol: ausente Agua: ausente	Acetonitrilo: ausente Metanol: ausente Agua: ausente
<b>PARAMETRO 2: **PELIGROSIDAD</b>	Etanol: ausente Agua: ausente	Acetonitrilo: u003 Metanol: u154 Agua: ausente
<b>PARAMETRO 3: CORROSIVIDAD (pH)</b>	Entre 2 a 12	Entre 2 a 12
<b>PARAMETRO 4: DESECHOS</b>	Se producen menos de 50 mL de desechos de sistema de solventes por análisis de 1 muestra.	Se producen menos de 50 mL de desechos de sistema de solventes por análisis de 1 muestra.

\* EPA – Toxic Release Inventory (TRI) – Persistent Bioaccumulative Toxic (PBT)

\*\* EPA – Hazardous Waste Number

## PICTOGRAMAS NEMI

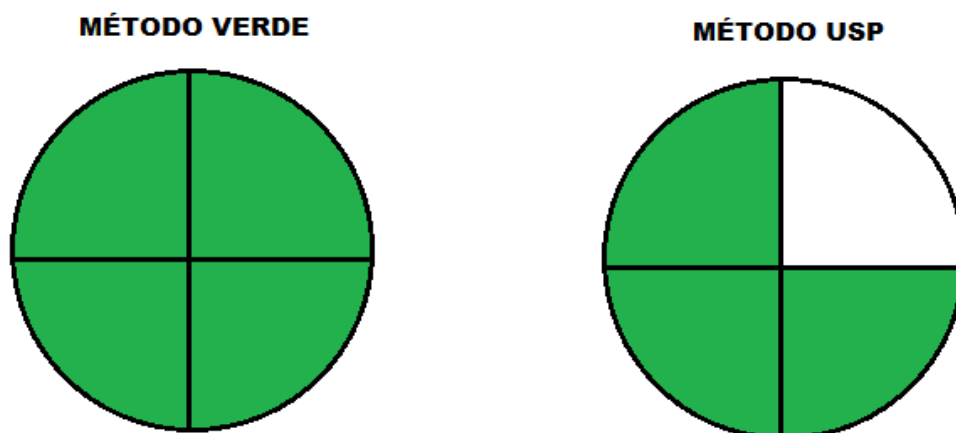


Fig.27. Pictogramas NEMI posterior al análisis verde realizado al método USP y método verde propuesto

## ECOESCALA ANALÍTICA

La evaluación cuantitativa del impacto al medio ambiente de los métodos analíticos a comparar se realiza por la evaluación de los puntos de penalidad al aplicar la ecoescala analítica, como se observa en la tabla 35.

Tabla 35. Comparación de puntos de penalidad para método verde y USP

MÉTODO VERDE				
PELIGROS (REACTIVOS E INSTRUMENTOS)				PUNTOS DE PENALIDAD (PPs)
SOLVENTES	Etanol (3,5 mL)			4
	Agua (1,5 mL)			0
SISTEMA INSTRUMENTAL	HPLC (LC-UV/VIS)			1
PELIGROS OCUPACIONALES	Ninguno			0
DESPERDICIOS	5 mL			3
	Reciclaje			0
<b>TOTAL DE PUNTOS DE PENALIDAD</b>				<b>8</b>
<b>PUNTAJE TOTAL DE LA ECOESCALA ANALÍTICA</b>				<b>92</b>
<b>CÁLCULO DE PUNTOS DE PENALIDAD PARA SOLVENTES</b>				
		Pictograma	Peligrosidad	PPs
SOLVENTE1	Etanol	2	2	4
SOLVENTE2	Agua	0	0	0

MÉTODO USP				
PELIGROS (REACTIVOS E INSTRUMENTOS)				PUNTOS DE PENALIDAD (PPs)
SOLVENTES	Acetonitrilo (6 mL)			4
	Metanol (3 mL)			6
	Agua (6 mL)			0
SISTEMA INSTRUMENTAL	HPLC (LC-UV/VIS)			1
PELIGROS OCUPACIONALES	Ninguno			0
DESPERDICIOS	15 mL			5
	No tratamiento			3
<b>TOTAL DE PUNTOS DE PENALIDAD</b>				<b>19</b>
<b>PUNTAJE TOTAL DE LA ECOESCALA ANALÍTICA</b>				<b>81</b>
<b>CÁLCULO DE PUNTOS DE PENALIDAD PARA SOLVENTES</b>				
		Pictograma	Peligrosidad	PPs
SOLVENTE1	Metanol	3	2	6
SOLVENTE2	Acetonitrilo	2	2	4
SOLVENTE3	Agua	0	0	0

## V. DISCUSIÓN

El desarrollo de métodos alternativos a los existentes evitando el impacto al medio ambiente es una de las preocupaciones actuales de la química. Es por ello, que tanto la química verde como la química analítica verde brindan diversas alternativas para optimizar los procedimientos químico-analíticos.

En el presente estudio se planteó una propuesta verde basada en el reemplazo de solventes y la optimización de las condiciones cromatográficas. Es por ello que en el desarrollo analítico se planteó primariamente el reemplazo del acetonitrilo y el metanol (parte del sistema de solventes propuesto por la USP, para valoración de diazepam) por el etanol<sup>54</sup>, solvente que impacta en menor manera al medio ambiente. Sin embargo, una de las grandes dificultades encontradas fue que este, así como sus combinaciones con agua presentaban alta viscosidad<sup>55,56</sup>, lo que se veía reflejado en incrementos de la presión al analizarlos a la temperatura ambiente. Además, los picos obtenidos en los pilotos resultaban demasiado anchos, por lo que se consideró necesario el incremento de la temperatura para disminuir la viscosidad de solvente, dado que la columna de trabajo seleccionada es considerada como “medium bar”, es decir que solo soportaba como máximo presiones de 250 bar<sup>57</sup>.

De acuerdo a los resultados preliminares realizados (Tabla 14 y 15) a las proporciones de EtOH / H<sub>2</sub>O (50:50 y 100:0) tanto al aumentar la temperatura y disminuir la velocidad de flujo, se manejaban presiones dentro del rango de trabajo de la columna cromatográfica.

Luego al evaluar la influencia del flujo, se evidencia que el sistema de solventes EtOH / H<sub>2</sub>O (70:30) a la velocidad de flujo de 1 mL/min y 60 °C de temperatura de trabajo<sup>58,59</sup>, mostraba la aparición más temprana del pico de diazepam ( $t_R = 2,96$ ).

En la figura N° 19 se observa una adecuada separación entre los analitos de comparación (aptitud del sistema – USP 40), según esta bibliografía el nordazepam tiende a aparecer previamente al diazepam, lo cual queda demostrado, además ambos picos se observan individualizados, luego del efecto separativo producido en la columna mediante la interacción con el solvente y el analito, sin embargo estos resultan bastante anchos (1 min de base para cada uno) además que el tiempo de corrida regularmente puede ir de 12 a 15 minutos. Tanto en el método USP como en la propuesta realizada, los platos teóricos fueron menores a 2000, pese a que la técnica normalizada para diazepam indica que el número de platos debe ser no menor de 5000. Para constatar la

eficiencia de columna, se hizo pilotos con cafeína citrato, obteniéndose platos teóricos mayores a 6000, lo cual indica un buen estado de la columna cromatográfica.

Luego al probar los solventes hasta el momento seleccionados EtOH / H<sub>2</sub>O (50:50 y 70:30), se observa que la primera proporción tiende a separar mejor ambos analitos. Sin embargo, resulta que al tratar de reproducir en ocasiones posteriores a partir de la 4<sup>ta</sup> corrida se producía ensanchamiento de banda, por lo cual se descarta. Al analizar la segunda proporción, si bien, los picos de diazepam y nordazepam tienden a estar más juntos, estos pueden observarse individualmente a distintos tiempos de retención ( $t_R$  (nordazepam): 2,487 y  $t_R$  (diazepam): 2,973). Estos picos eran reproducibles en lecturas continuas, lo que ayuda a la selección de esta proporción. Así mismo, se selecciona esta proporción a la temperatura de 60 °C porque a esta se da el menor tiempo de aparición del diazepam y permitiría realizar análisis de solo 5 minutos.

Sobre la base de la proporción y condiciones seleccionadas se buscó optimizar aún más el sistema de solventes. En el estudio de Eldin et al<sup>18</sup>, se realizó la validación de una técnica analítica verde propuesta para la determinación de clonazepam en tabletas, particularmente ellos emplearon como fase móvil SDS 2 %, isopropanol y buffer acetato de sodio a pH = 3,5 en una columna C8 a tamaño de 5 µm al flujo de 1,5 mL/min en condiciones isocráticas y a temperatura ambiente sin embargo no indican la capacidad límite de presión de la columna, por lo que se da a entender que se trataría de una columna tipo Hibar (High bar o de alta presión) dado que los solventes y soluciones empleadas resultan siendo altamente viscosos. Con estos antecedentes y otras evidencias, se optó por tratar de optimizar el sistema de solventes mediante la aplicación de soluciones buffer (acetato y fosfato)<sup>60</sup> así como el empleo de líquido iónico ([BMIm]BF<sub>4</sub>)<sup>61,62</sup>, el cual fue seleccionado por sus características físicas (no presentaba color, que podría ser un posible interferente) así como su capacidad separativa y por encontrarse disponible para su empleo en el laboratorio. Sin embargo, ninguna de estas tres propuestas mostró una significativa optimización, considerando que, al tratarse de sales, luego de la corrida cromatográfica debería realizarse periodos de lavado de columna continuos para evitar sedimentación. Adicionalmente, cabe precisar que al emplear el líquido iónico y ponerlo en contacto con el etanol, se formaban burbujas que requerían eliminarse por desgasificación, además que los periodos de estabilización de la presión resultaban inestables, fluctuantes y bastante largos, mayores a los 20 minutos, lo que se veía reflejado en la formación de mayor cantidad de desperdicios.

Por ser un periodo corto de análisis, el modo de elución seleccionado fue el isocrático y al tratarse de un equipo de inyección manual, las aplicaciones de muestras implicaban

necesariamente la presencia del tesista durante todo el proceso cromatográfico y desarrollo de las lecturas.

