



Universidad Nacional Autónoma  
de México



Facultad de Estudios Superiores  
"CUAUTITLÁN"

**DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS  
PARA LA CUANTIFICACION DE DICLOFENAC DIETILA-  
MONIO EN CREMA EN SUS DIFERENTES ETAPAS DE  
FABRICACION Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
**LUIS FELIPE TORRES GARDUÑO**

Director: Q.F.B. Isabel Domínguez Suárez  
Coasesor: Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# INDICE

	PAGINA
1. INTRODUCCION.....	1
2. GENERALIDADES.....	4
2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE DICLOFENAC DIETILAMONIO....	5
2.2 METODOS ANALITICOS EMPLEADOS.....	8
2.2.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.....	8
2.2.2 ESPECTROFOTOMETRIA.....	26
2.2.3 VOLUMETRIA.....	34
3. OBJETIVOS.....	39
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	41
4.1 REACTIVOS, DISOLVENTES Y ESTANDARES.....	42
4.2 EQUIPO Y MATERIAL.....	42
4.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA CADA METODO ANALITICO....	43
4.3.1 METODO POR CLAR.....	43
4.3.2 METODO ESPECTROFOTOMETRICO.....	45
4.3.3 METODO VOLUMETRICO.....	47
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
5.1 CROMATOGRAMAS, ESPECTROS Y GRAFICAS.....	50
5.2 CRITERIOS DE VALIDACION PARA CADA METODO ANALITICO.....	55
5.2.1 CLAR.....	55
5.2.2 ESPECTROFOTOMETRIA.....	64
5.2.3 VOLUMETRIA.....	70
6. CONCLUSIONES.....	75
7. RECOMENTACIONES.....	77
ANEXO 1 CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS....	79
8. BIBLIOGRAFIA.....	95

## 1. INTRODUCCION

Uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica es asegurar un adecuado control de calidad de los medicamentos, es por esto que la validación retrospectiva y prospectiva hoy en día ha tomado una gran importancia.

La validación de métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son: precisión, linealidad, reproducibilidad y exactitud, entre otros. De aquí se obtiene información sobre la confiabilidad del método analítico que se emplea en el análisis del (los) activo (s) presente (s) en una forma farmacéutica.(11).

Por otra parte, los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son establecidos por la Secretaría de Salud de cada país, F.D.A. ( Foods Drugs and Administration) las cuales dan una serie de normas o especificaciones legales que respaldan al método analítico. Tomando esta referencia, cada laboratorio de acuerdo a sus necesidades llevará a cabo una validación del método analítico.

En este trabajo se presentan 3 métodos analíticos diferentes desarrollados y validados para un mismo activo (diclofenac dietilamonio). De la revisión bibliográfica realizada desde que fue patentado este activo a la fecha no se encontró gran información sobre sus características fisicoquímicas, es por esto que al diseñar, desarrollar y validar varios métodos analíticos se conoce más sobre el diclofenac dietilamonio. El primer método analítico es un método potenciométrico para determinar diclofenac dietilamonio materia prima. El segundo método analítico es un método espectrofotométrico para determinar diclofenac dietilamonio en crema, producto en proceso y/o producto terminado. El tercer método es un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para determinar la estabilidad del producto. Los dos primeros métodos son rápidos, sencillos y de costo bajo, mientras que el tercero su principal característica es ser específico y selectivo.

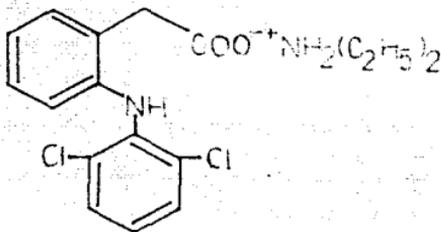
Por último, este trabajo puede servir de ayuda a las personas interesadas en la validación de métodos analíticos, ya que presenta la metodología mínima necesaria para validar un método analítico dependiendo de la utilización del mismo.

## 2. GENERALIDADES

## 2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE DICLOFENAC DIETILAMONIO:

Cuando se hizo la revisión bibliográfica a diclofenac dietilamonio desde que apareció su patente a la fecha, se encontró poca información sobre sus propiedades fisicoquímicas. La mayoría de estas propiedades del activo se obtuvieron a partir de análisis realizados en CAFET,S.A. El diclofenac dietilamonio es la sal amónica del diclofenac el cual es un antiinflamatorio de tipo no esteroideal.

### ESTRUCTURA QUIMICA:



FORMULA CONDENSADA:  $C_{16}H_{15}Cl_2NaO_2$

PESO MOLECULAR: 367.25 g/mol

### DESCRIPCION:

Polvo granuloso de color blanco a ligeramente amarillento, de olor picante y sabor amargo.

### SOLUBILIDAD:

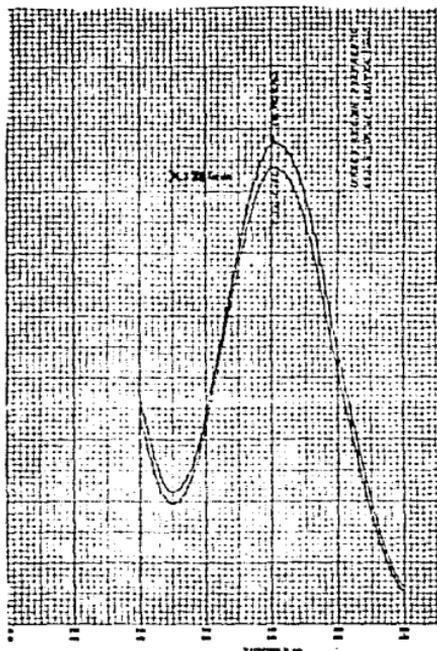
Soluble en metanol, etanol y cloroformo, ligeramente soluble en tetracloruro de carbono, dimetilformamida, muy ligeramente soluble agua, facilmente soluble en NaOH 0.1N, practicamente insoluble en HCl 0.1N.

PUNTO DE FUSION : 147-149 °C.

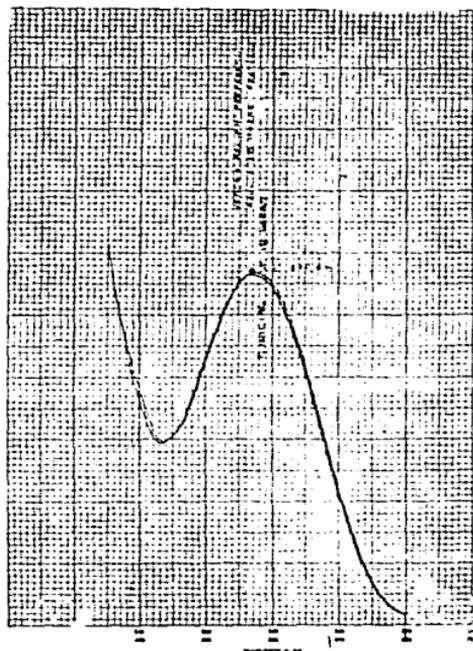
HUMEDAD: Menor al 0.5 %. (MÉTODO TRITRIMÉTRICO).

ABSORCIÓN AL UV.

En solución metanólica muestra un máximo de absorción a 281 nm  
y en solución de NaOH 0.1N a 275 nm.(ver figura 1).



(a)



(b)

FIGURA NO. 1-- Absorción al ultravioleta del diclofenac dietilamonio. a) en solución metanólica . b) en NaOH 0.1 N. En ambos la concentración es de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

## ESPECTRO DE INFRARROJO:

Los principales picos se encuentran a una longitud de onda de 1572, 756, 1504, 775, 1286, 1308 nm.

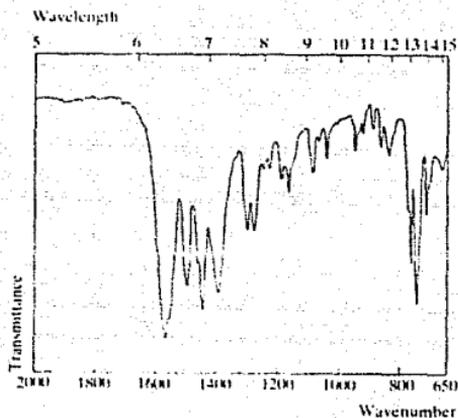


FIGURA No. 2.- Espectro de infrarrojo del diclofenac dietilamonio en una dispersión de bromuro de potasio.

## 2.2 METODOS ANALITICOS EMPLEADOS:

### 2.2.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION. (1,2,3,7,9,10,21).

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una técnica analítica muy utilizada en la actualidad para el análisis de activos. Tiene una alta especificidad así como un amplio intervalo de sensibilidad que hace ideal el análisis de muchos activos tanto en formas farmacéuticas como en fluidos biológicos. Comparando la CLAR con la cromatografía de gases (CG) se encuentran similitudes y diferencias. En ambos métodos la separación de los componentes de una mezcla se lleva a cabo con una corriente de flujo. Los mecanismos de retención difieren grandemente. En CLAR y en CG los componentes a separarse interaccionan preferentemente con la fase estacionaria y son retenidos a lo largo de esta. En CG, la fase móvil, o gas acarreador, tiene poco efecto sobre la separación. En CG se caracteriza por tener pocas fases móviles y muchas fases estacionarias, por otro lado, en CLAR se cuenta con pocas fases estacionarias y con gran diversidad de fases móviles, usándose esta en composiciones binarias, terciarias y ocasionalmente cuaternarias. Además puede utilizar soluciones reguladoras con control de pH para modificar la retención. En CG se utiliza programación de temperatura así como de flujo que puede aprovecharse para aumentar la separación. En CLAR solo se puede hacer programación de flujo y gradientes de concentración en la composición de la fase móvil: en muy raras ocasiones se hace programación de temperaturas.

#### TEORIA:

Existen varios procesos o mecanismos de separación para la

retención de las moléculas por la fase estacionaria en la cromatografía líquida. Estos pueden clasificarse de acuerdo a las fases involucradas:

- 1) Cromatografía líquido-líquido (CLL)
- 2) Cromatografía líquido-sólido (CLS)
- 3) Cromatografía de intercambio iónico
- 4) Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía líquido-sólido es llamada también cromatografía de adsorción; esta emplea partículas con una alta área superficial como fase estacionaria que adsorben moléculas de soluto. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción. Usualmente se utilizan sólidos polares como sílica gel, alúmina ( $Al_2O_3$ ) o vidrios porosos, y una fase móvil no polar como cloroformo, heptano u octano. Mas específicamente, la separación se dá por diferencias en la afinidad de los solutos por la superficie de la fase estacionaria. Ver figura 3.

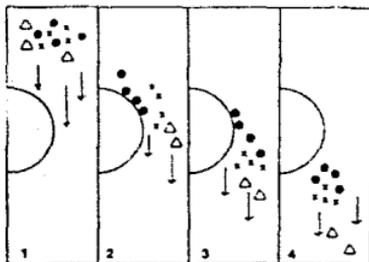


FIGURA No. 3.- Se observa el mecanismo de separación de una cromatografía líquido-sólido. • componente muy polar, x componente medianamente polar, Δ componente poco polar.

Generalmente en CLS los componentes se eluyen en orden contrario a sus polaridades.

La cromatografía liquido-liquido o cromatografía de partición involucra una fase estacionaria liquida la cual esta sobre un soporte sólido inerte. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre la fase móvil y estacionaria liquida determinando así la separación. La fase estacionaria puede ser polar o no polar. Si la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar, se le llama cromatografía de partición en fase normal. Si tenemos el caso contrario se llama cromatografía de partición en fase inversa. Ver figura 4 .

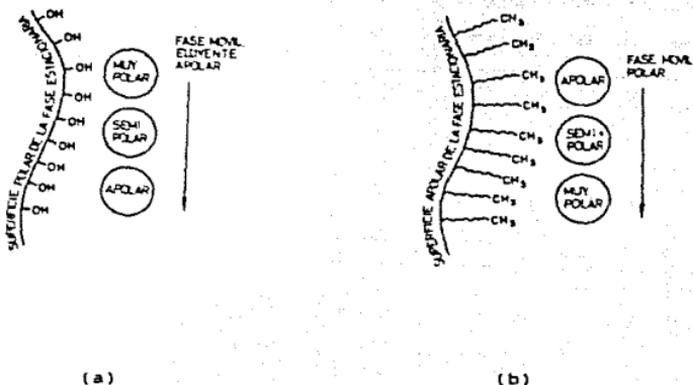
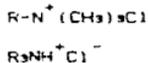


FIGURA No. 4.- a) Cromatografía liquido-liquido en fase normal y b) Cromatografía liquido-liquido en fase inversa.

La cromatografía de intercambio iónico usa una fase estacionaria que pueda intercambiar cationes o aniones con la fase móvil. La fase estacionaria debe tener una carga contraria a la de la muestra. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente estará atraída hacia la superficie iónica y por lo tanto tardará más tiempo en ser eluida. Para controlar el tiempo de elución se ajusta el pH y polaridad. Los materiales usados como intercambiadores iónicos son resinas poliméricas las cuales se clasifican en catiónicas y aniónicas. Cada tipo de material puede subdividirse en intercambiadores fuertes o débiles. Frecuentemente los grupos ácidos sulfónicos ( $R-SO_3^-H^+$ ) son usados como intercambiadores catiónicos fuertes. Para intercambiadores catiónicos débiles hay muchos ácidos carboxílicos ( $R-COO^-H^+$ ). Las resinas de intercambio aniónico fuertes contienen como sitio activo grupos cuaternarios de amonio. Las resinas de intercambio aniónico débiles tienen como sitios activos aminas terciarias, ejemplos de resinas de intercambio aniónico son:



La cromatografía de exclusión es un método que se basa en la separación de acuerdo al tamaño de la molécula. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria posee poros de dimensiones diferentes, en donde la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Las moléculas grandes permanecen en la fase móvil y por tanto son eluidas primero. Las moléculas pequeñas son retenidas en los poros y son eluidas después.

