

302827

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

3
2Ej



ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA
DETERMINACION DE AMCINONIDA Y ALCOHOL
BENCILICO EN UNA CREMA POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

ALEJANDRO CALVA AMSLER

MEXICO, D. F.

1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

A mis Padres, César y Lilia, por su paciencia y comprensión, por su apoyo constante, su amor incondicional y su guía cariñosa a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, Gigi, Lila, César, Irene, Jorge, Fernando, Analú y Pablo, porque ustedes son mi fuente de inspiración para seguir adelante en todo momento.

A la Memoria de Mami, siempre presente en mi corazón.

Dios:
Concedeme Serenidad para
aceptar las cosas que no puedo cambiar,
Valor para cambiar las que si puedo y
Sabiduria para reconocer la
diferencia.

INDICE

| | Pag. |
|---|------|
| I- INTRODUCCION | |
| 1.1- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 1 |
| 1.2- OBJETIVO | 2 |
| 1.3- HIPOTESIS | 2 |
| II- ANTECEDENTES | |
| 2.1- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS | 3 |
| 2.2- CORTICOSTEROIDES | 7 |
| 2.3- AMCINONIDA | 10 |
| 2.4- ALCOHOL BENCILICO | 11 |
| 2.5- CROMATOGRAFIA | |
| 2.5.1- GENERALIDADES | 12 |
| 2.5.2- EQUIPO UTILIZADO EN HPLC | 16 |
| 2.5.3- PARAMETROS CROMATOGRAFICOS | 17 |
| 2.5.4- METODOS DE CUANTIFICACION EN HPLC | 19 |
| 2.5.5-CROMATOGRAFIA DE CORTICOSTEROIDES | 23 |
| III- PARTE EXPERIMENTAL | |
| 3.1- DIAGRAMA DE FLUJO | 25 |
| 3.2- MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO | 26 |
| 3.3- METODO ANALITICO | |
| 3.3.1- FASE MOVIL | 27 |
| 3.3.2- PREPARACION DE ESTANDARES | 27 |
| 3.3.3- PREPARACION DE LA MUESTRA | 28 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.3.4- | PREPARACION DE LA COLUMNA | 29 |
| 3.3.5- | PROCEDIMIENTO DE ANALISIS | 29 |
| 3.3.6- | PARAMETROS A EVALUAR | 31 |
| 3.4- | ANALISIS ESTADISTICO | 37 |
| IV- | RESULTADOS | |
| 4.1- | ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO | |
| 4.1.2- | NUMERO DE PLATOS TEORICOS | 44 |
| 4.1.3- | FACTOR DE RESOLUCION | 45 |
| 4.1.4- | FACTOR DE ASIMETRIA | 46 |
| 4.2- | ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO | 47 |
| 4.3- | PRECISION DEL SISTEMA | 49 |
| 4.4- | LINEARIDAD DEL SISTEMA | 50 |
| 4.5- | PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO. AMCINONIDA | 53 |
| 4.6- | LINEARIDAD DEL METODO. AMCINONIDA | 55 |
| 4.7- | REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. AMCINONIDA. | 56 |
| 4.8- | ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA. AMCINONIDA. | 58 |
| 4.9- | PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO. ALCOHOL BENCILICO. | 59 |
| 4.10- | LINEARIDAD DEL METODO. ALCOHOL BENCILICO. | 61 |
| 4.11- | REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. ALCOHOL BENCILICO. | 62 |

| | |
|--|----|
| 4.12- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA. | |
| ALCOHOL BENCILICO. | 64 |
| 4.13- ANALISIS DE RESULTADOS | 65 |
| V- CONCLUSIONES | 69 |
| BIBLIOGRAFIA | 70 |

I- INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La validación es el proceso de determinar la confiabilidad de una metodología para proveer determinados datos analíticos. Es parte fundamental del desarrollo de la técnica de análisis de una forma farmacéutica. El gran incremento de nuevos productos obliga a la industria farmacéutica a buscar métodos de análisis apropiados y debidamente validados. (21,4)

Una parte integral del desarrollo del método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para demostrar su eficiencia. (4)