Los parámetros de validación seleccionados para dar soporte a la técnica analítica fueron de acuerdo a la naturaleza del producto a estudiar, al tratarse de tabletas constituidas por el placebo (excipientes) y el principio activo (diazepam), se consideraron los parámetros correspondientes a la categoría I de ensayos analíticos (según USP 40): exactitud, precisión, selectividad, linealidad e intervalo; adicionalmente se incluyó la robustez, aunque esta es abordada en algunos casos desde el desarrollo analítico<sup>38</sup>. Tanto el límite de detección y cuantificación no se consideraron por no estar dentro de esta categoría. Las valoraciones de principios activos desde un enfoque de control de calidad de medicamentos, evalúan su presencia de acuerdo a rangos de aceptabilidad que habitualmente van entre el 90 y 110 %, por lo que no resulta necesario evaluar el analito como si fuese una traza o hasta el límite de saturación de la prueba. Para el caso de la precisión, esta evalúa la dispersión producida al comparar los subparámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, este último implica tanto en trabajos interlaboratorios, interequipos y al menos con 2 operadores distintos, situación que es complicada en la práctica habitual en los laboratorios de control de calidad, por tanto, se cuenta con la opción de la precisión intermedia la cual considera la dispersión del método entre analistas.

Para el caso de la selectividad<sup>63</sup>, esta se enfoca de diversas maneras, por ejemplo la capacidad que tiene la técnica analítica para distinguir un analito de otros de la misma familia o de similares propiedades, pero este enfoque fue desestimado por que se busca la identificación de un analito único no de la evaluación de la capacidad separativa de la técnica aplicada a varias sustancias. Luego también se enfoca desde condiciones de degradabilidad que lo acercan más a los estudios de estabilidad de formas farmacéuticas, lo cual no estaba dentro del alcance del estudio. Es por ello que se priorizó la evaluación de la posible influencia o interferencia en los resultados por parte de los excipientes de la fórmula, así como del solvente empleado para la preparación de las muestras. Para la evaluación de la robustez analítica, se consideraron tanto parámetros relacionados directamente con la técnica verde, así como los correspondientes a la preparación de muestra de tabletas.

La formulación del placebo estuvo a cargo de un laboratorio farmacéutico nacional de acuerdo a fórmula reservada, brindaron los certificados de análisis de cada excipiente empleado y el peso final de tableta fue de 151,6 mg.

Del parámetro de exactitud, se observó que en los 3 porcentajes de trabajo (80 %, 100 % y 120 %) el porcentaje de recuperación del principio activo a partir de muestras de tabletas era poco mayor al 100 % con un RSD del 0,15 %, mientras en los resultados de precisión (repetibilidad y precisión intermedia) se obtuvieron dispersiones < 2 %.

En la evaluación de la linealidad se evidenció gráficamente que las 3 curvas propuestas confluyen en los puntos de concentración vs área. Además, tanto el coeficiente de correlación y de determinación resultan mayores a 0,99 lo cual indica que existe una asociación del 99 % entre la variable independiente (concentración de diazepam) y variable dependiente (área). Estos resultados tienen el soporte de los test de linealidad y proporcionalidad, los cuales presentan significancia estadística. En la evaluación de la selectividad, se evidenció que tanto el diluyente como los excipientes no muestran señal analítica por ese motivo no se constituyen en interferentes que afecten la lectura del principio activo. En la prueba de robustez se consideraron 7 factores con 2 variaciones, mediante la prueba de Youden-Steiner<sup>64</sup> se vio que, en 5 de ellos, las pequeñas variaciones empleadas no tenían un efecto significativo en el método, es decir, vuelven al método robusto. Sin embargo, para el efecto E y F (longitud de onda y estabilidad), estos resultaron significativos, por lo que fue necesario hacer una evaluación de grupos individualizados, mostrando que los porcentajes de recuperación son bastante cercanos y además se debe contemplar que al haber resultado la desviación estándar relativa de la repetibilidad bastante reducida, el valor comparativo de Youden-Steiner solo admitiría pequeñísimas variaciones.

La ecoescala analítica fue diseñada para evaluar de manera cuantitativa cuán verde podría resultar un método propuesto; en un inicio contemplaba varios parámetros de evaluación<sup>65</sup>, luego esta fue adaptándose conforme al campo de aplicación, por eso en la aplicación a la cromatografía analítica verde, se muestra una versión más concisa y reducida para evaluar con mayor rapidez los métodos<sup>13</sup>. Para determinar los puntos de penalidad, primero se definió que solo se iba a considerar al método analítico, más no al procedimiento extractivo del principio activo, de allí que se evaluaran las penalidades del metanol, etanol, acetonitrilo y agua (de las fases móviles), que se calculan mediante el número de pictogramas de seguridad por el tipo de rotulado (Warning = X1; Danger = X2), resultando que el metanol (3 pictogramas y rótulo Danger) tiene mayor puntos de penalidad que el acetonitrilo (2 pictogramas y rótulo Danger), cabe indicar que este es un criterio de calificación referencial, al comparar varias guías de clasificación de solventes<sup>8</sup>, concluyen al considerar al metanol como un solvente verde, mientras al acetonitrilo como un solvente de cuidado. Además, las propuestas para la cromatografía analítica verde recomiendan el reemplazo del acetonitrilo por otros solventes verdes.

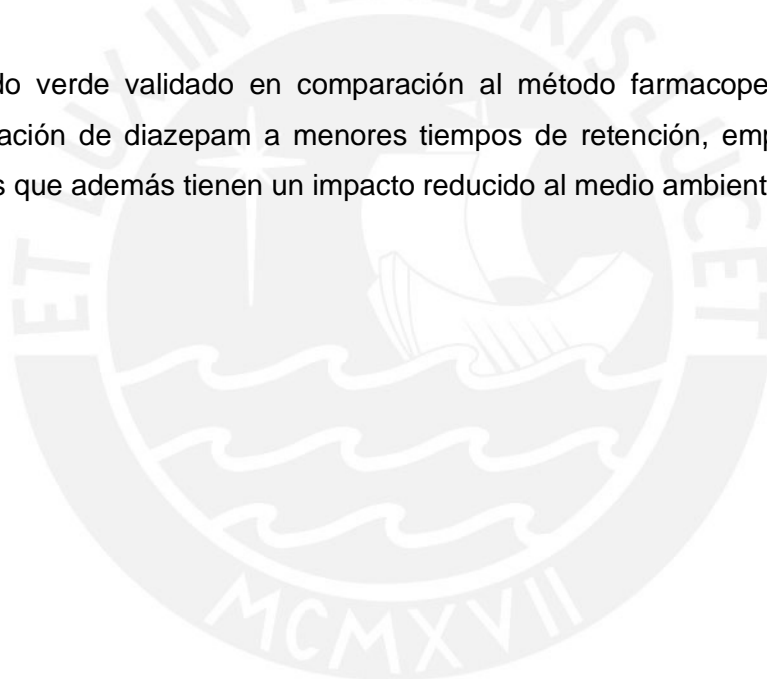
Además, desde un criterio de manejo de intoxicaciones, el metanol con solo una cucharada puede producir insuficiencia renal, acidosis metabólica, ceguera y agranulocitosis; paradójicamente su antídoto es el etanol directamente infundido en el torrente sanguíneo, debido a su mayor afinidad enzimática al alcohol deshidrogenasa<sup>66</sup>. El método verde obtuvo un puntaje mayor en la ecoescala analítica (92) en comparación al método normalizado (81), en consecuencia, se constituye en un método analítico verde y más ecoamigable que el recomendado por la farmacopea americana.

Los pictogramas NEMI son parte del sistema de métricas cualitativas verdes que se han ido optimizando a pasar de los años, pero que aún aporta un marco analítico inicial sobre las características de un método según sus parámetros de evaluación<sup>67</sup>, los cuales están sustentados en las listas y guías internacionales<sup>68-70</sup>, de ahí que 3 de los parámetros coincidieran al no ser potenciales generadores de cantidades grandes de desperdicios, que no trabajen en pH extremos, ni que se encuentren en los listados de PBTs. Sin embargo, al realizar la evaluación de peligrosidad, se observó que tanto el metanol como el acetonitrilo se encuentran presentes en el listado de sustancias peligrosas de la EPA en la subclasificación D con los códigos U154 y U003 respectivamente, lo cual hace que el campo para este parámetro permanezca en blanco y evidencie que el método farmacopeico resulta menos verde que el método propuesto.

Finalmente, al comparar ambos métodos USP y verde, se destaca que la cantidad de residuos de solventes producidos por el método verde por corrida es 2 veces menor al producido por el método USP. Además, al contener el primero solo etanol y agua, hace posible la reutilización del solvente mediante destilación o evaporación rotatoria, caso que no puede darse con los residuos de la fase móvil USP, porque se trata de una mezcla metanol, acetonitrilo y agua que requieren condiciones especiales para su eliminación.

## VI. CONCLUSIONES

- Se logró establecer una técnica analítica verde para la valoración de diazepam en tabletas, basada en los criterios de reemplazo de solvente (metanol, acetonitrilo) y optimización de las condiciones (incremento de temperatura).
- El método analítico verde propuesto y validado resulta ser exacto, preciso, robusto, selectivo para la identificación y cuantificación de diazepam presente en tabletas.
- Las métricas empleadas: pictogramas NEMI y eco escala analítica demostraron que el método validado es verde y que resulta más ecoamigable que el método normalizado de la farmacopea americana.
- El método verde validado en comparación al método farmacopeico permite la determinación de diazepam a menores tiempos de retención, empleando pocos solventes que además tienen un impacto reducido al medio ambiente.