Existen 2 métodos más en cromatografía líquida que resultan de la modificación de la CLL: la cromatografía en fase enlazada y la cromatografía de par-iónico. La cromatografía de fase enlazada utiliza una fase estacionaria orgánica que está químicamente enlazada, generalmente a hidrocarburos de cadena larga. La fase móvil comúnmente es polar, de este modo los solutos más polares son eluidos primero y los componentes no polares son eluidos después. La cromatografía de par-iónico también se conoce como cromatografía de jabón, se basa en la formación de pares iónicos entre activos con carga y agentes par-iónicos con carga opuesta. En general la cromatografía par-iónico se practica como fase reversa, el mecanismo de retención aquí aun no está bien delucidado, es una combinación entre la Cromatografía líquido-líquido y la de exclusión molecular, particularmente esta técnica puede ser llevada a cabo por cualquiera de estos modos de cromatografía: por mecanismos la fase estacionaria líquida o por una fase enlazada.

De estos mecanismos de separación se utilizará el más apropiado de acuerdo a las características del componente a analizar. En la tabla No. 1 se muestra una guía práctica para escoger el mecanismo de separación.

Ahora bien, de los diferentes mecanismos de separación se tienen factores importantes que describen esta separación, esto se hace con ayuda de un cromatograma, en donde se representa la separación gráfica de los componentes. Ver figura 5 .

FIGURA No. 5.- Un Cromatograma común.

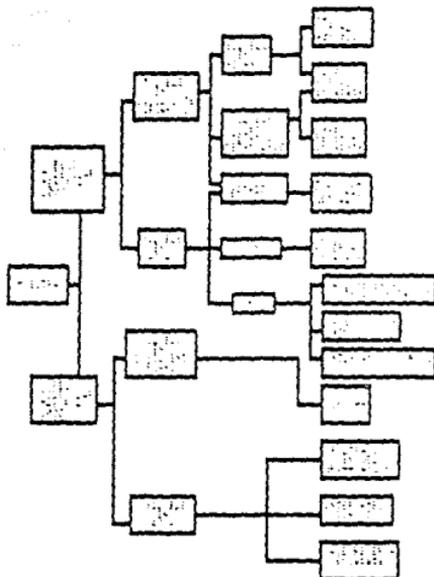
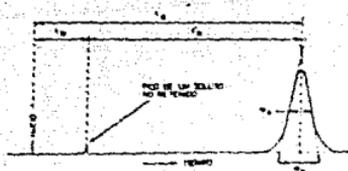


Fig. 1.- Clasificación de la cromatografía.

TABLA No. 1.- Guía para el tipo de cromatografía a utilizar.

Los factores que sirven para describir una separación se conocen como parámetros de retención.

#### VOLUMEN DE RETENCION (VR):

El volumen de retención es el volumen total de fase móvil requerido para que el componente se eluya al máximo.

#### TIEMPO DE RETENCION (tR):

El tiempo de retención es el tiempo necesario para alcanzar la máxima elución del compuesto.

Si el flujo (Fc) de la fase móvil es constante se tiene lo siguiente:

$$tR = VR/Fc$$

Estos 2 parámetros descritos ( VR y tR ) se deben corregir para saber exactamente el volumen o el tiempo invertido que se ocupa unicamente para la elución del compuesto:

$$t'R = tR - tM$$

$$V'R = VR - VM$$

Donde t'R y V'R son el tiempo y el volumen de retención corregidos. tM es el tiempo muerto que invierte la fase móvil para recorrer la columna, y VM es el volumen muerto de fase móvil para llenar la columna .

Cuando se inyecta el compuesto al sistema cromatográfico, al llevarse a cabo la elución, la banda de soluto eluido se va ensanchando, este proceso se debe al equilibrio entre 2 fases y la difusión logitudinal. En el caso ideal, se obtiene un perfil con una distribución normal, es decir una curva gaussiana.

#### FACTOR DE CAPACIDAD (K):

El factor de capacidad indica el tiempo que el compuesto es retenido por la columna y se define como:

$$K = t_R - t_M / t_M = t'_R / t_M$$

En la práctica se debe tener  $K$  en un rango de 1 a 10 para asegurar la separación del compuesto con las posibles impurezas del disolvente, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual al  $t_M$ . Si  $K$  es mayor de 10 se tienen problemas con el tiempo de análisis.

#### NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N):

El número de platos teóricos indica la eficiencia de la columna cromatográfica y un plato teórico ( $h$ ) se define como el número de etapas de partición (equilibrios) que le ocurren al compuesto durante el paso a la columna.  $N$  se define matemáticamente como:

$$N = a ( t_R / W )^2$$

Donde  $a$  es una constante que depende del método utilizado para determinar  $N$ . Ver figura 6.  $W$  es el ancho del pico cromatográfico que también depende del método utilizado.

$N$  depende de la longitud de la columna ( $L$ ) y tamaño de partícula en forma directa. A partir de aquí se obtiene el concepto de altura equivalente a un plato teórico que se define como:

$$h = L / N$$

Sin embargo existe mucha discrepancia al calcular N de la manera anterior, ya se esta suponiendo que el pico es simétrico. Otra manera de calcular N es descrita por James Martin. Este método involucra una comparación de la altura y el área del pico para así valorar de alguna manera la dispersión. La ecuación es la siguiente:

$$N = 2\pi(h_{max}tR/A)^2$$

donde:  $h_{max}$  = altura máxima del pico

A = área del pico

Hay que tener cuidado de que  $h_{max}$ ,  $tR$  y A sean expresadas en las unidades correspondientes.

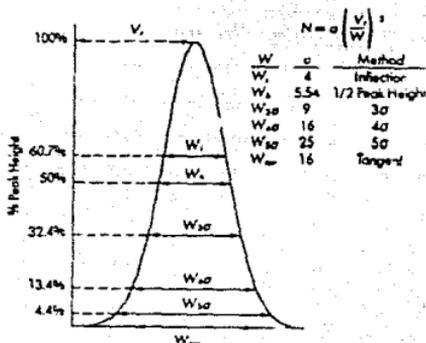


FIGURA No. 6.- Métodos para calcular la eficiencia de la columna.

Existen varios métodos para determinar el número de platos teóricos, el método más usado es el 5 $\sigma$ , debido a que tiene mayor sensibilidad, ya que toma en cuenta la asimetría de los picos cromatográficos, lo que implica que nos dará mayor información sobre la eficiencia de la columna.

### SEPARACION ( $\alpha$ ):

El factor de selectividad describe la posición relativa de dos picos adyacentes y se define como:

$$\alpha = t'R (B) / t'R (A)$$

Si  $\alpha = 1$  no habrá separación ya que los tiempos de retención serían idénticos.

### RESOLUCION ( $R_s$ ):

El factor de resolución es una medida de separación relativa de 2 picos. Se define la resolución como la distancia entre 2 bandas dividido por el promedio del ancho de los picos determinado desde la base de los picos.

$$R_s = \frac{tR(B) - tR(A)}{\frac{1}{2} (W_A + W_B)}$$

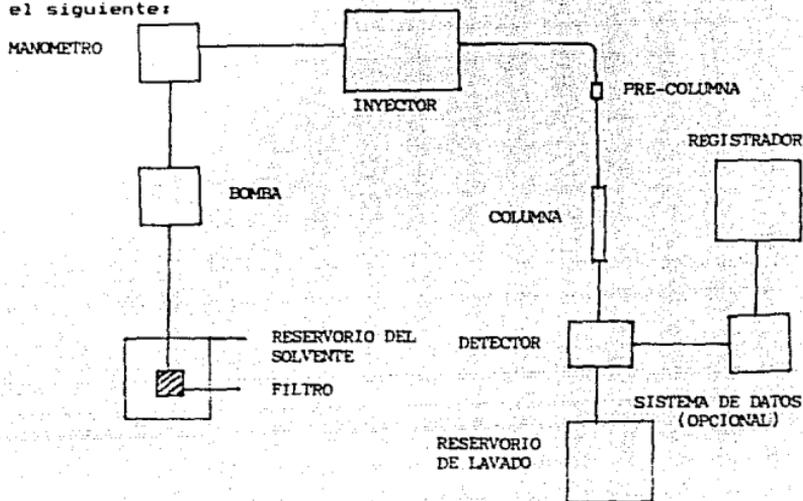
Si  $R_s = 1.5$  se tiene una resolución ideal, es decir una resolución hasta línea base. Si  $R_s = 1.0$  implica una resolución al 90%. Sin embargo la ecuación general para la resolución es:

$$R = \sqrt{N [(\alpha - 1) / \alpha] [k'_2 / (k'_2 + 1)]} / 4$$

En esta ecuación se observa que la resolución es función de la eficiencia de la columna, por otro lado la resolución es directamente dependiente de la selectividad y capacidad del sistema cromatográfico.

## INSTRUMENTACION:

Un esquema general de la instrumentación del sistema CLAR es el siguiente:



Idealmente los reservorios deben tener varios requerimientos:

- 1) Contener un volumen adecuado para análisis respectivos .
- 2) Contener un disolvente degasificado ya sea por calor, aplicando vacío o por sonicación.
- 3) Ser inerte con respecto al disolvente.

Frecuentemente se utilizan contenedores de vidrio o de acero inoxidable.

El disolvente es la fase móvil, su función es acarrear la muestra a través de la columna produciendo una distribución razonable (factor de capacidad) entre las fases. El disolvente debe de disolver a la muestra, debe tener una alta pureza, preferentemente calidad HPLC. Otros factores importantes que hay

que considerar: bajo costo, baja viscosidad, baja toxicidad y bajo punto de ebullición. Dependiendo del tipo de columna empleada se utilizan diferentes disolventes, como se muestra a continuación:

#### Disolventes comunes en CLAR

TIPO de CLAR	Disolventes
Fase Normal (silica gel,ciano,amino)	Hexano o iso-octano, Cloroformo, acetato de etilo,cloruro de metileno
Fase inversa	Agua,metanol,acetoni-trilo.
Intercambio iónico	Soluciones reguladoras usualmente 0.01 a 0.1 M (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).
Exclusión molecular	Agua (ocasionalmente en pequeñas cantidades de alcoholes)
Permeación en gel	Tolueno, cloroformo, triclorobenceno,IHF, piridina

#### SISTEMA DE BOMBEO.

Este sistema es uno de los componentes más importantes en CLAR. La bomba es muy importante para obtener alta resolución, alta velocidad de análisis y reproducibilidad en análisis cuantitativos.

Los requerimientos que debe tener una bomba son:

- 1) Flujo estable, para que el ruido hacia el detector sea mínimo.
- 2) Que proporcione un rango de flujo bajo (0.1 a 10 ml/min).
- 3) Entregue un volumen constante para facilitar el análisis

cuantitativo y cualitativo.

4) Tolerancia a altas presiones (6000 psi) y una fácil adaptabilidad para operación en gradiente.

Hay 2 tipos de sistema de bombeo. El primero es una bomba tipo pistón recíproco, en donde el pistón esta en contacto directo con el solvente. El segundo es una bomba que se opera por un tornillo de transmisión desplazando el solvente del reservorio a través de este, este sistema se utiliza particularmente en operaciones en gradiente en donde la velocidad de la jeringa se controla electrónicamente. El más común es la bomba tipo pistón recíproco.

#### SISTEMA DE INYECCION.

La inyección de la muestra a la columna presenta algo de problemas a causa de las altas presiones involucradas en CLAR. Hay 2 tipos de inyección: manual y automática: En ambos sistemas el volumen inyectado tiene que ser reproducible para obtener un correcto análisis cuantitativo.

Para la inyección manual se utilizan jeringas de 5 hasta 200 $\mu$ l (existen jeringas hasta 2.5ml o más pero son para cromatografía preparativa) con las que se carga el sistema de inyección para que después este tome el volumen y lo descargue a la columna. Para la inyección automática utiliza una serie de válvulas y pistones, en donde la muestra se coloca en pequeños viales para que después la jeringa tome el volumen requerido automáticamente de muestra y lo descargar a la columna.

#### COLUMNA.

La columna en el sistema cromatográfico es el corazón de CLAR, es un tubo de material inerte, de diámetro uniforme y

resistente a altas presiones. Contiene a la fase estacionaria en donde se llevan a cabo las separaciones de los componentes. Las columnas para CLAR varían principalmente por el tipo de separación deseada y por las características de los materiales de empaque. La columna más usada mide de largo de 10 a 30 cm, tienen un diámetro interno de 3 o 4 mm y el empaque de la columna es de diámetros pequeños (3 y 10µm). Las columnas que comercialmente se utilizan en CLAR son: sílica, alumina, octadecilsilano (C<sub>18</sub>), octasilano (C<sub>8</sub>), fenilo, dimetilsilano, diol, nitrilo, amino, ciano, entre otros. Los dos primeros tipos se utilizan en CLS y las demás se utilizan en cromatografía de partición.

#### DETECTOR:

El propósito del detector es el de medir la concentración del componente en la fase móvil. Este produce una señal electrónica proporcional a la concentración del componente. Los detectores más comunes son : espectrofotómetro UV/vis, índice de refracción diferencial (IR), detector de fluorescencia y detector electroquímico.

#### Fotómetro UV/VIS.

Este detector se muestra esquemáticamente en la figura 7.