La amcinonida es un potente corticosteroide para aplicación tópica, con acciones antiinflamatoria y antipruriginosa. Su actividad y biodisponibilidad a partir de preparaciones tópicas es algo mayor a la correspondiente a la triamcinolona acetónida y al valerato de betametasona. Es efectiva en crema al 0.1%. El método oficial para determinación de amcinonida en cremas, es a base de extracciones diversas y posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución. (17, 16, 24)

El alcohol bencílico es muy utilizado como bacteriostático en productos parenterales y en presentaciones

galénicas de uso tópico. El método oficial de análisis del mismo es por cromatografía de gases. (14, 24)

Con este trabajo se pretende comprobar que un nuevo método analítico se puede aplicar para determinar simultáneamente amcinonida y alcohol bencílico en una crema, por cromatografía líquida de alta resolución, y que este cumple con los requisitos mínimos para considerarse como válido.

1.2- OBJETIVO

Comprobar por medio de pruebas de laboratorio y análisis estadístico de los resultados, que el método analítico estudiado es adecuado para el control de calidad del producto y cumple con los requerimientos para los cuales fue diseñado.

1.3- HIPOTESIS

El método analítico utilizado para determinación de amcinonida y alcohol bencílico por cromatografía líquida de alta resolución cumple con los requisitos mínimos necesarios para considerarse válido, de acuerdo a las aplicaciones deseadas.

II- ANTECEDENTES

2.1- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas; es el proceso de determinar la conveniencia de una metodología para proveer determinados datos analíticos. (4, 22, 10).

La efectividad de nuevos métodos analíticos depende directamente de una validación completa, ya que esta es parte fundamental del desarrollo de una formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica. (11, 4).

En el proceso de validación, la decisión sobre la utilidad del método se toma después de que se ha evaluado con respecto a las necesidades analíticas. Esto implica que un método válido en una circunstancia puede ser no válido en otra; aunque un método o procedimiento analítico sea válido en términos generales, no puede considerarse como válido para una situación experimental especial, debido a los efectos producidos por las diferencias entre las muestras analíticas. La adecuada validación es indispensable para asegurar que un

procedimiento es apropiado para el problema específico al que se aplicará. (10).

La validación de un método analítico verifica mediante una evaluación sistemática, que el método se basa en principios técnicos y científicos firmes, dentro de las condiciones que limitan su operación, y ha sido optimizado para los propósitos prácticos requeridos. (13, 10).

Un método es generalmente desarrollado alrededor del analito, la concentración a la cual se realiza el análisis, los excipientes de la muestra a analizar y la técnica utilizada para la determinación del analito. Los requerimientos de la validación del método dependen de la prueba en particular a la que se conducen y para la cual el método es aplicado. Para los diferentes métodos analíticos posibles se aplican diferentes criterios de validación. (11, 13, 19).

Todas las medidas analíticas cuantitativas están sujetas a errores. Es importante que en la validación del método analítico se obtengan resultados de manera que el error pueda ser estimado y su significancia establecida. Es de gran importancia distinguir entre error aleatorio y error sistemático, ya que su causa y efecto son diferentes. El error aleatorio puede deberse a diversas causas, y provoca una desviación de los resultados hacia ambos lados del valor real. Los errores sistemáticos tienen en general una causa constante,

por ejemplo, la liberación incompleta del principio activo, y causan que los resultados en una serie de réplicas se desvíen del valor medio en un sentido, provocando que todos los resultados sean altos o bajos. (15).

Para considerar un procedimiento analítico como válido se determinan mediante experimentos adecuados la linealidad, precisión y especificidad del sistema, así como la precisión, exactitud y reproducibilidad del método analítico. También es importante evaluar la estabilidad de la muestra analítica, y en caso de que el método se utilice para realizar pruebas de estabilidad, se determina la especificidad ante los productos de degradación.

PARAMETROS DE LA VALIDACION

Linealidad: La linealidad del sistema o método analítico es su capacidad para asegurar que la respuesta analítica es directamente proporcional a la concentración de la sustancia, dentro de un intervalo determinado que incluye el 100%. (4, 11).