## VII. RECOMENDACIONES

- Para ensayos posteriores se pueden complementar otras métricas analíticas verdes de corte cuali-cuantitativo que precisen con mayor detalle la calificación del método analítico propuesto.
- Se puede considerar dentro del análisis verde la optimización del sistema de extracción del principio de las tabletas, mediante el empleo de solventes verdes como etanol o agua; asimismo, se puede evaluar la optimización del sistema de solventes mediante el empleo de líquidos iónicos.
- Se puede considerar el empleo de columnas cromatográficas con tamaño de partícula reducido ( $< 5 \mu\text{m}$ ) y que sean más afines al metabolito a separar (benzodiazepina), para ser empleado en un sistema cromatográfico de ultra presión (UHPLC).
- Se puede extender el alcance de esta técnica para la separación de benzodiazepinas en muestras múltiples o que estén contenidas en matrices biológicas (sangre, suero, cabello, etc), de interés del campo de la toxicología analítica.
- Este estudio puede servir de modelo para otros estudios de optimización de sistemas cromatográficos ecoamigables y trabajar no solo con matrices del campo farmacéutico, sino también otras para el rutinario control de calidad como en la industria alimentaria o cosmética. Ejemplo: determinación de cafeína en bebidas energéticas o evaluación de derivados de histamina en matrices cárnicas de peces.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández Pedro Lorenzo. Velázquez, Farmacología básica y clínica. 19th ed. Madrid: Panamericana; 2018
2. Díaz M. Las benzodiazepinas y sus efectos sobre la ansiedad. *Cultura*. 2017;31:169-80.
3. EMCDDA | Benzodiazepines profile (chemistry, effects, other names, pharmacology, sexual assaults, synthesis, mode of use, pharmacology, medical use, control status) [Internet]. Emcdda.europa.eu. 2018 [cited 8 July 2018]. Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/benzodiazepine>
4. Chan CC, Lee YC, Lam H, Zhang X-M. Analytical method validation and instrument performance verification. 18th ed, Canadá: Wiley; 2004.
5. Guzzetta A. Reverse Phase HPLC Basics for LC/MS [Internet]. Ionsource.com. 2018 [cited 8 July 2018]. Available from: <http://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm>
6. Grodowska K, Parczewski a. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm* [Internet]. 2010;67(1):3-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210074>
7. Funari C, Carneiro R, Khandagale M, Cavalheiro A, Hilder E. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. *Journal of Separation Science*. 2015;38(9):1458-1465.
8. Byrne F, Jin S, Paggiola G, Petchey T, Clark J, Farmer T et al. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes*. 2016;4(1):1 - 24.
9. ACETONITRILE - National Library of Medicine HSDB Database [Internet]. Toxnet.nlm.nih.gov. 2018 [cited 8 July 2018]. Available from: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+42>
10. Brettschneider F, Jankowski V, Günthner T, Salem S, Nierhaus M, Schulz A, et al. Replacement of acetonitrile by ethanol as solvent in reversed phase chromatography of biomolecules. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(9;10):763-8
11. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2013;50:78-84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

12. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry [Internet]. Fda.gov. 2018 [cited 8 July 2018]. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>
13. Tobiszewski M, Tsakovski S, Simeonov V, Namieśnik J, Pena-Pereira F. A solvent selection guide based on chemometrics and multicriteria decision analysis. *Green Chem.* 2015;17(10):4773–85.
14. Tótolí EG, Salgado HRN. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. *J AOAC Int.* 2015;98(5):1276-85.
15. Sang J, Ma Q, Li CQ. Development and validation of green chromatography for the determination of anthocyanins in haskap berry, mulberry and blackberry. *Anal Methods.* 2017;9(17):2535-45.
16. Haq N, Iqbal M, Alanazi FK, Alsarra IA, Shakeel F. Applying green analytical chemistry for rapid analysis of drugs: Adding health to pharmaceutical industry. *Arab J Chem* [Internet]. 2017;10:S777-85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.004>
17. Afshar M, Afshar M, Branch PS, Navidpour L. ecofriendly and RP-HPLC method for determination of dapson: Application to pharmaceutical analysis. *Pharm Sci.* 2016;43(3):1-25.
18. Eldin AB, Shalaby A, Abdallah MS, Shaldam MA, Abdallah MA. Applying green analytical chemistry (GAC) for development of stability indicating HPLC method for determining clonazepam and its related substances in pharmaceutical formulations and calculating uncertainty. *Arab J Chem* [Internet]. 2014;0-6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535214002925>
19. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 40-NF 35). Vol 2. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention; 2017:3753-3757.
20. BVS. BIBLIOTECA VIRTUAL EN SALUD DE HONDURAS. [Internet]. [cited 2019 May 7]. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>
21. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. [Internet]. [cited 2019 May 7]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42326/8479034920\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42326/8479034920_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.pdf)
22. INS. INSTITUTO NACIONAL DEL SALUD. [Internet]. [cited 2019 May 7]. Available from: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/artrevista/pdf/salud mental.pdf>
23. BVS. BIBLIOTECA VIRTUAL EN SALUD. MINSA. No Title [Internet]. [cited 2019 May 7]. Available from: [http://bvs.minsa.gob.pe/local/PROMOCION/820\\_MS-PROM14.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/PROMOCION/820_MS-PROM14.pdf)

24. El Peruano. [Internet]. [cited 2019 May 30] Available from: <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-salud-mental-ley-n-30947-1772004-1/>
25. Beledo Jesús Flórez, Armijo JA, Mediavilla África. Farmacología Humana. 6th ed. Amsterdam: Elsevier Masson; 2014.
26. M. G. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;16:11S–16S.
27. Indart I. Selección de benzodiazepinas para su uso en el hospital. *Farm Hosp*. 1997;21(2):117–22. Available from: [https://www.sefh.es/revistas/vol21/n2/117\\_122.PDF](https://www.sefh.es/revistas/vol21/n2/117_122.PDF)
28. Dirección General de Medicamentos I y D. Formulario Nacional de medicamentos esenciales. Minist la Salud [Internet]. 2008. Available from: [http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Publicaciones/URM/P22\\_2008-01-01\\_Formulario\\_esenciales.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Publicaciones/URM/P22_2008-01-01_Formulario_esenciales.pdf)
29. Ministerio de Salud del Perú. Documento técnico: Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales para el Sector Salud. [Internet]. 2015. Available from: [http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2015/RM\\_399-2015.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2015/RM_399-2015.pdf)
30. Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J* [Internet]. 2013;13(2):214–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789008><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3684331>
31. LEVI L, WALKER GC, PUGSLEY LI. Quality Control of Pharmaceuticals. *Can Med Assoc J* [Internet]. 1964;91(15):781–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14199105><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1927659>
32. Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab J Chem* [Internet]. 2017;10:S1409–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>
33. Nageswara Rao R, Nagaraju V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;33(3):335–77.
34. Sabir AM, Moloy M, Bhasin PS. Hplc Method Development and Validation: a Review. *Int Res J Pharm* [Internet]. 2016;4(4):39–46. Available from: [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/1719\\_pdf.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/1719_pdf.pdf)

35. Dahimiwal SM, Thorat DB, Jain NP, Jadhav VB, Patil PB. A review on high performance liquid chromatography. *Int J Pharm Res.* 2013;5(3):1–6
36. Chromacademy. Theory of HPLC [Internet]. [cited 2019 May 7]. Available from: [https://www.chromacademy.com/lms/sco1/Theory\\_Of\\_HPLC\\_Introduction.pdf](https://www.chromacademy.com/lms/sco1/Theory_Of_HPLC_Introduction.pdf)
37. Sabir AM, Moloy M, Bhasin PS. Hplc Method Development and Validation: a Review. *Int Res J Pharm* [Internet]. 2016;4(4):39–46. Available from: [http://www.irjonline.com/admin/php/uploads/1719\\_pdf](http://www.irjonline.com/admin/php/uploads/1719_pdf)
38. Eurolab, P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1a ed. 2016). Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
39. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Técnica_1_validación_de_Métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_1.pdf)
40. PAHO - OPS. Validación de métodos analíticos [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: [http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13 Modulo VALIDACION de Metodos Fisicoqcos.pdf](http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf)
41. PAHO - OPS. Validación de métodos analíticos [Internet]. [cited 2019 Jun 9]. Available from: [http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/2 Anexo 5 informe 32.pdf](http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/2_Anexo_5_informe_32.pdf)
42. de Marco BA, Rechelo BS, Tótolí EG, Kogawa AC, Salgado HRN. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2019;27(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isps.2018.07.011>
43. Vânia zuín , arlene corrêa . *Química Verde: Fundamentos e Aplicações.* (1st ed.). Sao Carlos: Edufscar; 2009
44. Doria Serrano M del C, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. *Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente.* *Educ química* [Internet]. 2009;20(4):412–20. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-893X2009000400004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2009000400004)
45. Ivanković A. Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice. *Int J Sustain Green Energy.* 2017;6(3):39
46. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. *Green Analytical Chemistry* [Internet]. 3rd ed. Vol. 27, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* Elsevier Inc.; 2008. 497-511 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13980-0>
47. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. *Green Analytical Chemistry.* *TrAC - Trends Anal Chem.* 2008;27(6):497–511.

48. Tobiszewski M, Mechlińska A, Namieśnik J. Green analytical chemistry - Theory and practice. *Chem Soc Rev.* 2010;39(8):2869–78.
49. Kurowska-Susdorf A, Zwierzdzyński M, Bevanda AM, Talić S, Ivanković A, Płotka-Wasyłka J. Green analytical chemistry: Social dimension and teaching. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;111(December):185–96.
50. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2013;50:78–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
51. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules.* 2015;20(6):10928–46
52. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013;1307:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>
53. Anastas PT, Tobiszewski M. Introduction to Green Analytical Chemistry. *Handb Green Chem.* 2018;12:103–16.
54. Brettschneider F, Jankowski V, Günthner T, Salem S, Nierhaus M, Schulz A, et al. Replacement of acetonitrile by ethanol as solvent in reversed phase chromatography of biomolecules. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(9–10):763–8.
55. Shalliker RA, Guiochon G. Understanding the importance of the viscosity contrast between the sample solvent plug and the mobile phase and its potential consequence in two-dimensional high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2009;1216(5):787–93.
56. Billen J, Broeckhoven K, Liekens A, Choikhet K, Rozing G, Desmet G. Influence of pressure and temperature on the physico-chemical properties of mobile phase mixtures commonly used in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2008;1210(1):30–44.
57. Particulate analytical HPLC columns [Internet]. [Cited 2019 Jun 9]. Available from: [http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-CN-Site/zh\\_CN/-/CNY/ShowDocument-Pronet?id=201207.143ci](http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-CN-Site/zh_CN/-/CNY/ShowDocument-Pronet?id=201207.143ci)
58. Teutenberg T, Wiese S, Wagner P, Gmehling J. High-temperature liquid chromatography. Part II: Determination of the viscosities of binary solvent mixtures- Implications for liquid chromatographic separations. *J Chromatogr A.* 2009;1216(48):8470–9.
59. Yang Y, Lamm LJ, He P, Kondo T. Temperature effect on peak width and column efficiency in subcritical water chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2002;40(2):107–12.