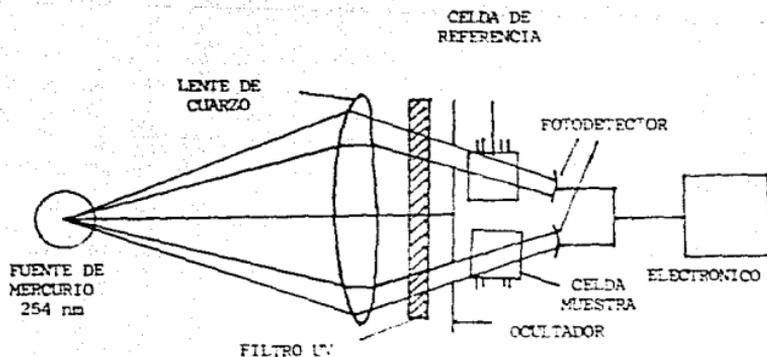


FIGURA No. 7.- Esquema de un fotómetro UV, 254 nm.

Este detector es de longitud de onda fija de doble haz, del lado izquierdo consta de una lámpara de mercurio que emite (esencialmente haz monocromático) una línea aguda de espectro con una fuerte línea a 253.7 nm (254). Un lente de cuarzo enfoca la radiación UV en las celdas de muestra y referencia. La celda de muestra contiene usualmente de 10 a 20  $\mu$ l. La celda de referencia usualmente es llenada con aire. Un filtro remueve las radiaciones no requeridas. La radiación pasa a través de las celdas de referencia y muestra llegando a los 2 fotodetectores. La producción de estos 2 fotodetectores pasa a través de amplificadores que producen una señal eléctrica para ser graficada.

Con este fotómetro se dispone de varias longitudes de onda, cada una con un filtro apropiado: 254, 280, 313, 365, 436 y 546 nm.

### Espectrofotómetro UV/VIS.

Este detector es el más comúnmente utilizado a la fecha en CLAR, ver figura 8. Es un detector de longitud de onda variable que permite la selección de una longitud de onda de 190 a 700 nm. La luz de origen se enfoca en la entrada de la apertura de un monocromador. Por lentes apropiados esta luz blanca se enfoca en la rejilla en donde la dispersa en varias longitudes de onda. Por la posición de esta rejilla se elige la longitud de onda que pasa a través de la celda de muestra y de referencia por medio de un haz de luz dividido. La señal del detector se obtiene comúnmente en absorbancias. Este detector permite incrementar la sensibilidad y/o selectividad de los componentes de interés.

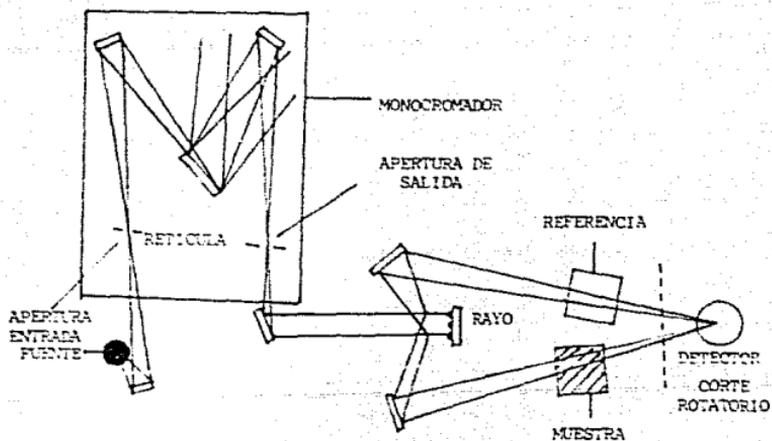


FIGURA No. 8.- Esquema de un detector espectrofotométrico para CLAR.

#### Detector de fotoiodos.

Este detector es una adición reciente a los espectrofotómetros UV/VIS, es un detector que se basa en el arreglo lineal de fotoiodos. Este instrumento permite ver los espectros rápidamente y además almacenarlos. Los beneficios que aporta son: determinar la pureza del pico y ver los espectros a diferentes tiempos de elución así como de leer de una sola vez a 6 diferentes longitudes de onda.

#### Detector fluorimétrico.

Los detectores fluorimétricos o de fluorescencia son altamente sensitivos y selectivos. La selectividad se basa en que ciertos compuestos emiten luz cuando son excitados con luz UV. Esto hace que los compuestos de interés sean distinguidos rápidamente de aquellos que no exhiban fluorescencia. La sensibilidad incrementa si la intensidad de fluorescencia del compuesto es mayor, esta puede llegar a detectar hasta 10 ng de muestra.

#### Detector de índice de refracción.

Este es un detector universal, es más costoso que el detector UV, requiere de un control de temperatura y control de flujo. La sensibilidad se limita a 1 µg de muestra.

#### Detector electroquímico.

Este detector se basa en que muchas moléculas orgánicas e inorgánicas incluyendo muchas drogas pueden ser electroquímicamente oxidadas o reducidas por un electrodo adecuado. Este detector tiene una alta sensibilidad (6 ng de muestra), pero es menos selectivo que un detector fluorimétrico.

**GRAFICADOR.**

Muestra la carta de registro que ayuda a la identificación de los picos, observando su forma y tamaño de estos.

**INTEGRADOR.**

Además de las funciones antes mencionadas del graficador, el integrador posee varios métodos para cuantificar y reportar los componentes presentes en el cromatograma utilizando las alturas y/o áreas de los picos.

## 2.2.2 ESPECTROFOTOMETRIA (1, 2 y 6).

La espectrofotometría estudia la interacción electromagnética con átomos o moléculas. Una onda electromagnética de determinada frecuencia es esencialmente una corriente eléctrica alterna con un efecto magnético asociado. Hay diferentes radiaciones electromagnéticas que dependen de las diferentes energías que se necesiten para que se presente. ( Ver figura 9 ).

ULTRAVIOLETA		Visible	INFRARROJO	
Excitación	Electrónica		Vibraciones Moleculares	
$\lambda 10^{-5}$ cm			$10^{-4}$ cm	$10^{-3}$ cm

INFRARROJO	MICRO ONDAS		RADIO FRECUENCIA		
	Rotación Molecular		Precesión Nuclear		
$\lambda 10^{-3}$ cm	$10^{-2}$ cm	$10^{-1}$ cm	1cm	10 cm	100 cm

FIGURA No.9.- Espectro electromagnético

Todas estas formas de radiación pueden describirse con 2 modelos: el modelo ondulatorio y el modelo corpuscular. El modelo ondulatorio caracteriza a la radiación como ondas viajando a la misma velocidad ( $3 \times 10^{10}$  cm/seg) en el vacío. Ver figura 10.

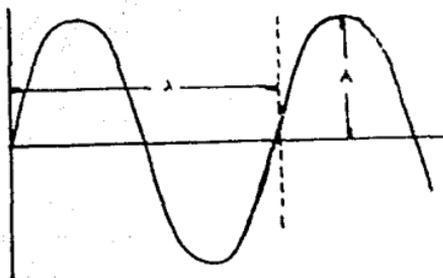


FIGURA No. 10.- Representación del modelo ondulatorio

El modelo corpuscular describe a la luz como paquetes discretos de energía. La energía contenida en la radiación queda descrita en la ecuación de Planck:

$$E = h \times \nu$$

$h$  = Constante de Planck. ( $6.63 \times 10^{-27}$  ergios\*seg)

$\nu = c/\lambda$  = Es la frecuencia de la radiación, la cual se describe por el número de ciclos por unidad de tiempo.

$c$  = Es la velocidad de la luz ( $3 \times 10^{10}$  cm/seg)

$\lambda$  = Es la longitud de onda; es la distancia entre dos valles o crestas.

Dentro de la espectroscopia se pueden tener dos tipos de espectros:

- 1) De emisión
- 2) De absorción

Se produce el de emisión cuando hay liberación de la energía absorbida al pasar del estado excitado al basal, este espectro se da como luz.

El espectro de absorción se produce por la liberación de energía y esta se obtiene como calor.

La energía absorbida por la materia se distribuye en:

Energía translacional

Energía rotacional

Energía vibracional

Energía electrónica

De manera general todos los átomos y moléculas pueden absorber energía, el tipo y cantidad de energía de radiación absorbida dependen de la estructura de la molécula, así como del número de moléculas que interaccionen con la radiación.

La longitud de onda máxima de una molécula, es la longitud de onda en la cual se presenta la máxima absorción. Esta longitud de onda puede presentar varios efectos:

Efecto batocromico: Es el desplazamiento de la longitud de onda máxima hacia mayores longitudes de onda, por efecto de disolventes.

Efecto hipsocromico: Es el desplazamiento de la longitud de onda máxima hacia menores longitudes de onda.

Efecto hiperocrómico: Es cuando la intensidad de la banda es más grande, es decir, aumenta la capacidad de absorción.

Efecto hipocrómico: Es cuando disminuye la intensidad de la banda, lo que implica que disminuye la capacidad de absorción.

Al grupo funcional químico responsable de la absorción se le conoce como cromóforo, este es un grupo insaturado de la molécula. Un grupo auxócrono es aquel que por sí mismo no produce absorción, pero puede incrementar el poder absorbente del cromóforo.

#### ANÁLISIS CUANTITATIVO. (1).

La emisión o absorción de la radiación por un sistema absorbente está dado por una longitud de onda monocromática y esta descrita por las leyes de absorptometría las cuales se relacionan con la intensidad de radiación incidente hacia el sistema absorbente ( $I_0$ ) y la intensidad transmitida ( $I$ ). La ley de Lambert abarca factores instrumentales, y estados en que esta dada la concentración ( $C$ ) de sistemas absorbentes homogéneos, la intensidad de transmitancia ( $I$ ) disminuye exponencialmente cuando incrementa la longitud de la celda ( $b$ ). La ley de Beer distribuye la concentración en una longitud de celda definida, la intensidad de transmitancia disminuye exponencialmente con el incremento de la concentración de sistemas absorbentes homogéneos.

La combinación de estas observaciones da la ley de Beer-Lambert

$$A = a \times b \times C$$

En donde A: Absorbancia

a: Absortividad

b: Longitud de la celda

C: Concentración de la muestra.

Las cantidades espectroscópicas que se miden son la transmitancia (T);

$$T = I/I_0$$

y la absorbancia (A);

$$A = \log(1/T)$$

La absorptividad o coeficiente de extinción es una constante de proporcionalidad que es independiente de la concentración, esta constante solo depende de la temperatura, estructura molecular, disolvente y la longitud de onda de radiación.

Para hacer una determinación cuantitativa lo primero que se debe de tener es la longitud de onda que sirva para hacer las mediciones, de preferencia donde se presente el máximo de absorción, esta longitud de onda debe ser una banda única, libre de interferencias. Después se hace una medición con solución de referencia en la longitud de onda seleccionada y se relaciona con la absorbancia de la muestra a determinar:

$A_c$  = absorbancia de la solución de referencia

$A_m$  = absorbancia de la muestra

$$A_c = a \times b \times C_c \quad \text{y} \quad A_m = a \times b \times C_m$$

$C_c$  y  $C_m$  son las concentraciones de la solución de referencia y la muestra respectivamente; por lo tanto;

$$C_m = \frac{C_c \times A_m}{A_c}$$

Esta relación es posible si A y C guardan una proporción directa. Ver figura 11.

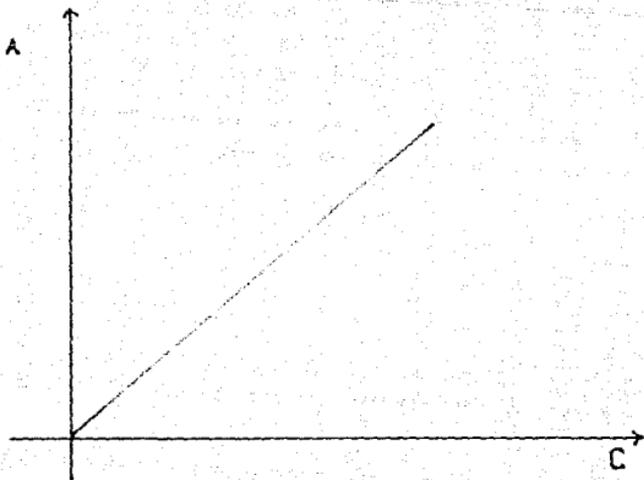
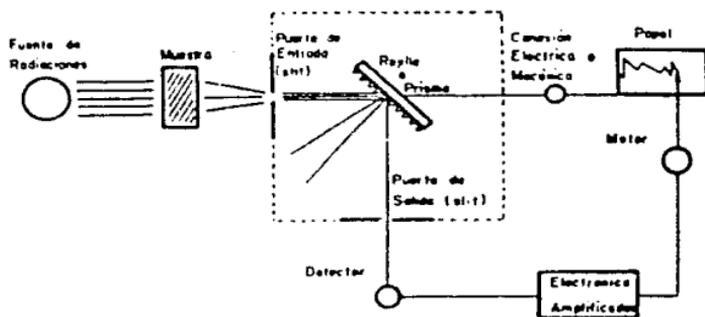


FIGURA NO. 11- Relación lineal simple entre la absorbancia (A) y la concentración (C) del compuesto de interés.

Se debe tener cuidado ya que la ley de Beer se cumple en un cierto intervalo de concentraciones, debido que se tienen desviaciones de linealidad por interacciones químicas principalmente, por puentes de hidrógeno, asociaciones intermoleculares, interacciones con el disolvente o reacciones químicas.

Se recomienda utilizar concentraciones de tal manera que la intensidad de la banda este entre 0.3 a 0.6 de absorbancia.(1).

## INSTRUMENTACION:



En el esquema se puede ver los componentes básicos de un espectrofotómetro, el cual es un aparato que se emplea en el estudio de la absorción o emisión de la radiación electromagnética.