60. Carda-Broch S, García-Alvarez-Coque MC, Ruiz-Angel MJ. Extent of the influence of phosphate buffer and ionic liquids on the reduction of the silanol effect in a C18 stationary phase. *J Chromatogr A* [Internet]. 2018;1559:112–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.061>
61. Brown L, Earle MJ, Gílea MA, Plechkova N V., Seddon KR. Ionic Liquid–Liquid Chromatography: A New General Purpose Separation Methodology. *Top Curr Chem*. 2017;375(5).
62. Buszewska-Forajta M, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Free silanols and ionic liquids as their suppressors in liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2018;1559:17–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.002>
63. Validation of analytical procedures, text and methodology. [Internet][cited 2019 June 9]. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
64. Karageorgou E, Samanidou V. Youden test application in robustness assays during method validation. *J Chromatogr A* [Internet]. 2014;1353:131–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>
65. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2012;37:61–72.
66. Tephly TR. The toxicity of methanol. *Life Sci*. 1991;48(11):1031–41.
67. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green Analytical Methodologies. *Chem Rev*. 2007;107(6):2695–708.
68. Persistent bioaccumulative toxic (PBT) chemical covered by the TRY Program. Environmental Protection Agency [Internet][cited 2019 June 14]. Available from: <https://www.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/persistent-bioaccumulative-toxic-pbt-chemicals-covered-tri>
69. 40 CFR Subpart D – List of Hazardous Wastes. Cornell Law School. [Internet][cited 2019 June 16]. Available from: <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/part-261/subpart-D>
70. Environmental HAZards List. The pollution information site. [Internet][cited 2019 June 16]. Available from: [http://scorecard.goodguide.com/chemical-groups/one-list.tcl?short\\_list\\_name=pbt](http://scorecard.goodguide.com/chemical-groups/one-list.tcl?short_list_name=pbt)

# IX. ANEXOS

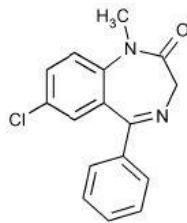
## Anexo 1. Certificado USP del estándar de diazepam



U.S. Pharmacopeia  
The Standard of Quality™

# USP Certificate

## Diazepam LOT J0J208



### Molecular Formula

$C_{16}H_{13}ClN_2O$

### Molecular Weight

284.74

### CAS Number

439-14-5

### LABEL TEXT

**USP REFERENCE STANDARD**  
**DIAZEPAM CIV 100 mg**  
NDC # 00216-0404-03

Danger! Toxic if swallowed. Toxic in contact with skin. May cause drowsiness or dizziness. Suspected of damaging fertility or the unborn child.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.999 mg of diazepam per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-891-0888  
CAT No. 1185008 Material mtd in Germany  
**Intentionally over-labeled for GHS compliance**

For use with reference to USP standards, visit [www.usp.org/standards](http://www.usp.org/standards) to view all USP standards.

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Use only outdoors or in a well-ventilated area. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If on skin: Wash with plenty of water. Call a poison center/doctor if you feel unwell. Take off immediately all contaminated clothing and wash it before reuse. If inhaled: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a poison center/doctor if you feel unwell. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. If swallowed: Immediately call a poison center/doctor. Rinse mouth. Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

USP certifies that the USP Reference Standards Committee, in accordance with their rules and procedures, determined that this USP Reference Standard lot is suitable to assess compliance with the monograph standards for which it is specified. The critical characteristics of this lot are usually determined independently in three or more laboratories, including USP, government, academic, and industrial collaborators.

*Jeri L. Joth*

QA Director

**Calculation Value**

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in USP or NF compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

**Expiration**

Current lots are identified in the Official USP Reference Standards catalog. In some cases, the previous lot may still be considered official. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date." Ordinarily, the previous lot is carried in official status for about one year after the current lot enters distribution.

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current when used. To ensure up-to-date information, USP publishes the Official USP Reference Standards Catalog, which contains official lot designations. This information is also available on the USP web site, at [www.usp.org](http://www.usp.org), as well as in the bimonthly subscription publication, *Pharmacopeial Forum*.

**Instructions for Use**

Follow the instructions in the appropriate USP or NF Monographs and General Requirements for Tests and Assays of the current *USP-NF*. In the event that instructions on the label of this lot differ from those found in the current *USP-NF*, those on the label supersede any instructions listed in Chapter <11>.

**Non-Monograph Use**

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

---

**LEGAL NOTICE**

USP MAKES NO REPRESENTATION OR WARRANTY WITH RESPECT TO THE ACCURACY, COMPLETENESS, OR CURRENTNESS OF THIS CERTIFICATE; AND USP SPECIFICALLY DISCLAIMS ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS, IMPLIED, OR STATUTORY, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. USP DOES NOT WARRANT THAT THE INFORMATION CONTAINED HEREIN MEETS THE CUSTOMER'S REQUIREMENTS. USP SHALL NOT BE LIABLE ON ACCOUNT OF ANY SUCH ERRORS OR OMISSIONS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.  
This document is not a Material Safety Data Sheet.

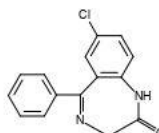
This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2010 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. All rights reserved.

## Certified Reference Material - Certificate of Analysis

### Nordiazepam, Primary Standard

**Catalog Number:** N-905  
**Lot:** FE11181503  
**Expiration:** November 2020  
**Description:** Nordiazepam in Methanol.  
**Packaging:** Solution in 2 mL amber USP Type I glass ampoule containing not less than 1 mL of certified solution.  
**Storage:** Store unopened in freezer (-10 °C to -25 °C).  
**Shipping:** Ambient. See Stability Section.  
**Intended Use:** This Certified Reference Material is suitable for the *in vitro* identification, calibration, and quantification of the analyte(s) in analytical and R&D applications. Not suitable for human or animal consumption.



Cerilliant Quality
ISO GUIDE 34
ISO/IEC 17025
ISO 13485
ISO 15194
ISO 9001
GMP/GLP

**Instructions for Use:** Users should quantitatively transfer desired volume using established good laboratory practices to spike into matrix or to dilute to the desired concentration. Each ampoule is intended for one-time use.  
**Regulatory:** USDEA Exempt | Canadian TK # 61-425 **Safety:** Danger. See Safety Data Sheet

- Expiration date has been established through real time stability studies.
- Ampoules are overfilled to ensure a minimum 1 mL volume can be transferred when using a 1 mL Class A volumetric pipette.
- For quantitative applications, the minimum sample size for intended use is 1 µL.

Analyte	Certified Concentration Value
Nordiazepam	1.000 ± 0.005 mg/mL
<ul style="list-style-type: none"> <li>Uncertainty of the concentration is expressed as an expanded uncertainty in accordance with ISO 17025 and Guide 34 at the approximate 95% confidence interval using coverage factor of k = 2 and has been calculated by statistical analysis of our production system and incorporates uncertainty of the mass balance purity factor, material density, balance, and weighing technique.</li> <li>This standard is prepared gravimetrically and mass results are reported on the conventional basis for weighing in air. Nominal concentration is calculated based on: the actual measured mass; Mass Balance Purity Factor of the analyte(s); measured mass of the solution; and the density of the pure diluent at 20 °C.</li> <li>Concentration is corrected for chromatographic purity, residual water, residual solvents and residual inorganics. No adjustment required before use.</li> <li>Additional certification information available upon request.</li> </ul>	

#### Metrological Traceability

- This standard has been prepared and certified under the ISO Guide 34, ISO/IEC 17025, ISO 9001 and ISO 13485 standards. This standard meets the requirements of a Certified Reference Material and a Primary Standard as defined by ISO and is traceable to the SI and higher order standards through an unbroken chain of comparisons.
- This standard has been gravimetrically prepared using balances that have been fully qualified and calibrated to ISO 17025 requirements. All calibrations utilize NIST traceable weights which are calibrated externally by a qualified ISO 17025 accredited calibration laboratory to NIST standards. Qualification of each balance includes the assignment of a minimum weighing by a qualified and ISO 17025 accredited calibration vendor taking into consideration the balance and installed environmental conditions to ensure compliance with USP tolerances of NMT 0.10% relative error. Balance calibration adjustments are performed weekly utilizing the balance's internal adjustment mechanism. Calibration verifications are performed pre-use. Weigh tapes from the calibration verification are included in the production batch record for this standard. Production data package available upon request.
- Fill volume is gravimetrically verified throughout the dispensing process using qualified and calibrated balances.
- Concentration is verified against an independently prepared calibration solution gravimetrically prepared.
- Each raw material utilized has been identified and thoroughly characterized through the use of multiple analytical techniques. Spectral data is provided on subsequent pages of this COA. The density and material Mass Balance Purity Factor is traceable to the SI and higher order reference standards through mass measurement and instrument qualification and calibrations.

Cerilliant certifies that this standard meets the specifications stated in this certificate and warrants this product to meet the stated acceptance criteria through the expiration/retest date when stored unopened as recommended. Product should be used shortly after opening to avoid concentration changes due to evaporation. Warranty does not apply to ampoules stored after opening.




Darron Ellsworth, Quality Assurance Manager

January 26, 2016

Date

### Solution Standard Verification

Concentration accuracy and within- and between-bottle homogeneity are analytically verified against an independently prepared calibration solution and to the prior lot.

Solution standard verification demonstrates confirmation that the specified requirements for the Primary Standard have been fulfilled and validated under ISO 13485.

Standard Solution Assay Parameters			Calibration Curve		
<b>Analysis Method:</b>	HPLC/UV		<b>Calibration Curve:</b>	Linear Regression	
<b>Column:</b>	Ascentis Express C18, 2.7 µm, 3.0 x 50 mm		<b>Number of Points:</b>	4	
<b>Mobile Phase:</b>	Acetonitrile:Water (50:50)		<b>Linearity (r):</b>	1.000	
<b>Flow Rate:</b>	1.2 mL/min				
<b>Wavelength:</b>	230 nm				

Standard Solution	Lot Number	Verified Concentration (mg/mL)		%RSD - Homogeneity	
		Actual Results	Acceptance Criteria	Actual Results	Acceptance Criteria
New Lot	FE11181503	1.004	± 3%	0.7	≤ 3%
Previous Lot	FE09101401	1.005	± 3%	0.7	≤ 3%

• Concentration is verified through multiple analyses and is calculated as the average of multiple analyses compared to an independently prepared calibration solution.  
 • Within-sample and between-sample homogeneity of the New Lot is ensured through rigorous production process controls statistically analyzed to evaluate risk and verified by analysis. Multiple samples pulled from across the lot using a random stratified sampling plan were analyzed to verify homogeneity. % RSD results shown above for the New Lot demonstrate ampoule-to-ampoule homogeneity.

### Analyte Certification - Mass Balance Purity Factor

Each analyte is thoroughly identified and characterized using an orthogonal approach. A mass balance purity factor is assigned incorporating chromatographic purity and residual impurities. The mass balance purity factor is utilized to calculate the weighing adjustment necessary to ensure accuracy of the solution standard concentration.

<b>Material Name:</b>	Nordiazepam	<b>Chemical Formula:</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O
<b>Material Lot:</b>	PC042810-04	<b>CAS Number:</b>	1088-11-5
		<b>Molecular Weight:</b>	270.71

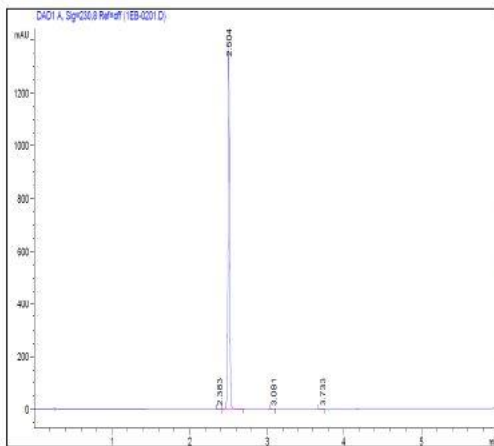
  

Material Characterization Summary		
Analytical Test	Method	Results
Primary Chromatographic Purity by HPLC/UV Analysis	SP10-0102	> 99.9%
Secondary Chromatographic Purity by GC/FID Analysis	SP10-0101	99.9%
Identity by GC/MS Analysis	SP10-0105	Consistent with Structure
Identity by <sup>1</sup> H-NMR Analysis	USP <761>, SP10-0116	Consistent with Structure
Residual Solvent Analysis by GC/FID Headspace	AM1087 <sup>1</sup>	0.16%
Residual Water Analysis by Karl Fischer Coulometry	AM1346 <sup>1</sup>	Below Quantitation Limit
Inorganic Content by Microash Analysis	SP10-0135	< 0.2%
Mass Balance Purity Factor		99.81%

• The primary chromatographic purity is calculated as the average of two independently performed analyses utilizing two different methods. Acceptance criteria requires the purity values to be within 0.5% of each other.  
 • The primary chromatographic purity value is used to calculate the Mass Balance Purity Factor.  
 • A secondary chromatographic purity method is utilized as a control.  
 • Mass Balance Purity Factor = [(100 - wt% residual solvent - wt% residual water - wt% residual inorganics) x Chromatographic Purity/100].  
 • Mass Balance Purity Factor does not include adjustment for chiral and/or isotopic purity.  
<sup>1</sup> Validated analytical method.

**Spectral and Physical Data**

**HPLC/UV**



**Column:** Ascentis Express C18, 2.7 µm, 3.0 x 50 mm

**Mobile Phase:** A: Acetonitrile

B: Water

Gradient:	Time (min)	% A	% B
	0.0	25	75
	4.0	80	20
	5.0	80	20
	5.1	25	75
	7.0	25	75

**Flow Rate:** 0.8 mL/min

**Wavelength:** 230 nm

**Data File Name:** RMN-010 P LC 14 2015-09-11 19-25-19-1EB-0201.D

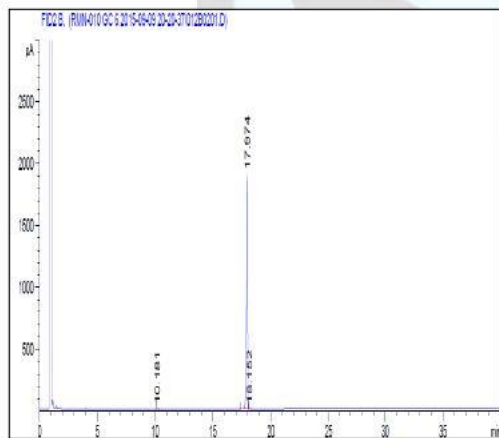
**Instrument:** LC#14

**Sample Name:** PC042810-04

**Acquired:** September 11, 2015

Peak #	Ret Time	Area	Height	Area %
1	2.38	0.25	0.16	0.01
2	2.50	2055.44	1372.05	99.98
3	3.08	0.09	0.06	0.00
4	3.73	0.10	0.06	0.01

**GC/FID**



**Column:** DB-35ms, 30 m x 0.53 mm ID, 1.0 µm film thickness

**Temp Program:** 40°C to 200°C at 40°C/min

200°C to 300°C at 5°C/min hold 16 min

**Injector Temp:** Cool-on-Column

**Detector Temp:** 325°C

**Data File Name:** RMN-010 GC 6 2015-09-09 20-20-37 012B0201.D

**Instrument:** GC#6

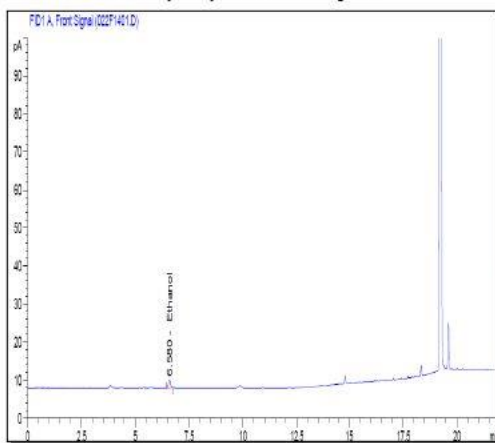
**Sample Name:** PC042810-04

**Acquired:** September 09, 2015

Peak #	Ret Time	Area	Height	Area %
1	10.18	0.78	0.19	0.01
2	17.97	13284.80	1897.74	99.95
3	18.15	6.28	1.11	0.05

**Spectral and Physical Data (cont.)**

**Residual Solvent Analysis by GC/FID Headspace**



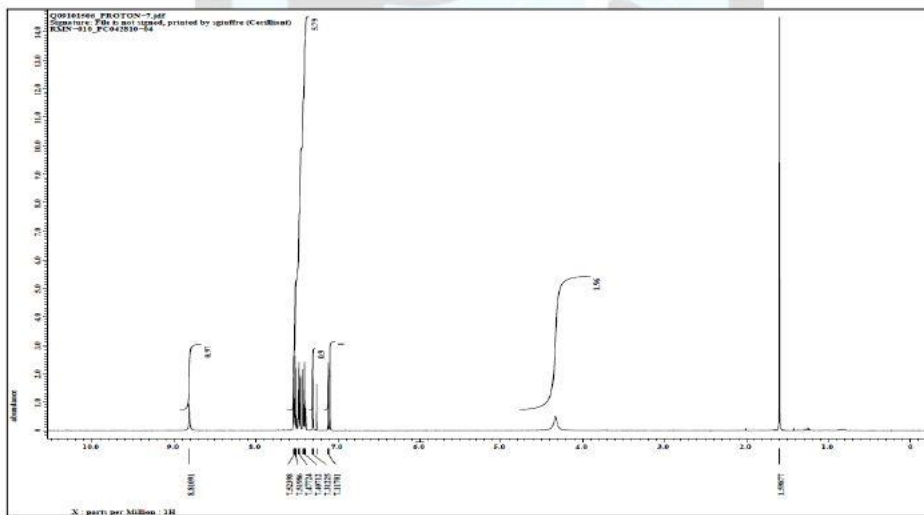
Column: DB-ALC1 30 m x 0.53 mm, 3 µm film thickness  
 Temp Program: 40°C (12 min) to 220°C at 40°C/min (5.5 min)  
 Carrier Gas: Helium  
 Flow Rate: 2.0 mL/min  
 Detector Heater Temp: 250°C  
 Injector: Headspace Sampler  
 HS Oven Temp: 60°C  
 Vial Equilibration: 10 minutes

Data File Name: 2015-09-08 14:40:58 022F1401.D  
 Instrument: GC#11  
 Sample Name: PC042810-04  
 Acquired: September 08, 2015

Peak	Compound	Area	Weight %
1	Ethanol	15.73	0.16
2	NMP	NA	NA
<b>Total</b>			<b>0.16</b>

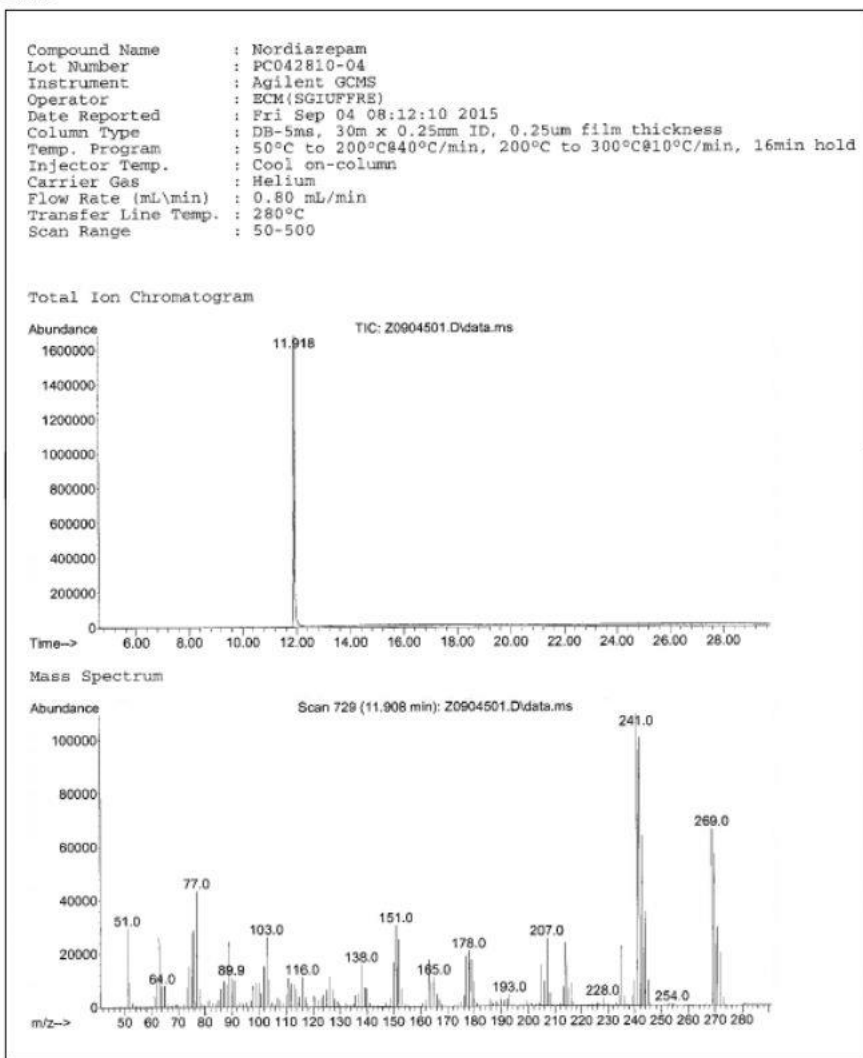
**<sup>1</sup>H NMR**

Instrument: JEOL ECS 400  
 Solvent: Chloroform-D



*Spectral and Physical Data (cont.)*

GC/MS



**Stability**

Short term stability studies have been performed under accelerated conditions for a period of up to four weeks. Short term data is utilized to predict long term stability and to support transport conditions and normal laboratory use. Real-time stability studies are performed at the recommended storage conditions over the life of the product.