### FUENTE DE LUZ.

La región visible utiliza una lámpara de tungsteno como fuente de radiación, en la región UV la fuente usual es una lámpara de descarga de hidrógeno. La región infra-roja utiliza una varilla de carburo de silicio calentada electrónicamente a  $1200^{\circ}\text{C}$ .

### SELECTOR DE FRECUENCIA.

Sirve para escoger la longitud de onda o frecuencia de la radiación.

### PORTAMUESTRA.

Esta sirve para contener la muestra la cual es transparente a la luz. Para la región visible se emplean portamuestras de vidrio, y para la región UV se utilizan de sílice o de cuarzo.

#### DETECTOR.

Emplean dispositivos electronicos y sensibilizadores los cuales son fototubos y tubos fotomultiplicadores para detectar la intensidad de la luz transmitida por la muestra.

#### REGISTRADOR.

Es la señal del detector que se alimenta con un circuito potenciométrico y puede graduarse para obtener una lectura de transmitancia o absorbancia.

### 2.2.3 VOLUMETRIA (1.5).

El análisis volumétrico es una técnica analítica sencilla y rápida para determinar la concentración del activo. Se basa solamente en medir el volumen de un líquido (valorante) que se gasta para titular a la sustancia de interés, es decir, el volumen necesario para llegar al punto de equivalencia.

El análisis volumétrico utiliza una solución valorada, con cantidades conocidas de los reactivos.

La solución valorada se prepara con una cantidad conocida del reactivo sólido puro, se disuelve y se lleva hasta un volumen conocido, o también ya existen en el mercado soluciones con concentración conocida.

Por conveniencia las titulaciones se dividen en cuatro clases de acuerdo al tipo de reacción:

- Acido-base
- Oxido reducción
- Precipitación
- Formación de complejos

Para detectar el punto de equivalencia se cuenta con indicadores adecuados y métodos potenciométricos que hacen posible así, que el análisis volumétrico sea muy sensible.

De aquí en adelante se enfocará más sobre titulaciones ácido-base en disolventes no acuosos ya que es la técnica que se utiliza en este trabajo.

Las titulaciones A-B en medio no acuoso se llevan a cabo muy frecuentemente en la industria química, ya que muchos ácidos y bases orgánicas son insolubles en agua o son muy débiles en medio acuoso. Un factor importante en titulaciones en medio no acuoso es el disolvente empleado, el carácter ácido y básico del disolvente

establece límites sobre la fuerza de los compuestos que se pueden titular con él.

Para la elección del disolvente se debe tener en cuenta lo siguiente:

- 1) Caracter ácido o básico intrínseco
- 2) Constante de autoprotólisis
- 3) Constante dieléctrica.

Un disolvente que contiene átomos de hidrógeno con carácter ácido puede representarse como SH. En principio puede transferir protones entre sus moléculas:



La concentración o producto de actividad,  $(\text{SH}_2^+)(\text{S}^-)$ , es llamada constante de autoprotólisis,  $K_s$ ; esta constante establece límites sobre intervalos de fuerza ácida o básica que puede existir en el disolvente.

Los disolventes generalmente son divididos dentro de 4 clases las cuales se basan en sus propiedades ácido-base.

Los disolventes protogénicos generan un protón solvatado en la disociación (por ejemplo, ácido acético y ácido sulfúrico). Los disolventes protofílicos son capaces de aceptar un protón, y pueden ser dissociables o no dissociables (por ejemplo, piridina, anhídrido acético y éter). Los disolventes anfipróticos pueden aceptar o donar un protón, son ejemplos el agua y alcoholes. Los disolventes apróticos no aceptan ni dan protones (por ejemplo, el cloroformo y los hidrocarburos).

Las propiedades dieléctricas determinan en gran medida la extensión de la disociación iónica. Para disolventes con alta constante dieléctrica indican que la disociación es alta. En disolventes con constante dieléctrica baja o intermedia la

disociación es muy pequeña. Ver figura 12 .

Disolventes	D	Disolventes	D
Ciclohexano	2,02	Acetona	20,7
Dioxano	2,21	Etanol	24,3
Benceno	2,27	Metanol	32,6
Eter etílico	4,34	Acetonitrilo	37,5
Cloroformo	4,81	Dimetilsulfóxido	48,7
Acido acético	6,15	Agua	78,5
Alcohol <i>t</i> -butílico	11,5	Acido sulfúrico	100

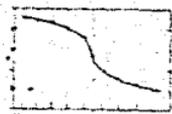
\* A temperatura ambiente.

FIGURA No. 12- Constantes dieléctricas de algunos disolventes más comúnmente utilizados.

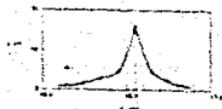
Una de las titulaciones que han sido ampliamente utilizadas son las que se llevan a cabo en ácido acético glacial. con este disolvente se pueden titular principalmente sales y bases débiles, así como ácidos y sales de amonio.

Por otra parte, para determinar el punto de equivalencia de la titulación en disolventes no acuosos, como se mencionó anteriormente, se pueden usar indicadores o detectarlo por un método potenciométrico. Este último es una de las aplicaciones de mayor utilidad dentro de una valoración potenciométrica. La localización de este punto puede realizarse gráfica o analíticamente, donde se encontrará en un cambio más o menos brusco al representar el potencial (o el pH) en función del volumen del

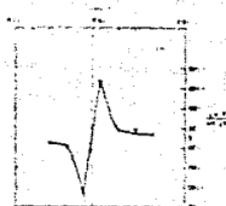
valorante (inflexión de la curva), este punto también coincide con el máximo de la primera derivada, o con la segunda derivada cuando esta vale cero en el volumen. Ver figura 13.



(a)



(b)



(c)

FIGURA NO. 13- a) valoración en datos crudos. b) Primera derivada de la curva de valoración. c) Segunda derivada de la curva de valoración.

En la tabla No. 3 se muestra la forma de determinar la primera y segunda derivada para que al graficar determinar el punto de equivalencia.

V	E	$\Delta E/\Delta V$	$\bar{V}$	$\Delta^2 E/\Delta V^2$	$\bar{V}$
V <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	$A_1 = \frac{E_2 - E_1}{V_2 - V_1}$	$B_1 = \frac{V_1 + V_2}{2}$	$C_1 = \frac{A_2 - A_1}{B_2 - B_1}$	$D_1 = \frac{B_2 + B_1}{2}$
V <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	$A_2 = \frac{E_3 - E_2}{V_3 - V_2}$	$B_2 = \frac{V_2 + V_3}{2}$	$C_2 = \frac{A_3 - A_2}{B_3 - B_2}$	$D_2 = \frac{B_3 + B_2}{2}$
V <sub>3</sub>	E <sub>3</sub>	$A_3 = \frac{E_4 - E_3}{V_4 - V_3}$	$B_3 = \frac{V_3 + V_4}{2}$	$C_3 = \frac{A_4 - A_3}{B_4 - B_3}$	$D_3 = \frac{B_4 + B_3}{2}$
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.

TABLA NO. 3.- Cálculos para la obtención de la primera y segunda derivada.

### **3. OBJETIVOS**

1- Desarrollar y validar un método analítico volumétrico para la cuantificación de diclofenac dietilamonio materia prima.

2- Desarrollar y validar un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de diclofenac dietilamonio en crema producto en proceso y/o producto terminado.

3- Desarrollar y validar un método analítico específico y selectivo por CLAR para determinar la estabilidad del producto.

4- Dar apoyo al departamento de Control de Calidad con los métodos analíticos desarrollados.

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 4.1 REACTIVOS, DISOLVENTES Y ESTANDARES.

	MARCA
- Fosfato de potasio monobásico (cristales)	Baker
- Hidróxido de sodio (lentejas)	Merck
- Ácido fosfórico concentrado para análisis	Merck
- Ácido acético glacial	Baker
- Ácido perclórico 0.1 N	Merck
- Agua HPLC	
- Acetonitrilo grado HPLC	Omnisolv
- Metanol grado RA	Merck
- Diclofenac dietilamonio, lote: 01(P4508)	AMPHAR BV
- Naproxen, lote: NX-86109	PROQUIFIN OPOTERICOS
- Formulación placebo, lote: DB9-0079	CAFET, S.A.
- Formulación crema, lote: DB9-0078	CAFET, S.A.

#### 4.2 EQUIPO Y MATERIAL.

	MARCA
- Baño ultrasonido	Cole-Parmer
- Pipetas automáticas	Eppendorf
- Baño con control de temperatura	Polytherm
- Equipo de filtración	Millipore
- Balanza analítica	Mettler
- Agitador magnético	ThermoLyne
- Equipo cromatográfico:	
- Bomba modelo 510	Waters
- Inyector automático Wisp 710 B	Waters
- Detector de longitud de onda variable modelo 484	Waters
- Columna Lichrospher 100 RP18 de 15 cm de longitud	Merck
- Integrador modelo 745	Waters
- Espectrofotómetro modelo DU-37	Beckman
- Potenciómetro modelo 45	Beckman
- Electrodo de combinación rellenable con medio celda de plata-cloruro de plata.	Beckman

### 4.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA CADA UNO DE LOS METODOS ANALITICOS UTILIZADOS.

#### 4.3.1 METODO POR CLAR

Preparación de soluciones:

Solución patrón concentrada: Contiene  $\cong$  5 mg/ml en metanol, equivalente a diclofenac sódico.

Solución de referencia interna: Contiene  $\cong$  4.25 mg/ml en metanol, de naproxén.

Tratamiento de Muestras:

Tomar 0.5 g de muestra en un vaso de precipitados de 100ml, adicionar 2 ml de la solución referencia interna y 50 ml de metanol. Calentar en baño maria durante 20 minutos a 50°C. se deja enfriar a temperatura ambiente. Transferir cuantitativamente a un matraz volumetrico de 100 ml, llevar al volumen con metanol, filtrar, desechar los primeros ml de filtrado e inyectar 20  $\mu$ l al sistema cromatográfico.

Para la solución de referencia, tomar 1 ml de la solución patrón concentrada y tratar la muestra de la misma manera (50mcg/ml corresponden al 100% que se utiliza en el método analítico).

El porcentaje de diclofenac dietilamonio en crema se determina partir de las áreas relativas entre la muestra y la solución de referencia, reportándose el porcentaje como diclofenac sódico.

#### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO:

-Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico, 0.01 M, pH = 3.5 ; Acetonitrilo ( 55 : 45 ).

- Flujo: 1.5 ml/min.
- Presión: 1500 psi
- Detección: 280 nm
- Volumen de inyección: 20 µl
- Atenuación: 128
- Velocidad de la carta: 0.25 cm/seg

#### VALIDACION DEL METODO.

##### Especificidad:

Para determinar los posibles productos de degradación que interfirieran con el método analítico, se sometieron: placebo, formulación (crema de diclofenac dietilamonio al 1 %), activo y placebo más principio activo fresco a las siguientes condiciones de degradación:

VARIABLE	CONDICION	TIEMPO
HCl (conc.) pH = 1-2	Reflujo	5min.
NaOH (conc.) pH = 11-12	Reflujo	30min.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) 0.5 ml	Reflujo	30min.

#### Linealidad del sistema:

Analizar por triplicado muestras de diclofenac dietilamonio a 0, 10, 25, 40, 50, 60 y 75 mcg/ml en metanol equivalente a diclofenac sodico a partir de la solución patrón concentrada.

#### Linealidad del método:

Analizar por sextuplicado muestras de placebos cargados al 0, 60, 80, 90, 100, 120, y 150 % a partir de la solución patrón concentrada.

#### Exactitud :

Tomar los resultados obtenidos en la linealidad del método pero expresados en porcentaje recuperado.

#### Reproducibilidad:

Analizar la formulación crema por 2 analistas en días diferentes por triplicado a una concentración de 50 mcg/ml de diclofenac sodico.

#### Tolerancia:

Modificar a la fase móvil: el pH de la solución reguladora, fuerza iónica y proporción de modificador orgánico de las condiciones normales de operación:

-pH: se modificó a 2 y 4.

-Fuerza iónica: Se modificó a 0.001 y 0.1 M.

-Modificador orgánico: se modificó a 55% y 35%.

#### 4.3.2 METODO ESPECTROFOTOMETRICO

##### Preparación de soluciones:

Solución patrón concentrada: Contiene una concentración de  $\cong$  5 mg/ml en metanol equivalente de diclofenac sodico.

#### Tratamiento de muestras:

Pesar 0.5 g de muestra en un vaso de precipitados de 100 ml ( si se trata de placebo cargado, adicionar la alicuota correspondiente de la solución patrón concentrada). Adicionar 50 ml de metanol y calentar en baño maría durante 20 minutos a 50°C, dejar enfriar a temperatura ambiente. Transvasar esta solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar al volumen con metanol, filtrar, desechar los primeros ml del filtrado, se toma una alicuota de 5 ml depositarla en un matraz de 25 ml y llevar al volumen con metanol. Esta última concentración corresponde al 100 %. Leer esta solución a 281 nm, utilizando metanol como blanco.

El porcentaje de diclofenac dietilamonio en crema se determina a partir de la relación de absorbancias entre la muestra y la solución de referencia, reportándose como diclofenac sódico.

#### VALIDACION DEL METODO.

##### Linealidad del sistema:

A partir de la solución patrón concentrada preparar soluciones de diclofenac dietilamonio con 0, 2, 5, 8, 10, 12 y 15 mcg/ml en metanol equivalentes a diclofenac sódico.

##### Linealidad del método:

Analizar por sextuplicado muestras de placebos cargados al 0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 y 7.5 mcg/ml en metanol equivalente a diclofenac sódico.