**Short Term Stability:** A summary of accelerated stability findings for a related product (N-903, Nordiazepam-D<sub>3</sub>) is listed below.

Storage Condition	Mean Kinetic Temperature (MKT)	Time Period/Result
Freezer	-15°C	No decrease in purity was noted after four weeks.
Refrigerator	4°C	
Room Temperature	21°C	
40°C	40°C	

**Transport/Shipping:** Stability studies support the transport of this product at ambient conditions.

**Short Term Storage:** Stability data supports short term storage for up to 12 months at Refrigerate conditions.

**Long Term Stability:** Long term stability has been assessed for Freezer storage (-10 °C to -25 °C) conditions. Stability of a minimum of 60 months has been established through real-time stability studies.

**COA Revision History**

Revision No.	Date	Reason for Revision
00	January 26, 2016	Initial version

### Anexos 3. Certificados de análisis de excipientes

#### Certificado de análisis de almidón de maíz



# Ingredion

## CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Página 1 / 2  
Fecha: 13.02.2019

**Nombre de Cliente & Dirección**  
Empresa INGREDION PERU S.A.  
Carretera Central Km. 10,5 s/n  
Lima 06 LIMA 03  
PE

**Dirección de Embarque del Proveedor**  
Planta: Cali Manufactura  
CRA 5 No. 52-56  
CALI (VALLE DEL CAUCA) 76 76001  
CO  
Tel: (052) 4315000


**Información de Embarque del Cliente**  
No. Cliente: 0010010374  
Pedido de Compra del Cliente: 7000859783 /

**Información de Embarque del Proveedor:**  
No. Entrega: 0082149083  
Orden de Venta/Artículo: 0001746444 000010  
Cantidad: 490.000 UN

Nota: Producto elaborado y analizado en la planta 4550 ( Cali Manufactura )  
Producto: 03751008CE ALMIDON ✓  
USP-BS25-FM034580-EXP  
Marca: FARMAL USP 034580  
Lote: 0001531598 ✓

Fecha de Fabricación: 06.02.2019  
Fecha de Vencimiento: 05.02.2021 ✓

Análisis	Métodos	Resultados	Mínimo	Máximo
Humedad, %	USP. 2017. E	12.90	0.00	14.00
Agentes Oxidantes, ppm	USP. 2017. E	10.080	0.000	20.000
pH	USP. 2017. E	5.92	4.50	7.00
SO <sub>2</sub> , ppm	USP. 2017. E	5.760	0.000	50.000
Hierro, ppm	USP. 2017. E	0.100	0.000	10.000
Color Visual	PMOA 083/087	BLANCO	---	---
Olor	PMOA 083/087	LIBRE DE OLORES EX	---	INODORO
Identificación A (USP)	USP. 2017. E	PASA LA PRUEBA	PASA LA PRUEB	
Identificación B (USP)	USP. 2017. E	PASA LA PRUEBA	PASA LA PRUEB	
Identificación C (USP)	USP. 2017. E	PASA LA PRUEBA	PASA LA PRUEB	
Residuo de Ignición, %	USP. 2017. E	0.250	0.000	0.500
TPC. UFC/g	USP. 2017. E	< 10	0	500

Información Adicional	Responsables
Interpretación de las letras A, B, C ó D: A = Superior (Igual o similar al estándar) B = Aceptable (Pequeña diferencia en relación del estándar) C = No satisfactorio ( Gran diferencia en relación del estándar)	 <b>Responsable: LUZ ELENA CARDONA</b> JEFE DE LABORATORIO Documento emitido electrónicamente Emitido por: VVELASQUE

## Certificado de análisis de lactosa monohidratada



Page nr. 1/2

0805398411-900001-20181130-122444-2006-3420\_FONT\_05-000001

### Certificate of Analysis

<b>Customer number</b>	: 160569	<b>Lot/ Batchnumber</b>	: 22945454 ✓
<b>Customer name</b>	: Imperiac S.A.C.	<b>Date of production</b>	: 15.09.2018 ✓
<b>Delivery number</b>	: 805398411	<b>Expiry date</b>	: 13.09.2020 ✓
<b>Delivery Date</b>	: 06.01.2019	<b>Order number</b>	: 6349612
<b>Material number</b>	: 0747822	<b>Your order number</b>	: Port 04/18
<b>Material description</b>	: SuperTab® 11SD, spray (NZ) Lactose monohydrate USP-NF, Ph.Eur., JP Box, ALU+PE layer, 25kg nt		

Analysis				
Chemical & Physical				
Characteristic	Method of analysis	Unit	Specification	Results
Infrared absorption spectrum / Id A	USP-NF; Ph.Eur.; JP		Conforms to reference	Pass
Water / Id D Ph.Eur.	USP-NF; Ph.Eur.; JP	%(m)	4.5-5.5	5.0
Appearance of solution	Ph.Eur.		Not more intensely coloured than ref BY7	Pass
Lactose colour of sol.	USP-NF; JP		Nearly colourless	Pass
Lactose clarity of sol.	USP-NF; Ph.Eur.; JP		Clear	Pass
UV-Abs. 1% sol. 210-220 nm	USP-NF; Ph.Eur.; JP		0.00-0.25	0.07
UV-Abs. 1% sol. 270-300 nm	USP-NF; Ph.Eur.; JP		0.00-0.07	0.01
UV-Abs. 10% sol. 400 nm	USP-NF; Ph.Eur.; JP		0.00-0.04	0.00
Acidity (0.1N NaOH/6g)	USP-NF; Ph.Eur.; JP	ml	0.0-0.4	0.2
Specific optical rotation (anhydrous bas	USP-NF; Ph.Eur.; JP	Degree	54.4-55.9	55.1
Heavy Metals	USP-NF; Ph.Eur.; JP		max 5 ppm	Pass
Loss on Drying (2 hrs, 80°C)	USP-NF; JP	%(m)	0.0-1.0	0.2
Residue on ignition / Sulfated ash	USP-NF; Ph.Eur.; JP	%(m)	0.0-0.1	<0.1
Microbiological				
Characteristic	Method of analysis	Unit	Specification	Results
Total Aerobic Micro Count	Pharmacopeia Harmonized Methods	cfu/g	0-100	<100
Total Yeast & Mould Count	Pharmacopeia Harmonized Methods	cfu/g	0-10	<10
Escherichia coli (10 g)	Pharmacopeia Harmonized Methods		Negative	Negative
Salmonella (750g)	equal to ISO 6579		Negative	Negative
OTHERS				
Characteristic	Method of analysis	Unit	Specification	Results
Particle size <75 µm	Internal, ATM sonic sifter	%(m)	0-20	14
Particle size <150 µm	Internal, ATM sonic sifter	%(m)	40-65	55

Certificado de análisis gelatina en polvo



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Cliente: DROKASA PERU S.A.	
Producto: GELATINA COMESTIBLE 280 BLOOM	Fecha de Fabricación: 09-Marzo-2018
Cantidad: 800 X 25 Kg = 20.000 Kg	Fecha de Vencimiento: 09-Marzo-2023
Lote: C06.18	Fecha emisión del certificado: 14-Marzo-2018

CARACTERISTICAS	PARAMETROS	LIMITES	RESULTADOS
FISICO-QUIMICAS	Bloom	≥ 280 g/Bl	283 g/Bl
	Viscosidad	> 32,0 mP	44,0 mP
	pH	5,0 – 6,5	5,91
	Granulometría	Malla 40	Malla 40
	Humidad	8 - 12 %	8,95 %
	Dióxido de Azufre (SO <sub>2</sub> )	≤ 10 ppm	0,92 ppm
	Cenizas	< 2 %	0,58 %
	Cromo(***)	< 2 ppm	0,40 ppm
	Arsenio (As) (***)	< 0,5 ppm	< 0,05 ppm
	Mercurio (Hg) (***)	< 0,15 ppm	< 0,025 ppm
	Plomo (Pb) (***)	< 5 ppm	< 0,05 ppm
	Cadmio (Cd) (***)	< 0,5 ppm	< 0,05 ppm
	Metales Pesados (***)	< 5 ppm	No Detectado
MICROBIOLOGICAS	Recuento de aerobios mesófilos	<100 UFC/g	<10 UFC/g
	Coliformes totales	Ausente/g	Ausente/g
	Coliformes fecales	Ausente/g	Ausente/g
	Anaerobios	0 UFC/g	0 UFC/g
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente/g	Ausente/g
	Licuefacientes	0 UFC/g	0 UFC/g
	<i>Streptococcus</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	Hongos y Levaduras	≤10 UFC/g	<10 UFC/g
	<i>Salmonella sp</i>	Ausente/25g	Ausente/25g

(\*\*\*) Esta propiedad es verificada cada seis meses en laboratorio externo.

Certificado de análisis dióxido de silicio



FUMED METAL OXIDE CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sales Order Number	032114607480SX / 1	
Customer P.O. Number	CABP-06/18	
Manufacturing Plant	Rheinfelden	Amerix Peruana SAC
Grade	CAB-O-SIL® MSP	Av. Faustino Sánchez Carrión 611
Customer Grade		Of. 504
Quantity Shipped	1,800 KG	Jesús María
Carrier Name	KUEHNE+NAGEL NV	Lima LIMA 11
Vehicle ID		
Lot Number	4555560	
Shipping Date	12 Jul 2018	Pack Date 05 May 2018

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES					
Property Description	Unit	Ref	Specification Min	Average	Specification Max
BET Surface Area	m <sup>2</sup> /g	FMOCTM203	185.0	201.8	215.0
pH		FMOCTM100	3.850	4.020	4.150
325 Mesh Residue	%	FMOCTM120		0.0035	0.0200
Appearance		FMOCTM201		WHITE	

Product Specification

032114573135 9 May 18      032114506643 31 Jan 18      032114414414 1 Sep 17      032114307581 9 Mar 17

Signature: Beate Scheidemantel Lab Manager Quality

# Certificado de análisis de estearato de magnesio



## QUALITÄTSMANAGEMENT CERTIFICATE OF ANALYSIS

**customer:** DROCERSA SA  
**contact person:**  
**FAX:**  
**order-number:** 20171201 **despatch number:** 1738166  
**delivered on:** 2017-12-20 **quantity:** 8400  
**brand:** LIGAMED MF-2-V **batch-no.** C752329 ✓  
Magnesium Stearate ✓  
**manufacturing date:** 10/2017 ✓ **expiry date:** 10/2021 ✓