**Exactitud:**

Tomar los resultados obtenidos en linealidad pero expresados en porcentaje recuperado.

**Reproducibilidad:**

Analizar la formulación crema por 2 analistas en días diferentes, utilizando una concentración equivalente al 100 % .

**4.3.3 METODO VOLUMETRICO.**

**Tratamiento de muestras:**

Pesar 0.5g de diclofenac dietilamonio en un vaso de precipitados de 100 ml, disolver en 50ml de ácido acético glacial agitando durante 5 minutos. Esta cantidad corresponde al 100 %. Después titular con ácido perclórico 0.1N.

Determinar el punto de equivalencia potenciométricamente, empleando el método de la segunda derivada. Cada ml gastado de ácido perclórico 0.1N en la valoración corresponden a 36.725 mg de diclofenac dietilamonio. El porcentaje de diclofenac dietilamonio no se reporta referido a diclofenac sódico, se reporta como como diclofenac dietilamonio.

Nota: Como se trata de materia prima en este método las determinaciones son absolutas.

**VALIDACION DEL METODO.**

**Linealidad del Metodo:**

Analizar por sextuplicado muestras al 80, 90, 100, 120 y 150% de diclofenac dietilamonio.

**Exactitud:**

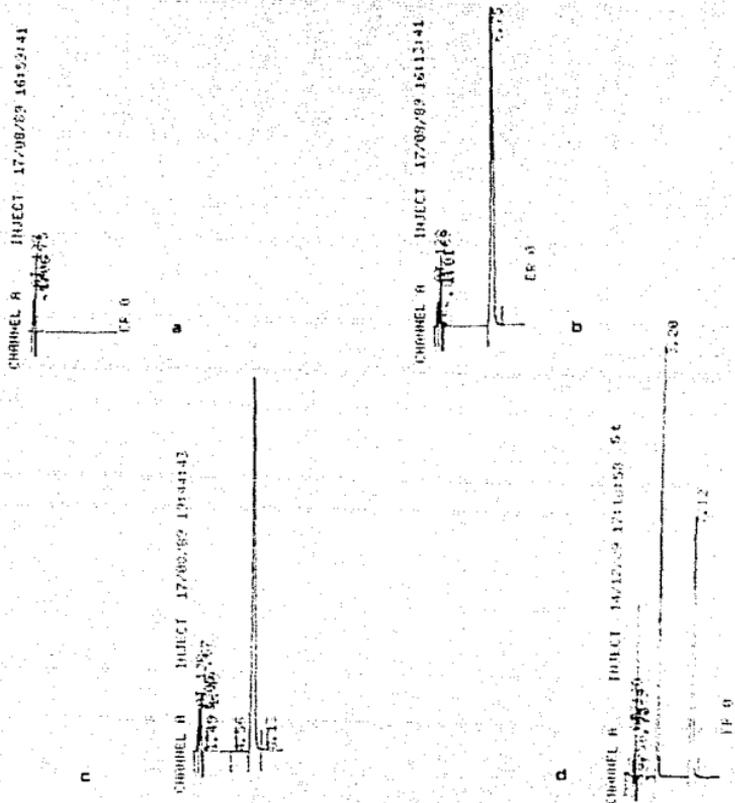
Tomar los todos resultados obtenidos en linealidad del método pero expresados en porciento recuperado.

**Reproducibilidad:**

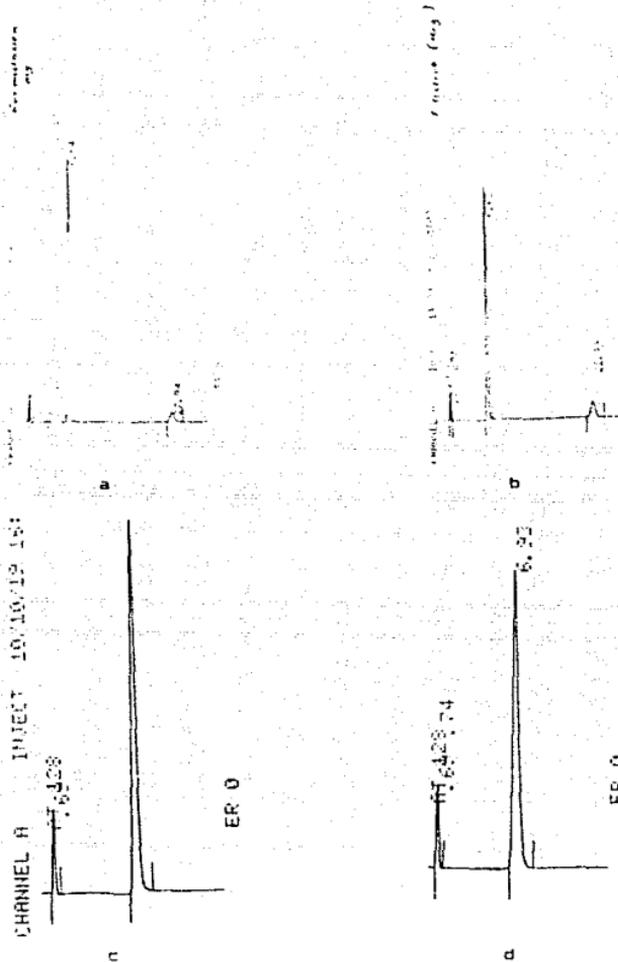
Analizar por triplicado diclofenac dietilamonio por 2 analistas en días diferentes, utilizándose una concentración al 100 %.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

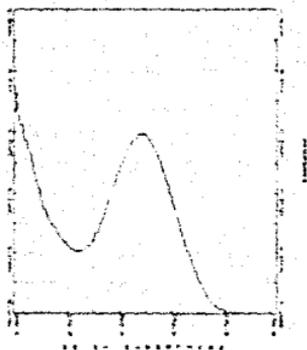
5.1 CROMATOGRAMAS, ESPECTROS Y GRAFICAS



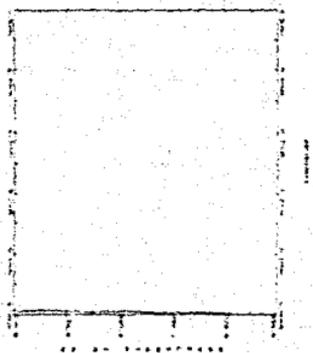
CROMATOGRAMA NO. 1.- Muestras recién preparadas; a) Placebo b) Formulación crema. c) Principio activo. d) Principio activo + estándar interno.



CROMATOGRAMA No 2.- a) Formulación crema sometida a degradación ácida. b) Principio activo sometido a degradación ácida. c) Formulación crema sometida a degradación básica. d) Principio activo sometido a degradación básica.

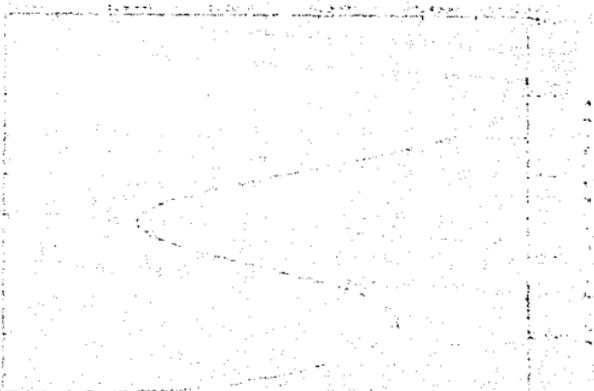


a

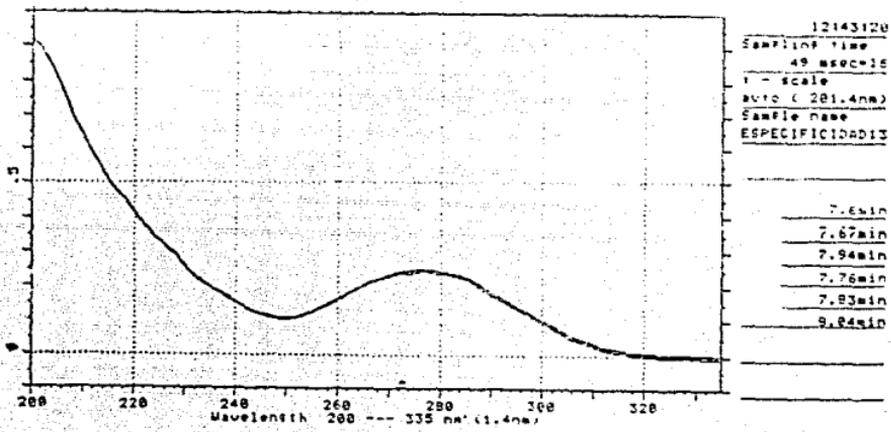
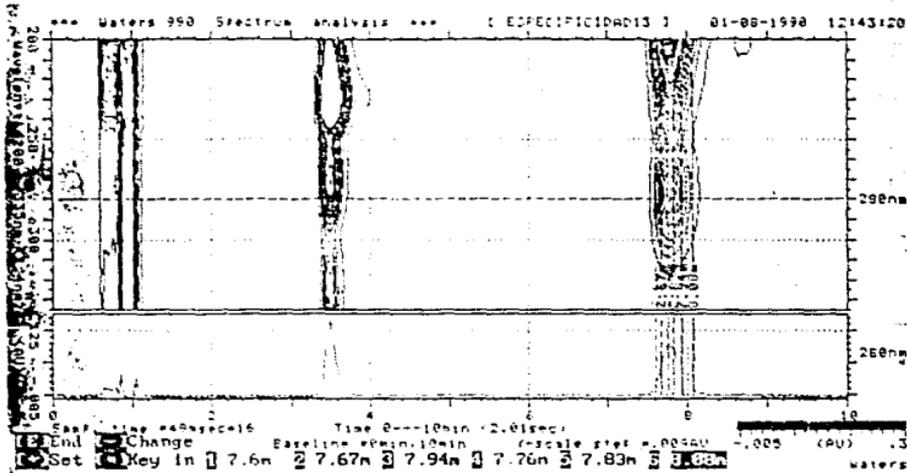


b

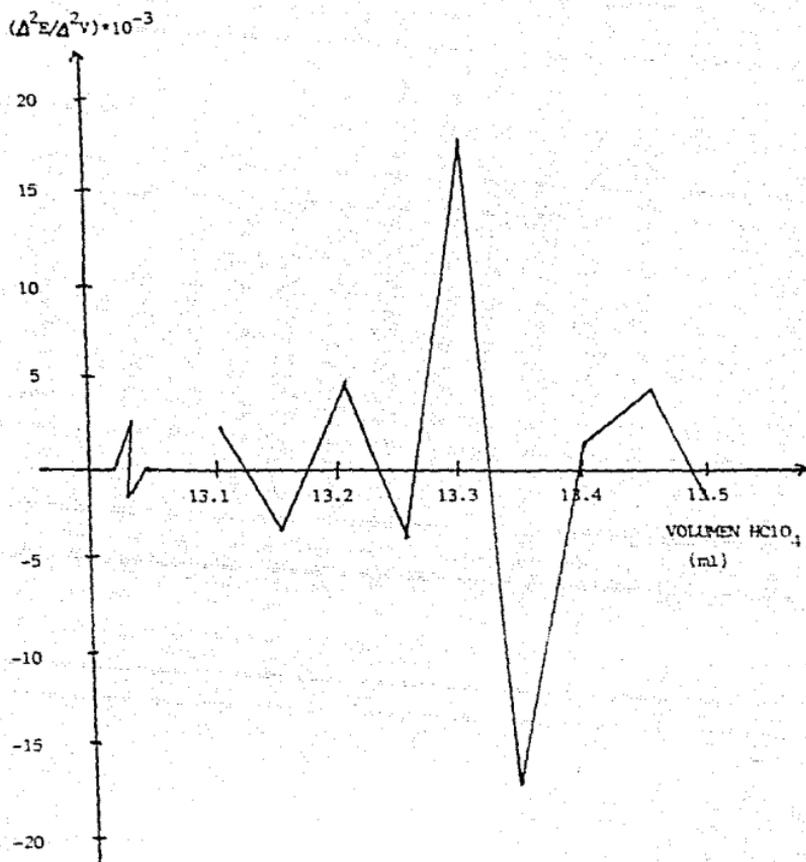
ESPECTRO NO. 1.- Espectro de absorción de diclofenac dietilamonio en (a) formulación crema y (b) placebo.



ESPECTRO NO. 2.- Espectro de absorción de la solución de referencia.



ESPECTRO NO. 3.- a) Analisis espectral de diclofenac dietil amonio en formulacion crema sometido a degradacion acida. b) Analisis espectral a diferentes tiempos de elucion.



GRAFICA NO. 1- Valoración potenciométrica del diclofenac dietilamonio, usando el método de la segunda derivada para determinar el punto de equivalencia.

## 5.2 RESULTADOS DE VALIDACION PARA CADA UNO DE LOS METODOS ANALITICOS EMPLEADOS.

### 5.2.1 METODO POR CLAR.

Especificidad del método analítico.

Para determinar la especificidad del método analítico se analizaron muestras de diclofenac d i etilamonio, activo, la formulación crema, formulación placebo y formulación placebo mas principio activo fresco a las siguientes condiciones de degradación:

PRODUCTO	CONDICIONES	TIEMPO
-Activo	HCl a reflujo	5min.
	NH <sub>4</sub> OH a reflujo	30min.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a reflujo	30min.
-Formulación crema	HCl a reflujo	5min.
	NH <sub>4</sub> OH a reflujo	30min.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a reflujo	30min.
-Formulación placebo	HCl a reflujo	5min.
	NH <sub>4</sub> OH a reflujo	30min.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a reflujo	30min.
-Formulación placebo + Principio activo fresco	HCl a reflujo	5min.
	NH <sub>4</sub> OH a reflujo	30min.
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a reflujo	30min.