The product is in accordance with the USP40/NF35/BP2017/Ph.Eur 9.2 ed./JP17th. ed. Material is derived from edible non-animal source.

parameter	unit	method	lower	Specification	upper	result
Identification A	°C	Ph.Eur	53			60
Identification A	metal reaction	USP/NF		Passes test		Passes test
Identification B	retention time	USP/NF		Retentions match		Retentions match
Heavy metals as Pb	ppm	JP			20	<20
Lead	ppm	BAE 300-B			5	<1,0
Cadmium	ppm	BAE 300-B			3	<1,0
Nickel	ppm	BAE 300-B			5	<1,0
Sulphate	%	Ph.Eur			0,5	<0,1
Acid value of the fatty acid	mg KOH/g	Ph.Eur	195		210	204,5
Relative content of stearic acid	%	Ph.Eur	60		70	67,6
Rel. cont. of stearic and palmitic acid	%	Ph.Eur	95			99,1
Aerobic microbial count	cfu/g	USP/NF			1000	<10
Moulds & Yeasts	cfu/g	USP/NF			100	<10
Escherichia coli	cfu/g	USP/NF		Absent		Absent
Salmonella Species	cfu/10g	USP/NF		Absent		Absent
Residual Solvents		USP/NF		Meets USP/NF		Meets USP/NF
Loss on drying	%	BAE 600			4	2,9
Magnesium content	%	BAE 200 o	4,2		4,8	4,5
Free fatty acid	%	BAE 400			2	0,4
Sieve residue at 200 mesh	%	BAE 605			1	0,7
Bulk density tapped	g/ml	BAE 611a	0,27		0,37	0,35
specific surface area BET	m2/g	USP/NF	6		10	6,1
Contamination		BAE 601		In accordance		In accordance
Chloride	ppm	BAE-627			100	<100
Acidity or	ml 0,1N HCl	Ph.Eur			0,05	<0,05
Alkalinity	ml 0,1N NaOH	Ph.Eur			0,05	<0,05
PSD D10	µm	BAE-700-B			5	3,3
PSD D50	µm	BAE-700-B	7		11	9,4
PSD D90	µm	BAE-700-B			35	27,7

Venlo, 2017-12-20

The data of the above mentioned delivery are based upon careful testing according to the guidelines of our quality assurance system. They do not release the customer from entry control. Besides we do not guarantee special properties for particular applications.

This COA is issued electronically and does not bear a signature. The results in this CoA were validated and released by QA of Peter Greven Nederland C.V., Pieter Gommans, Quality Manager.

Peter Greven Nederland Edisonstraat 1 NL-5928PG Venlo

Fax: +31 (77) 3239320  
Phone: +31 (77) 3239323



Certificado de análisis de talco en polvo



Certificate of Analysis

1.08070.9051 PARTECK® LUB Talc EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JP, USP  
 Batch K50846570

	Spec. Values		Batch Values	
Identity	passes test		passes test	
Acid soluble matter	≤ 2.0	%	≤ 2.0	%
Water-soluble substances	≤ 0.1	%	≤ 0.1	%
Acidity or alkalinity	passes test		passes test	
Al (Aluminium)	≤ 2.0	%	≤ 2.0	%
As (Arsenic)	≤ 0.0003	%	≤ 0.0003	%
Ca (Calcium)	≤ 0.9	%	0.3	%
Co (Cobalt)*	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Fe (Iron)	≤ 0.25	%	0.02	%
Mg (Magnesium)	17.0 - 19.5	%	18.8	%
Ni (Nickel)*	≤ 0.0020	%	≤ 0.0020	%
Pb (Lead)*	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
V (Vanadium)*	≤ 0.0010	%	≤ 0.0010	%
Asbestos (IR spectroscopy)	not detectable		not detectable	
Loss on ignition (1100 °C)	≤ 6.5	%	5.6	%
Residual solvents (Ph Eur/USP/ICH)	excluded by the manufacturing process		passes test	
Particle Size (d10)	≥ 2	µm	≥ 2	µm
Particle Size (d50)	about 30	µm	about 30	µm
Particle Size (d90)	≤ 65	µm	≤ 65	µm
Specific surface area (BET)	2.0 - 4.0	m <sup>2</sup> /g	3.4	m <sup>2</sup> /g
Microbiological test (Total yeast and mould count (TYMC))	≤ 50	CFU/g	≤ 50	CFU/g
Microbiological test (Total aerobic microbial count (TAMC))	≤ 100	CFU/g	≤ 100	CFU/g
Microbiological test (Candida albicans (absent in 1 g))	passes test		passes test	
Microbiological test (Escherichia coli (absent in 1 g))	passes test		passes test	
Microbiological test (Pseudomonas aeruginosa (absent in 1 g))	passes test		passes test	
Microbiological test (Salmonella ssp (absent in 10 g))	passes test		passes test	
Microbiological test (Staphylococcus aureus (absent in 1 g))	passes test		passes test	

Elemental impurity specifications have been set considering ICH Q3D (Guideline for Elemental Impurities). Class 1-3 elements are not likely to be present above the ICH Q3D option 1 limit, unless specified and indicated (\*).  
 Conforms to Ph Eur, BP, JP, USP

Date of examination (DD.MM.YYYY) 05.12.2018 ✓  
 Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.12.2023 ✓

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0  
 EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany  
 400 Summit Drive, Burlington, MA 01803, USA, Phone +1 (781) 533-6000

## Anexo 4. Descripción de parámetros de columna

11-108-2\_PB HPLC columns:PB 03.11.11 15:18 Seite 1

S.00000.1975-xxxxxxx

### Particulate analytical HPLC columns

(LiChrosorb®, Lichrospher®, Superspher®, Purospher® and Aluspher®)



### General information and Guidelines for Care and Use

Thank you for choosing an analytical HPLC column from Merck Millipore [EMD Millipore]. Each column is individually packed and tested to ensure superior performance documented in the certificate of analysis containing a test chromatogram, column number, sorbent Lot number and important performance data specific to your column.

Please examine your column for possible damage caused in transit. If damage has occurred, immediately notify your local Merck Millipore or EMD Millipore representative and the delivery carrier.

#### Column hardware and pressure stability

HPLC and UHPLC columns from Merck Millipore [EMD Millipore] come in a variety of different column hardware formats and materials for different applications. All columns have 10–32 UNF female end fittings that connect to 1/16" capillary tubing. Note that removing pre-installed end fittings from HPLC columns might damage the column bed and reduce performance.

Particulate silica columns for reversed phase and normal phase HPLC are delivered in stainless steel column hardware; either as ready-to-use Hibar® columns or as the LiChroCART® cartridge system comprising separately ordered, re-usable end fittings (manu-CART®). Hibar® HR columns have extra-high pressure stability and extremely small internal dead volumes, making them especially suitable for use in UHPLC instruments. Both Hibar® and LiChroCART® columns have stainless steel frits to keep the stationary phase particles in place.

	Column type	Holder needed	Pressure stability
LiChroCART®	Cartridge	Yes (manu-CART®)	250 bar
Hibar® RT	HPLC Column	no	400 bar
Hibar® HR	UHPLC Column	no	600 bar

#### Calculation of column void time

Knowledge of the void time  $t_m$  is important for the calculation of chromatographic parameters like  $k$  and  $u$ . The void time may be calculated from the volume of the empty column  $V_{empty}$ , the volume flow  $v_f$  and the porosity of the carrier material. The total porosity of a column is the volume fraction occupied by the mobile phase.

$$e = \frac{V_m}{V_{empty}}$$

$$t_m = \frac{V_{empty}}{v_f} e$$

For totally porous materials like silica and modified silica,  $e$  is between 0.7 and 0.8. The void time may also be determined by measuring the retention time of non-retarded sample substances.

#### Determination of column void time

Adsorption chromatography on silica gel: UV detection: benzene, tetrachloroethylene; RI detection: cyclohexane, benzene. When using very weak solvents, benzene and tetrachloroethylene may also be retarded.

Reversed-phase HPLC: UV detection: thiourea. RI detection:  $D_2O$ ,  $CD_3OH$ ,  $CD_3CN$ , eluent itself.

#### Empty column volumes

Column length (mm)	Column id (mm)	Column volume (mL)	Min. washing volume (mL) (10 column volume)
125	2	0.4	4
250	2	0.8	8
30	2.1	0.10	1
50	2.1	0.17	1.7
100	2.1	0.35	3.5
125	3	0.9	9
250	3	1.8	18
125	4	1.6	16
250	4	3.2	32
100	4.6	1.7	17
150	4.6	2.5	25
250	4.6	4	40

#### Flow rates and sample size

The Optimal flow rate and the sample size (sample amount and sample volume) depends on the column inner diameter. Typical flow rates and orientation values for the loading capacities for different inner diameter columns can be found in the table below:

Column dimensions (mm)	Typical flow rates (mL/min)	Sample amount (mg)	Sample volume (µL)
150-1	0.06	ca. 0.05	0.05–1
250-2	0.25	ca. 0.2	0.2–5
250-3	0.6	ca. 1	1–20
250-4	1	ca. 5	5–80
250-10	6	ca. 30	30–500
250-25	39	ca. 200	200–3000

#### Column installation

Merck Millipore [EMD Millipore] HPLC and UHPLC columns are designed to fit any HPLC instrument; however, care should be taken at installation so as not to introduce dead volumes in the connections, which would reduce separation efficiency. Note that stainless steel tubing fittings are inflexible and cannot be adapted to different port designs after the first installation, whereas PEEK fittings can be adjusted for different columns several times. Also note that stainless steel fittings and ferrules can damage the end fittings of PEEK column hardware, especially if installed with excessive force by using wrench tools.

Merck Millipore [EMD Millipore] columns should be installed with the flow arrow on the label pointing towards the detector. Before the column outlet is connected to the detector, it is wise to flush the column with mobile phase.

#### Column equilibration

Proper column equilibration is time well spent as it will give you more consistent results and reduce trouble-shooting. This is of special importance with LiChroCART® cartridges, because the columns are not closed and can dry out easily. LiChroCART® cartridges need to be flushed properly before use.

Verify that your mobile phase is miscible with the shipping solvent before starting to flush or equilibrate the column.

Gradually increase the flow rate in small steps until it satisfies your conditions. Flush the column with your mobile phase until you obtain a stable baseline. Mobile phases with additives in low concentrations (e.g. paired-ion reagents) may require longer equilibration times.

Reversed phase columns (RP-18, RP-8) are shipped in acetonitrile/water. If the column has dried out during storage or shipping, thoroughly activate the packing by flushing with 10–20 column volumes of pure organic solvent (e.g. acetonitrile) before equilibrating the column with the mobile phase.