El analisis se llevó a cabo a cuatro diferentes longitudes de onda: 254, 280, 290 y 270 nm. Los cromatogramas se muestran en la sección 5.1 ( pag. 69 ).

### PORCENTAJE DE RECOBROS

a 280 nm

Condición	HCl (conc.) pH=1-2	NaOH (Conc.) pH=10-11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% 0.5ml
Formulación de referencia	100.95	103.98	99.89
Formulación crema degradada	89.29	97.90	99.08
Formulación placebo degradado + principio activo fresco	100.62	99.21	97.08
Principio activo degradado	79.68	98.96	99.32

El diclofenac dietilamonio aparece en el cromatograma aproximadamente a los 7 minutos, ver sección 5.1.( Cromatograma No. 1).

Al observar los cromatogramas (cromatograma No.2) se tienen productos de degradación en medio ácido y básico. sin embargo el método es capaz de separarlos del compuesto de interés. En medio oxidativo no se observan productos de degradación. Con respecto a las relaciones de áreas semejantes. lo que asegura que el pico de diclofenac dietilamonio solo le corresponde a él.

Para estar aun más seguros de la especificidad del método las muestras se analizaron por CLAR usando detección de arreglo de todos en donde se leyeron a 6 diferentes longitudes de onda y se obtuvieron sus espectros a diferentes tiempos de elucion. Ver espectro No. 3.

Linealidad del sistema:

Se prepararon 7 niveles de concentración, incluyendo el 0, por triplicado. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

NIVEL DE CONCENTRACION	PROPIEDAD MEDIDA
MCG/ML	AREA
0	0
	0
	0
10	584776
	578927
	576233
25	1465713
	1455595
	1461149
40	2328703
	2340209
	2330521
50	2914659
	2921225
	2911107
60	3512861
	3519042
	3510402
75	4385290
	4419524
	4386181

n = 21  
 m = 58607.084  
 b = -5305.23572

r = 0.999982  
 r<sup>2</sup> = 0.99996

$$y = 58607.084(x) + (-5305.23572)$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

-12892.49 a 2282.489

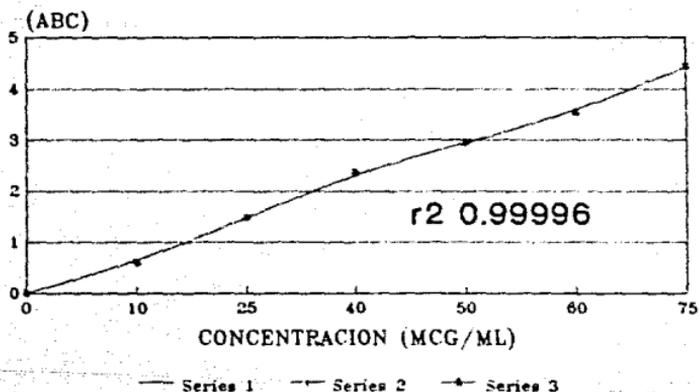
I.R. =  $-2.44 \times 10^{-6}$

E.S.R. =  $4.049 \times 10^{-3}$

La ordenada de la regresión lineal de MCG/ML y AREA pasa por el origen. Además existe una relación altamente significativa en donde el modelo lineal representa de manera correcta la relación entre AREA con MCG/ML.

En la gráfica # 2 se observa la curva de linealidad del sistema.

## LINEALIDAD DEL SISTEMA (CLAR) DICLOFENAC DIETILAMONIO



GRAFICA No. 2

Linealidad del método y exactitud.

Para linealidad del método se prepararon 7 niveles de concentración por sextuplicado obteniéndose los siguientes resultados:

CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	PORCENTAJE
MG	MG	RECUPERADO
0	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
3	3.01	100.33
	3.01	100.33
	3.01	100.33
	2.98	99.33
	2.97	99.00
	2.99	99.67
4	4.03	100.75
	4.00	100.00
	4.01	100.25
	3.97	99.25
	3.98	99.50
	3.98	99.50
4.5	4.54	100.89
	4.56	101.33
	4.50	100.00
	4.47	99.33
	4.49	99.78
	4.48	99.50
5	5.04	100.80
	4.99	99.80
	4.98	99.60
	4.94	98.80
	4.98	99.60
	4.99	99.80
6	6.05	100.83
	6.06	101.00
	5.96	99.33
	6.26	104.33
	5.99	99.83
	6.03	100.50
7.5	7.52	100.27
	7.48	99.73
	7.65	102.00
	7.42	98.93
	7.52	100.27
	7.52	100.24

n = 42  
 m = 1.0045  
 b = -0.011

r = 0.99969  
 r<sup>2</sup> = 0.99940

$$y = 1.0045(x) + (-0.011)$$

Intervalo de confianza para pendiente:

0.9969 a 1.0122

Intervalo de confianza para intercepto:

-0.0479 a 0.0258

El método por lo tanto carece de error sistemático constante y consistente.

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	media de cuadrados	F
Regresión	1	205.4157	205.4157	70452.94
Error de regresión	40	0.1166	0.0029	P(F <sub>cal</sub> ) = 4.71 × 10 <sup>-12</sup>
Falta de ajuste	5	0.0166	0.0033	1.1624
Error Puro	35	0.1	0.0029	P(F <sub>cal</sub> ) = 0.3546

Existe una relación altamente significativa de cantidad adicionada y cantidad recuperada. (Ver grafica No. 3). El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la cantidad recuperada y cantidad adicionada.

-Media aritmetica del porcentaje recuperado = 100.1167

-Desviación estándar = 1.0076

-Coeficiente de variación = 1.0064

-Intervalo de confianza para la media:

99.7758 a 100.4576

El método analítico cumple con los criterios de exactitud.

Reproducibilidad:

Se llevó a cabo por 2 analistas en 2 días diferentes trabajando por triplicado cada muestra. Los resultados se muestran a continuación:

A N A L I S T A

	1	2
DIA 1	100.73	100.35
	99.21	101.10
	101.28	98.90
DIA 2	99.10	100.22
	100.44	99.89
	99.48	100.20

Tabla de analisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Analista	1	0.0391	0.03991	0.0962 P{F <sub>cal</sub> >F}= 0.8247
Día/Analista	2	0.8125	0.4063	0.5586 P{F <sub>cal</sub> >F}=
Error	8	5.8184	0.7273	0.5965

El analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto en los días para un analista en la valoración.

Coefficiente de variación total = 0.7778

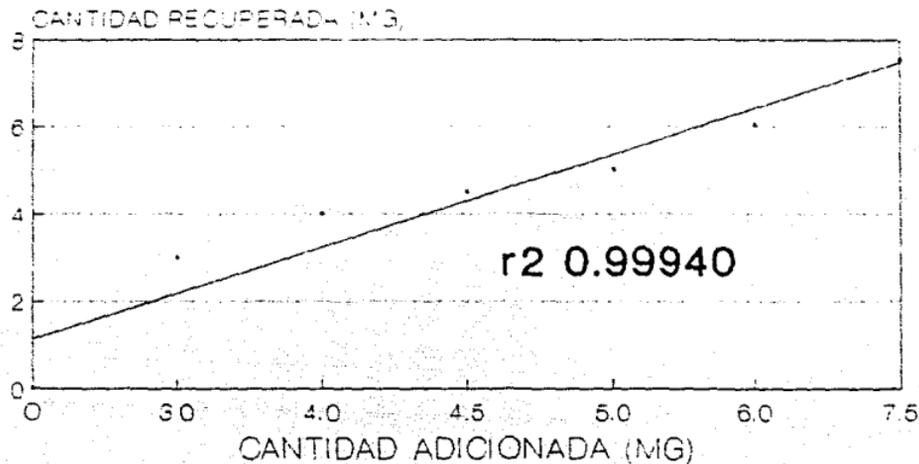
Tolerancia del sistema:

Al variar sobre la fase móvil el pH, fuerza iónica y proporción de modificador orgánico, se analizaron los siguientes parámetros que se muestran a continuación en la siguiente tabla;

CONDICIONES	NAPROXEN		DICLOFENAC DIETILAMONIO
	PLATOS TEORICOS N	RESOLUCION R	PLATOS TEORICOS N
pH = 2.5	2569	5.47	3666
pH = 4.0	2184	4.63	3519
0.1 M	2248	5.42	3529
0.001 M	2424	5.37	3691
Cosolvente:			
35 %	4042	-	-
55 %	1647	3.03	2261
Condiciones			
Normales	2444	5.20	3020

Como podemos observar el sistema presenta tolerancia hacia la fuerza iónica y el pH, y no al porcentaje de modificador orgánico, por lo que debemos de tener cuidado con este. A pesar de que la última condición no presenta tolerancia, existe reproducibilidad entre los demás resultados con respecto a las condiciones normales de operación.

# LINEALIDAD DEL METODO (CLAR) DICLOFENAC DIETILAMONIO



— Series 1

GRAFICA No. 3

### 5.2.2 METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Linealidad del sistema:

Se prepararon 7 niveles de concentracion incluyendo el 0 por triplicado, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

NIVEL DE CONCENTRACION MCG/ML	PROPIEDAD MEDIDA ABSORBANCIA
0	0 0 0
2	0.091 0.092 0.089
5	0.223 0.220 0.219
8	0.350 0.351 0.349
10	0.434 0.438 0.436
12	0.521 0.527 0.525
15	0.656 0.659 0.656

n = 21  
a = 0.04362  
b =  $1.5 \times 10^{-3}$

r = 0.99995  
r² = 0.99992

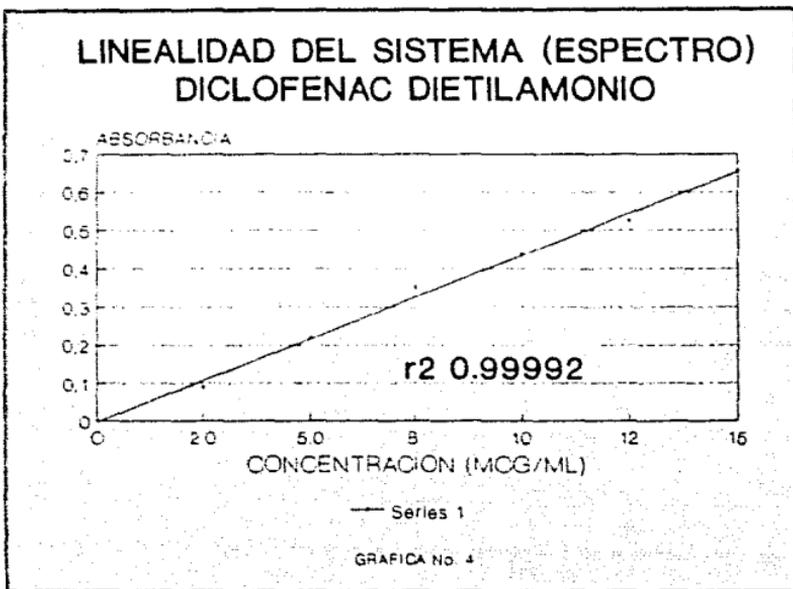
$$y = 0.04362(x) + 1.5 \times 10^{-3}$$

Intervalo de confianza para intercepto:

-0.0002 a 0.0032

I.P. =  $4.42 \times 10^{-3}$   
E.S.R. =  $6.14 \times 10^{-3}$

La ordenada de la regresión lineal simple de MCG/ML y absorbancia pasa por el origen. Además existe una relación altamente significativa en donde el modelo representa de manera correcta dicha relación de regresión. Ver gráfica 4.



Linealidad del método y exactitud.

Para la linealidad del método espectrofotométrico se prepararon 7 niveles de concentración por sextuplicado. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	PORCIENTO
MCG	MCG	RECUPERADO
0	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
	0	0
3	3.03	101.00
	3.03	101.00
	3.05	101.67
	2.89	96.33
	2.96	98.67
	2.99	99.67
4	3.98	99.50
	4.04	101.00
	4.04	101.00
	4.07	101.75
	4.02	100.50
	4.03	100.75
4.5	4.52	100.44
	4.51	100.22
	4.52	100.44
	4.55	101.11
	4.55	101.11
	4.56	101.33
5	5.01	100.20
	5.03	100.60
	5.00	100.00
	5.04	100.80
	5.06	101.20
	4.91	98.20
6	6.01	100.17
	6.05	100.83
	6.03	100.50
	6.02	100.33
	6.02	100.33
	6.03	100.50

CONTINUA...

CANTIDAD ADICIONADA MCG	CANTIDAD RECLUPERADA MCG	PORCIENTO RECUPERADO
7.5	7.49	99.87
	7.47	99.60
	7.51	100.13
	7.71	102.80
	7.64	101.87
	7.68	102.40

n = 42  
m = 1.0098  
b = -0.01760

r = 0.99974  
r<sup>2</sup> = 0.99948

$$y = 1.0098(x) + (-0.01760)$$

Intervalo de confianza para pendiente:

1.0023 a 1.0171

Intervalo de confianza para intercepto:

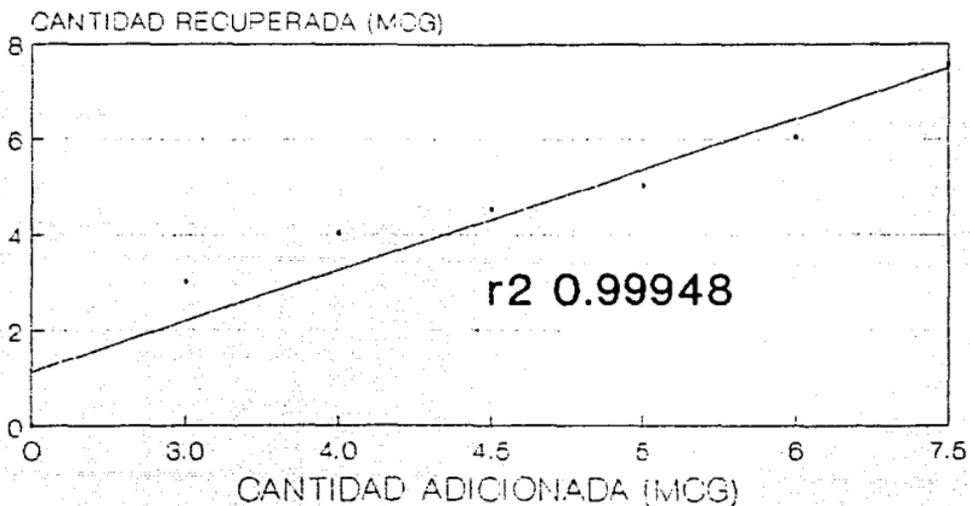
-0.0522 a 0.019

Como se puede ver el intervalo de confianza para la pendiente no pasa por 1, sin embargo el intervalo de aceptacion es de 0.98 a 1.2 por lo que el método carece de error sistemático constante y consistente.

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	207.5409	207.5409	76379.71
Error de regresión	40	0.1085	0.0027	F <sub>tab</sub> =4.08
Falta de ajuste	5	0.0139	0.0028	1.0278
				F <sub>tab</sub> =3.61
Error puro	35	0.0946	0.0027	

# LINEALIDAD DEL METODO (ESPECTRO) DICLOFENAC DIETILAMONIO



— Series 1

GRAFICA No. 5

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada (Ver grafica No. 5). El modelo lineal simple representa de manera correcta la relación entre la cantidad adicionada y recuperada.

Media aritmética del porcentaje recuperado = 100.495

Desviación estándar = 1.1533

Coefficiente de variación = 1.1476

Intervalo de confianza para la media:

100.1316 a 100.8564

Aunque el intervalo de confianza no pasa por cero el rango de aceptación lo incluye, por lo que el método es exacto.

Reproducibilidad:

Se llevó a cabo por 2 analistas en 2 días diferentes, trabajando por triplicado cada muestra. Los resultados se muestran a continuación:

		ANALISTA	
		1	2
DIA 1		103.79	102.97
		102.10	102.09
		101.37	103.41
DIA 2		102.56	98.93
		102.99	102.47
		101.70	102.27

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Analista	1	0.4766	0.4766	0.2485 <small>PIFca: P=0. 6064</small>
Día /analista	2	3.8359	1.9180	1.2027 <small>PIFca: P=0. 3504</small>
Error	8	12.7578	1.5947	

El analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto de los días para un analista en la valoración.

Coefficiente de valoración total = 1.2185 % .

### 5.2.3 METODO VOLUMETRICO.

Linealidad del Metodo y exactitud.

Para la linealidad del método se prepararon 5 niveles de concentración por sextuplicado. Obteniéndose los siguientes resultados:

CANTIDAD ADICIONADA g	CANTIDAD RECUPERADA g	PORCENTAJE RECUPERADO
0.4	0.4003	100.08
	0.4030	100.76
	0.4038	100.96
	0.4036	100.91
	0.4015	100.38
0.45	0.4024	100.61
	0.4563	101.41
	0.4499	99.99
	0.4482	99.61
	0.4550	101.12
0.5	0.4498	99.96
	0.4496	99.92
	0.5056	101.13
	0.4969	99.39
	0.5016	100.16

Continúa

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Analista	1	0.4766	0.4766	0.2485 P(Fcal)F=0.6064
Día /analista	2	3.8359	1.9180	1.2027 P(Fcal)F=0.3504
Error	8	12.7578	1.5947	

El analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto de los días para un analista en la valoración.

Coefficiente de valoración total = 1.2185 % .

### 5.2.3 METODO VOLUMETRICO.

Linealidad del Método y exactitud.

Para la linealidad del método se prepararon 5 niveles de concentración por sextuplicado. Obteniéndose los siguientes resultados:

CANTIDAD ADICIONADA G	CANTIDAD RECUPERADA G	PORCENTAJE RECUPERADO
0.4	0.4003	100.08
	0.4030	100.76
	0.4038	100.96
	0.4036	100.91
	0.4015	100.38
	0.4024	100.61
0.45	0.4563	101.41
	0.4499	99.99
	0.4482	99.61
	0.4550	101.12
	0.4498	99.96
0.5	0.4496	99.92
	0.5056	101.13
	0.4969	99.39
	0.5016	100.16

Continúa

CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	PORCENTAJE
G	G	RECUPERADO
0.55	0.4951	99.03
	0.5019	100.39
	0.5008	100.17
	0.5504	100.06
	0.5497	99.95
0.60	0.5470	99.45
	0.5514	100.25
	0.5492	99.19
	0.5455	99.85
	0.5982	99.69
	0.5981	99.68
	0.5991	99.86
	0.6041	100.68
0.6054	100.89	
	0.6008	100.14

n = 36

m = 1.0002

b = 0.0006

$r = 0.99989$

$r^2 = 0.9998$

$$y = 1.0002(x) + (0.0006)$$

Intervalo de confianza para pendiente:

0.9955 a 1.005

Intervalo de confianza para intercepto:

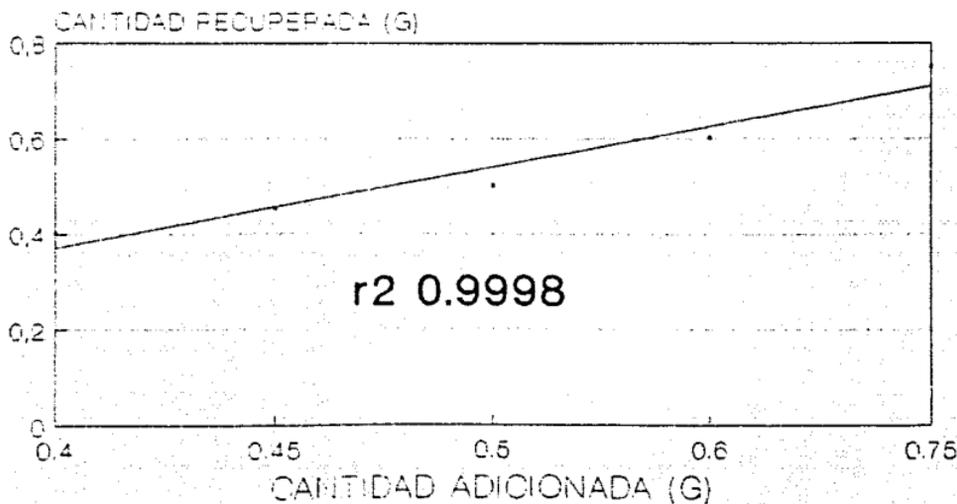
-0.0016 a 0.0027

Al observar los resultados notamos que el método carece de error sistemático consistente y constante.

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	1.4007	1.4007	187165.1
Error de regresión	34	0.0003	0	P(Fcal)= 1810
Falta de ajuste	4	0	0	1.6648
Error	39	0.0002	0	P(Fcal)= 0.1835

# LINEALIDAD DEL METODO (VOLUMETRICO) DICLOFENAC DIETILAMONIO



— Series 1

GRAFICA No. 6

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada (Ver gráfica 6). El modelo lineal simple representa de manera correcta la relación.

- Media aritmética de por ciento recuperado = 100.18
- Desviación estándar = 0.6053
- Coeficiente de variación = 0.6042
- Intervalo de confianza para la media:  
99.9636 a 100.4143

Con estos resultados el método carece de error sistemático constante.

Nota: Para los cálculos anteriores se incluye el nivel 0.

Reproducibilidad:

Se llevó a cabo por 2 analista en 2 días diferentes, trabajando por triplicado cada muestra. Los resultados se muestran a continuación:

A N A L I S T A

	1	2
	100.38	100.05
DIA 1	99.13	99.89
	98.63	100.83
	98.93	101.37
DIA 2	98.98	100.19
	97.85	99.16

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Analista	1	5.1875	5.1875	8.5677
Día Analista	2	1.2109	0.6055	$F(F_{est}, F) = 8.83 \times 10^{-3}$
Error	8	5.25	0.6563	$P(F_{est}, F) = 9.42 \times 10^{-3}$

El analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto de los días para un analista en la valoración.

-Coeficiente variación total = 1.0326

## 6. CONCLUSIONES

#### METODO POR CLAR:

El método analítico desarrollado para determinar la estabilidad del producto es específico y selectivo hacia los degradantes y activo, cumpliendo con los criterios de validación, por lo que el método es confiable para ser utilizado en la determinación de la estabilidad del producto (Diclofenac dietilamonio en crema al 1 %).

#### METODO ESPECTROFOTOMETRICO:

El método analítico desarrollado para la cuantificación de diclofenac dietilamonio en crema al 1 % producto en proceso y/o producto terminado cumple con los criterios de linealidad del sistema, exactitud y linealidad del método y reproducibilidad. Por lo que puede ser utilizado en pruebas de rutina del análisis de este activo, siendo el método sencillo y rápido.

#### METODO VOLUMETRICO:

El método analítico desarrollado para la cuantificación de diclofenac dietilamonio materia prima cumple con los criterios de validación establecidos, por lo que también este método puede ser empleado en pruebas de rutina para la cuantificación de este activo.

## 7. RECOMENDACIONES

1.- Optimizar el método espectrofotométrico para su uso en pruebas de rutina en el departamento de control de calidad.

2.- Hacer una comparación estadística de los métodos para determinar si pueden usarse indistintamente.

3.- Cuando se valide un método analítico en el cual se haga tolerancia determinar este parámetro primero para así escoger las condiciones óptimas de operación.

4.- Hacer especificidad al método espectrofotométrico para saber si este es específico y poder usar así uno u otro método analítico.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 1

## 1 CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. (26)

En esta parte se describen los criterios para evaluar la linealidad del sistema exactitud, linealidad y precisión del método. Con estos parámetros se determina del método analítico su exactitud y variabilidad, para saber si este es confiable o no, desde el punto de vista estadístico.

### 1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.

La linealidad del sistema de medición consiste en la relación que se establece, entre la cantidad de activo y una propiedad biológica, física o química, mediante una recta.

Experimentalmente se determina preparando una curva de calibración a partir de una misma solución patrón, utilizando cuando menos 3 diferentes niveles de concentración y haciendo el análisis por triplicado cada concentración.

Ahora bien, el intervalo de concentraciones a analizar dependerá del propósito del método y siempre debe de incluir el 100 % de activo establecido para el método analítico.

#### CRITERIOS:

a) La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa,  $r \geq 0.99$ .

b) La ordenada al origen de la regresión lineal simple, concentración-propiedad medida debe ser estadísticamente igual a cero,  $b \approx 0$ .

c) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente:

1) Tabular los resultados en base al siguiente formato:

Nivel de concentración de la solución patrón (X)	Propiedad medida (Y)
$x_1$	$Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1r}$
$x_2$	$Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2r}$
.	.
.	.
.	.
$x_t$	$Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tr}$

Donde t = número de diluciones

r = número de replicaciones (propiedad medida) de cada concentración.

Para proceder a los cálculos, es necesario que el número de replicaciones por concentración sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares

$$\Sigma X = r(x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1r} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2r} + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tr}$$

$$\Sigma X^2 = r(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1r}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2r}^2 + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tr}^2$$

$$\Sigma XY = x_1(Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1r}) + x_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2r}) + \dots + x_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tr})$$

### 3) Cálculos finales

$$m = \frac{rt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{rt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y - m(\Sigma x)}{rt}$$

$$r^2 = \frac{[rt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[rt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][rt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

Intervalo de confianza para intercepto ( b ):

$$b \pm t_{(paw, n-2)}(\Sigma y/x) \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{rt(\Sigma (\bar{x}_i - \bar{x})^2)}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - (b)(\Sigma y) - m(\Sigma xy)}{rt}}$$

$$S_{y/x} = S_{y/x} \sqrt{\frac{rt}{(rt) - 2}}$$

$t_{(n-2)}$  = es la "t" de student determinada a partir de las tablas a un 95 % de significancia.

$$\Sigma(x_i - \bar{x})^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{rt}$$

Error estándar relativo (E.S.R.)

$$E.S.R. = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}}$$

Este valor debe ser menor a 0.03.

## 2.- PRECISION DEL SISTEMA.

La precisión del sistema se define como la concordancia relativa entre mediciones repetidas independientes, de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (repetibilidad).

La precisión del sistema se determina por análisis por sextuplicado de una misma solución de referencia correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

### CRITERIOS:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5 %. Para este criterio se realiza lo siguiente:

- 1) Tabular los resultados

$$Y_1 + Y_2 + Y_3 \dots Y_n$$

- 2) Cálculos preliminares

$$S_y = Y_1 + Y_2 + Y_3 \dots Y_n$$

$$\Sigma y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_r^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Donde n = rt

Desviación estandar (DE):

$$DE = \left[ \frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

### 3) Calculos finales

Coefficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

### 3. LINEALIDAD DEL METODO.

La linealidad del método de medición es la relación que se establece entre la cantidad de fármaco recuperado y el valor real de la cantidad de fármaco adicionado.

Esta linealidad se determina experimentalmente con placebos cargados, cada uno de manera independiente, se preparan 6 diferentes niveles de concentración por sextuplicado cada uno, y se analizan en 2 días diferentes.