Normal phase columns (Si, NH<sub>2</sub>, CN, Diol) are shipped with n-heptane/dioxane (99/1). If they are going to be used with aqueous eluents, flush the column with ethanol or 2-propanol before you equilibrate with the mobile phase.

#### Column care

- Do not exceed the pH stability range of the sorbent
- Always avoid dramatic changes in running conditions
- Always degas and filter mobile phases
- Protect your column from contamination (filter through 0.45 µm for HPLC and 0.2 µm for UHPLC columns and use proper sample preparation)
- Store RP-columns in pure acetonitrile or a mixture of organic solvent (e.g. acetonitrile or methanol) and water (e.g. 50/50)

#### Mobile phase

Use only high-quality HPLC grade solvents and HPLC grade buffers, freshly prepared, filtered (0.45 µm) and degassed before use. Degassing mobile phases prevents bubble formation.

Buffers, organic modifiers and ion pair reagents present no problems as long as the appropriate pH stability range is not exceeded. Ion pair reagents are often difficult to completely flush from the column. Therefore columns used with these reagents should be dedicated to the particular analysis involved. Do not exceed the pH stability range of the column. Higher pH values will dissolve the silica, creating voids in the column. Lower pH values can eventually strip away some of the bonded phase. These defects will cause changes in retention times and loss of resolution. Verify that solvents are miscible when changing mobile phases and that no buffer precipitation will occur. Si (silica) columns are generally used with solvents such as n-heptane and dioxane, which are typical solvents for adsorption chromatography.

#### pH stability

Silica-based stationary phases have a limited pH stability. A pH higher than the limit will dissolve the silica, creating voids in the column. A lower pH can strip away some of the bonded phase resulting in defects that will cause changes in retention times and loss of resolution. pH stability ranges for stationary phases from Merck Millipore [EMD Millipore] are presented in the table below. Do not use strong acids (e.g. hydrochloric, nitric, and sulfuric acids) in the column. Limit your use of strong bases (e.g. sodium, potassium, ammonium hydroxide) to amounts needed to adjust the pH of the mobile phase.

When measuring the pH of mobile phases, the measurement should be done in the aqueous media before mixing the eluent with organic solvents. Although this will not give the actual pH in the mixed aqueous-organic solvent, it will give more consistent results than a mixed mobile phase.

Phase	pH stability range	Max. temperature
LiChrospher®	2–7.5	60 °C
Superspher®	2–7.5	60 °C
LiChrosorb®	2–7.5	60 °C
Purospher®	2–8	65 °C
Purospher® STAR RP-18e and RP-8e	1.5–10.5	65 °C
Aluspher® RP-select B	2–12	60 °C

#### Temperature

The maximum operating temperatures are stated in the table above. To avoid band broadening and loss of separation efficiency the mobile phase should always be kept at the same temperature as the column. This can be done either through the use of active heaters or by passive heating using a short piece of capillary tubing within the column oven.

#### Column storage

Reversed phase columns should be stored in a pure acetonitrile or a mixture of organic solvent (e.g. acetonitrile or methanol) and water (e.g. 50/50).

Storing the column in buffers for a prolonged time will shorten the lifetime of the column. Before extended storage (i.e. over the weekend or long term storage), the columns should be thoroughly rinsed-out from buffer salts, or ion-pair reagents which can cause bacterial growth or precipitate in the stationary phase or the HPLC system. The following procedure is recommended: First flush the column with 10–20 column volumes of mobile phase minus buffer, then with 10–20 column volumes of the shipping solvent (acetonitrile/water, 75/25).

Alternatively, follow this protocol if the mobile phase contains a buffer: Flush with 5–10 column volumes water, then with 20–50 column volumes organic solvent/water (e.g. acetonitrile/water, 1/1). After flushing with 20 column volumes of the storage solvent (e.g. preferably acetonitrile), the column can be easily stored. By rinsing with acetonitrile, also aprotic impurities can be removed from the column.

#### Column regeneration

Exposure of a column to samples or solvents containing highly adsorptive components will result in increased back pressure and a change in selectivity. Often the column can be restored to original performance by suitable wash protocols. When performing solvent rinse regeneration, the column should be reversed and transferred from the analytical HPLC system to a simple, inexpensive pump.

Alternatively, disconnect the column from the detector and rinse directly to waste. Each solvent should be rinsed with a minimum of 20, preferably 30, column volumes.

Separation mode	Phases	Wash sequence
RP [reversed-phase]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LiChrosorb® RP-8, RP-18, (Diol, CN, NH<sub>2</sub>)*</li> <li>• LiChrospher® RP-8, RP-18, (Diol, CN, NH<sub>2</sub>)*</li> <li>• Purospher® STAR RP-8e, RP-18e, (NH<sub>2</sub>)*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Water</li> <li>• Acetonitrile</li> <li>• 2-Propanol + 0.1% formic acid</li> <li>• Heptane</li> <li>• 2-Propanol + 0.1% formic acid</li> <li>• Acetonitrile</li> <li>• Mobile phase</li> </ul>
NP [normal phase]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LiChrosorb® Si, Diol, CN, NH<sub>2</sub></li> <li>• LiChrospher® Si, Diol, CN, NH<sub>2</sub></li> <li>• Purospher® STAR Si, NH<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heptane</li> <li>• Chloroform</li> <li>• Ethanol or 2-propanol</li> <li>• Chloroform</li> <li>• Heptane</li> <li>• Mobile phase</li> </ul>

#### Special recommendations for fast and ultra fast HPLC [UHPLC]

##### Detector response time

Most HPLC detectors have a variable response time or time constant. In setting this parameter the „reaction speed“ of the detector can be controlled by an electronic damping device. If the response time is too slow, peaks may appear broad and tailing. UHPLC columns like Hibar® HR Purospher® STAR typically produce fast narrow peaks, particularly when run at flow rates faster than 1 ml/min. Fast peaks on Hibar® HR Purospher® STAR columns require a fast time constant, such as 0.1 second.

Please note – by reducing the time constant from 2 to 0.1 sec the plate count for Hibar® HR Purospher® STAR columns may improve up to 100 %!

##### Data system settings

Fast chromatographic peaks can be just a few seconds wide. For good integration of the peak area and good optical presentation of the chromatogram, the data system settings must enable approximately 20 data samples to be acquired during the peak width time. We recommend checking the data acquisition rate of

## Anexo 5. Propiedades fisicoquímicas de solventes empleados en HPLC

### Miscellaneous Solvent Properties

Solvent	UV Cutoff (nm) <sup>a</sup> [2]	RI <sup>b</sup> [3]	Viscosity (cP) [3]	Boiling Point (°C) <sup>c</sup> [3]	$\epsilon$ (silica) <sup>d</sup>
Acetone	330	1.359	0.36	56	0.53
Acetonitrile	190	1.344	0.38	82	0.52
1-Butanol	215	1.399	2.98	118	0.40
1-Chlorobutane	220	1.402	0.45	78	0.20
Chloroform	245	1.446	0.57	61	0.26
Cyclohexane	200	1.424	1.00	81	0.00
Dimethyl formamide	268	1.430	0.92	153	—
Dimethylsulfoxide	268	1.478	2.24	189	0.50
1,4-Dioxane	215	1.422	1.37	101	0.51
Ethyl acetate	256	1.372	0.45	77	0.48
Heptane	200	1.388	0.40	98	0.00
Hexane	195	1.375	0.31	69	0.00
Isooctane	215	1.391	0.50	99	0.00
Methanol	205	1.328	0.55	65	0.70
Methyl- <i>t</i> -butyl ether	210	1.369	0.27	55	0.48
Methylethyl ketone	329	1.379	0.43	80	0.40
Methylene chloride	233	1.424	0.44	40	0.30
<i>i</i> -Propanol	205	1.377	2.40	82	0.60
<i>n</i> -Propanol	210	1.386	2.30	97	0.60
Tetrahydrofuran	212	1.407	0.55	66	0.53
Toluene	284	1.497	0.59	111	0.22
Water	190	1.333	1.00	100	

<sup>a</sup>Wavelength at which solvent absorbs 1.0 AU in a 10-mm cell.

<sup>b</sup>Refractive index.

<sup>c</sup>Boiling point.

<sup>d</sup>Solvent strength parameter [4].

## Anexo 6. Comparación de guías de selección de solventes

Class	Solvent	Conclusion (Pfizer)	Conclusion (GSK)	Conclusion (Sanofi)
Alcohols	Methanol	Preferred	Some issues	Recommended
	Ethanol	Preferred	Some issues	Recommended
	1-Propanol	Preferred	Some issues	Recommended
	<i>i</i> -Propanol	Preferred	Some issues	Recommended
	1-Butanol	Preferred	Few issues	Recommended
	2-Butanol		Few issues	Recommended
	<i>t</i> -Butanol	Preferred	Some issues	Substitution advisable
	Ethylene glycol	Usable		Substitution advisable
	2-Methoxyethanol		Major issues	Substitution requested
Hydro-carbons	<i>n</i> -Pentane	Undesirable		Banned
	Hexane(s)	Undesirable	Major issues	Substitution requested
	Cyclohexane	Usable	Some issues	Substitution advisable
	Methylcyclohexane	Usable		Substitution advisable**
	Heptane	Usable	Some issues	Substitution advisable
	Isooctane	Usable	Some issues	
	Benzene	Undesirable	Major issues	
	Toluene	Usable	Some issues	Substitution advisable
	Xylene(s)	Usable	Some issues	Substitution advisable
Dipolar aprotic	DMSO	Usable	Some issues	Substitution advisable
	Acetonitrile	Usable	Major issues	Recommended
	DMF	Undesirable	Major issues	Substitution requested
	DMAc*	Undesirable	Major issues	Substitution requested
	NMP	Undesirable	Major issues	Substitution requested

\* Listed as 'dimethyl acetate' in the original Pfizer publication [45].

\*\*Coloured yellow but in the original Sanofi publication accompanied with the comment reserved for red shaded entries 'substitution requested' [44].

Solvent	Safety	Health	Environment	Conclusion*	Revised conclusion
DMSO	1	1	5	Recommended	Problematic
Sulpholane	1	9	7	Hazardous	Not needed
Acetonitrile	4	3	3	Recommended	Problematic
DMF	3	9	5	Hazardous	Not needed
DMAc	1	9	5	Hazardous	Not needed
NMP	1	9	7	Hazardous	Not needed
DMPU	1	6	7	Problematic	Not needed

Clasificación según el grupo Chem21