El intervalo de concentraciones a analizar dependerá del propósito del método y debe de llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

### CRITERIOS:

a) La relación lineal simple de cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser altamente significativa,  $r \geq 0.99$ .

b) La ordenada al origen de la relación lineal simple de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero,  $b \cong 0$ .

c) La pendiente de la relación lineal simple de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a 1,  $m \cong 1$ .

d) La desviación estándar de regresión y la desviación estándar del error puro, debe de cumplir con los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente:

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	Total
(x)	(y)	(Y)
.	.	.
.	.	.

2) Calcular la suma de la cantidad adicionada ( $\Sigma x$ ), suma de cuadrados de la cantidad adicionada ( $\Sigma x^2$ ), suma de la cantidad recuperada ( $\Sigma y$ ), la suma de cuadrados de la cantidad recuperada ( $\Sigma y^2$ ), suma del producto de la cantidad adicionada por la cantidad recuperada ( $\Sigma xy$ ). (Ver página 81). La suma de cuadrados totales ( $\Sigma Y^2$ ) y determinar el número de cantidades

adicionadas (t), el número de replicaciones por la cantidad adicionada (r) y el número de pares ordenados (n).

$$n = rt$$

3) Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b):

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

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{n}$$

Construir la tabla del análisis del varianza:

4) Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCr) y la suma de cuadrados del error de regresión (SCer):

$$SCr = m(\sum xy) + b(\sum y) - \left(\frac{(\sum y)^2}{n}\right)$$

$$SCer = \sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)$$

5) Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa):

$$SCep = \sum y^2 - \left(\frac{(\sum y)^2}{r}\right)$$

$$SCfa = SCer - SCep$$

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	SCR	SCR	$F_r = \frac{SCR}{MCer}$
Error de regresion	n - 2	SCer	$MCer = \frac{SCer}{gler}$	
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	$MCfa = \frac{SCfa}{glfa}$	$F_{fa} = \frac{MCfa}{MCep}$
Error puro	t(r-1)	SCep	$MCep = \frac{SCep}{glep}$	

6) Determinar en la tabla de distribución F los valores para  $F(glr, gler; \text{al } 0.01)$  y  $F(glfa, glep; \text{al } 0.05)$ .

7) Establecer la decisión en base a la siguiente regla:

a) Si  $F_r \geq F(glr, gler; \text{al } 0.01)$ , existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

b) Si  $F_r < F(glr, gler; \text{al } 0.01)$ , no existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

c) Si  $F_{fa} \geq F(glfa, glep; \text{al } 0.05)$ , existe falta de ajuste a la relación lineal simple.

d) Si  $F_{fa} < F(glfa, glep; \text{al } 0.05)$ , no existe falta de ajuste a la relación lineal simple.

B) Calcular el coeficiente de determinación ( $R^2$ ):

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

9) Construcción del intervalo de confianza para la ordenada al origen:

a) Calcular la desviación estándar de regresión ( $S_{y,x}$ ):

$$S_{y,x} = \left[ \frac{SC_{er}}{q_{ler}} \right]^{1/2}$$

b) Calcular la desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_b$ ):

$$S_b = S_{y,x} = \left[ \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\frac{(\sum x^2) - (\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

c) Determinar en la tabla de distribución "t" de student, el valor para  $t_{n-2, 0.075}$ .

d) Calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICb):

$$IC_b = b \pm t_{n-2, 0.075}(S_b)$$

10) Construcción del intervalo de confianza para la pendiente:

a) Calcular la desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ):

$$S_m = S_{y,x} \left[ \frac{1}{\frac{(\sum x^2) - (\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

b) Calcular el intervalo de confianza para la pendiente (ICm):

$$IC_m = m \pm t_{n-2, 0.075}(S_m)$$

#### 4.- EXACTITUD.

La exactitud es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente (estimador) y su valor real de referencia (parámetro).

Para determinar la exactitud del método, se pueden tomar los datos de linealidad del método de cantidad recuperada y pasarlos a porcentaje recuperado.

##### CRITERIOS:

- a) El intervalo de confianza para la media debe de incluir el 100%.
- b) El coeficiente de variación total debe ser menor al 2%.

Para estos criterios se realiza lo siguiente;

- 1) Tabular los resultados de porcentaje recuperado ( $y$ ).
- 2) Calcular la suma de porcentaje recuperado ( $\Sigma y$ ) y determinar el número de recobros ( $n$ ), así como la suma de cuadrados del porcentaje recuperado ( $\Sigma y^2$ ).
- 3) Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ) y la desviación estándar (DE) del porcentaje recuperado.

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$DE = \left[ \frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

4) Determinar en la tabla de distribución "t" de student el valor de  $t_{\alpha/2, n-1}$ .

5) Calcular el intervalo de confianza para la media del porcentaje recuperado:

$$IC = \bar{y} \pm t_{n-1, 0.975} \left[ \frac{DE}{n} \right]^{1/2}$$

b) Calcular el coeficiente de variación total (CV);

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

### 5.- REPRODUCIBILIDAD.

Determina el grado de reproducibilidad al hacer mediciones repetidas independientes.

La reproducibilidad se determina por lo menos con 2 analistas en 2 días diferentes, analizando muestras por triplicado. Se debe de trabajar de manera independiente las muestras del producto cercana al 100 % de la concentración estimada.

#### CRITERIOS:

- El coeficiente de variación total debe ser menor a 2 %.
- La reproducibilidad entre analistas y la reproducibilidad entre día-analista debe satisfacer los requisitos establecidos al construir una tabla del análisis de varianza.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente:

1) Tabular los resultados en base al siguiente formato:

	Analista (i)	
	1	2
Diaz	...	...
	...	...
	...	...
Diaz	...	...
	...	...
	...	...

2) Calcular la suma de las combinaciones: Analista-día ( $Y_{ij}$ ), suma para cada analista ( $Y_{i..}$ ), la suma total de los datos ( $Y_{...}$ ) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ( $\sum \sum Y_{ij}^2$ ).

$$Y_{i.} = Y_{i1} + Y_{i2} + Y_{i3}$$

$$Y_{...} = \sum Y_{i1} + \sum Y_{i2}$$

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

$$\sum \sum Y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{13})^2 + (Y_{21})^2 + (Y_{22})^2 + (Y_{23})^2 + (Y_{31})^2 + (Y_{32})^2 + (Y_{33})^2 + (Y_{41})^2 + (Y_{42})^2 + (Y_{43})^2$$

3) Calcular la suma de cuadrados del analista ( $SCa$ ):

$$SCa = \frac{(\sum Y_{i..})^2}{d(r)} - \frac{(Y_{...})^2}{d(r)a}$$

Donde: r = Número de replicaciones

d = Número de días

a = Número de analistas

4) Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd):

$$SCd = \frac{(\sum \sum Y_{ij}^2)}{r} - \frac{(\sum Y_{i..}^2)}{d(r)}$$

5) Calcular la suma de cuadrados del error (SCE):

$$SCE = (\sum \sum Y_{ijk}) - \frac{(\sum \sum Y_{ij.}^2)}{r}$$

Construcción de la tabla de analisis de varianza:

Tabla de analisis de varianza

Fuente de variacion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>
Analista	gla = a-1	SCa	MCa = SCa/gla	F <sub>a</sub> = $\frac{MCa}{MCd}$
Día	gld=(d-1)a	SCd	MCD = SCd/gld	F <sub>d</sub> = $\frac{MCD}{MCE}$
Error	gle=(r-1)ad	SCE	MCE = SCE/gle	

6) Se establecen decisiones:

a) Si  $F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$ , el método analítico no es reproducible por los analistas.

b) Si  $F_a < F_{gla, gld; 0.05}$ , el método analítico es reproducible por los analistas.

c) Si  $F_d \geq F_{gld, gle; 0.05}$ , el método no es reproducible en distintos días por un analista.

d) Si  $F_d < F_{gld, gle; 0.05}$ , el método es reproducible en distintos días por un analista.

7) Calcular el coeficiente de variación total (CV):

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \cdot 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i,j,k} x_{i,j,k}}{n}$$

$$DE = \left[ \frac{n \sum_{i,j,k} x_{i,j,k}^2 - (\sum_{i,j,k} x_{i,j,k})^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

$$n = a(d)r$$

#### b.- ESPECIFICIDAD.

La especificidad determina si el método analítico es específico con los productos de degradación del activo o componentes de la formulación es decir se confirma si el método es capaz de solamente cuantificar al producto de interés.

Si no se cuentan con los productos de degradación se somete a que el producto se degrade. Se sugiere que la degradación sea tal que la concentración del activo de interés esté disminuido en un 10 a 30 %, esto se logra sometiendo el activo, así como el placebo y formulación, a condiciones de degradación. Las condiciones de degradación se establecen de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del activo y de la formulación misma.

Estas condiciones pueden ser por ejemplo:

a) Colocar el activo, placebo y formulación en un horno a  $70^{\circ}\text{C}$  -  $120^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$  menos que el punto de fusión del activo, durante 2 a 4 semanas.

b) Exponer el activo, placebo y formulación a luz UV, a luz fluorescente y/o a humedad.

c) Exponer activo, placebo y formulación a pH = 1 a 2 y/o pH = 10 a 12 a reflujo. Si son formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación con peróxidos. Todas estas condiciones se llevan a cabo en solución acuosa.

Una vez que se tienen productos de degradación de ser posible habrá que separarlos por CLAR, CG y/o por cromatografía en capa fina.

#### CRITERIOS:

Verificar que cada producto de degradación se encuentre separado del activo. Para métodos por CLAR es muy importante cumplir con este criterio, ya que a partir de esta información se elige el compuesto de referencia interna.

#### 7.- TOLERANCIA DEL SISTEMA.

La tolerancia ve el grado de reproducibilidad del método analítico al cambiar una de las condiciones normales de operación, por ejemplo, en CLAR cambios en la fase móvil: la proporción de modificador orgánico, la fuerza iónica y/o el pH. En otras palabras se confirma la potencia del método y el grado de error que se podrá tolerar al saber que existe en el método analítico. Los resultados obtenidos aquí se comparan con los obtenidos a las condiciones normales de operación.

Para los cálculos que se necesitan para la validación de los métodos analíticos fueron realizados por medio de un programa estadístico elaborado por CAFET, S.A.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Clarke's. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Second edition. 1986.
- 2.- Munson W. Pharmaceutical analysis. modern methods parte B. Volume 11, fifth edition. 1986.
- 3.- N.A. Farris. Instrumental liquid chromatography. a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods. Volume 27. second edition. 1984.
- 4.- Sanford Bolton. Pharmaceutical statistics. practical and clinical applications. Volume 44. Second edition. 1990.
- 5.- Connors K.A. Curso de análisis farmacéutico. Primera edición. 1980.
- 6.- Noguez J.A., Pozas R. Espectroscopia. visible-ultravioleta-infrarrojo. E.N.C.R., 1985.
- 7.- Snyder L.R. Introduction to modern liquid chromatography. second edition. 1979.
- 8.- Ostle B. Estadística aplicada. Octava reimpression. 1983.
- 9.- Perkin-Elmer. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Primera edición. 1981.
- 10.- Waters Chromatography division. Waters sourcebook for chromatography columns and supplies. 1985.
- 11.- USP (Pharmacopeia National Formulary) XII, 1990.
- 12.- Yaginuma T., Wada H. Sustained release of sodium diclofenac from suppository. International Journal of Pharmaceutics 27, 1985. 245-253.
- 13.- Nishihata T. Investigation of sustained release suppository of sodium diclofenac in humans. International Journal of Pharmaceutics, 33, 1986, 181-186.
- 14.- Owen S.G. Rapid high performance liquid chromatography assay for the simultaneous analysis of non-steroidal antiinflammatory drugs in plasma. Journal of Chromatography, 416, 1987, 293-302.
- 15.- Fini A. Dissolution and partition thermodynamic functions of some non-steroidal antiinflammatory drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences, 75 (1), 1986, 23-25.
- 16.- Sastry C.S. Spectrophotometric analysis of diclofenac sodium and piroxicam and their pharmaceutical preparations. Anal. Lett., 20 (2), 1987, 349-359.

17.- Yakuri F. Relationship between pharmaceutical properties of commercial diclofenac sodium tablets and plasma concentrations in man. Rinsho Yakuri, 10 (3), 1979, 335-345.

18.- Quantitative determination of diclofenac sodium in plasma by absorption measurement with the direct evaluation help thin-layer chromatograms. J. Chromatog., 181 (3-4), 1980, 512-515.

19.- Determination of some antiinflammatory weak analgesic and uricosuric drugs in human blood plasma and its application to pharmacokinetics. Acta Pharmacol. Toxicol., 47 (14), 1980, 267-273.

20.- Pharmacokinetics of diclofenac sodium using a developed HPLC method. Arzneim-Forsch., 31 (12), 1981, 2089-2092.

21.- A rapid and sensitive method for determination of diclofenac sodium in plasma for HPLC. Anal. Lett., 15 (B 21), 1982, 1649-1663.

22.- Identification and determination of voltaren. Farm zh (Kiev)(1) 1982, 52-54.

23.- Determination of diclofenac sodium by HPLC by eletromechanical detection. Hum. Toxicol. 4 (3), 1985, 317-322.

24.- Kinetics aspects of the dissolution and partition of diclofenac, aldofenac and their sodium salts. Arch. Pharm. 371 (11), 1984, 897-905.

25.- The history diclofenac. Semin. Arthritis rheum. 15 (2 Suppl. 1) 1985, 57-60.

26.-Curso de validacion de métodos analíticos, impartido en el Centro Consultorio y servicios en estadística biomédica y farmacéutica (CSEBIOFAR). Ponente: Alejandro Alcantara. Septiembre de 1989.