Especificidad: Es la propiedad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra, ya sean excipientes o productos de degradación. (4)

Recobro: Es la medida de la eficacia de la extracción del analito de la matriz de la muestra. Se puede determinar analizando placebos añadidos con diferentes concentraciones de principio activo, comparando la cantidad adicionada con la cantidad recuperada por el método analítico. (21).

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una misma fuente; Se ve afectada por los errores aleatorios. (4, 15).

Exactitud: Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia; Se ve afectada por los errores sistemáticos. (4, 15).

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes, como son analistas, días, etc. El estudio de reproducibilidad debe incluir tantas variables como se pudieran encontrar en el uso normal del método; los resultados obtenidos deben interpretarse estadísticamente. (4, 11).

Estabilidad de la muestra analítica: Es la propiedad de una muestra preparada para su análisis, de conservar su integridad física y la concentración de la sustancia de interés, ya que esta se puede descomponer antes de ser

cuantificada, durante la preparación de las muestras o en su almacenamiento cuando ya han sido preparadas. Se determina evaluando el periodo de tiempo en el cual la muestra puede permanecer, en determinadas condiciones de almacenamiento, sin que se pierda precisión en los resultados del análisis. (4, 11, 21).

Límite de detección y de cuantificación: El límite de detección se define como la mínima cantidad de analito en una muestra cuya respuesta se puede distinguir de la respuesta del blanco. El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. (4, 12).

2.2 CORTICOSTEROIDES

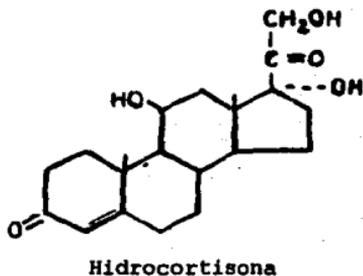
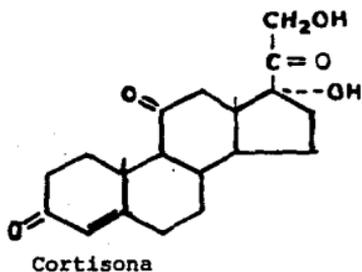
Corticosteroide es el término que se aplica a las hormonas o esteroides producidos por la corteza adrenal y se extiende a otros compuestos naturales o sintéticos con estructura y actividad similar. (23).

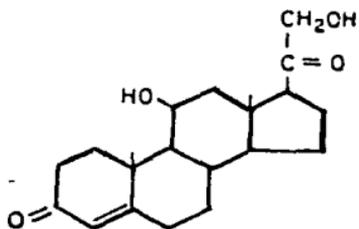
Los corticosteroides producen diversos efectos farmacológicos en el organismo de los mamíferos. Ejercen influencia sobre el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos y sobre el balance de electrolitos y agua; afectan las

funciones del sistema cardiovascular, sistema urinario, sistema músculo esquelético, sistema nervioso central, sistema gastrointestinal y piel y tejido conectivo; producen efectos sobre la hemopoyesis y presentan acción antiinflamatoria e inmunosupresiva. (5,9).

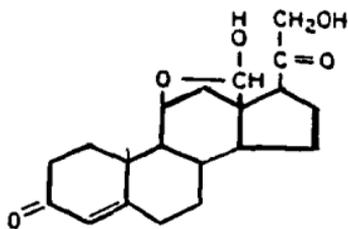
Los corticosteroides se clasifican en dos grupos: corticosteroides naturales, que se pueden extraer a partir de la glándula adrenal o prepararse sintéticamente, como son hidrocortisona, cortisona, corticosterona, 11-desoxycorticosterona y aldosterona y los corticosteroides sintéticos, como 9 α -fluorocortisol, prednisolona y triamcinolona. (5).

Los corticosteroides naturales son esteroides derivados del pregnano, que tienen grupos cetónicos en el C-3 y 20, con una insaturación entre el C-4 y C-5 del anillo A y tienen una cadena 17 β -OH-CO-CH₂OH. los corticosteroides sintetizados para uso medicinal, se obtienen a partir de sapogeninas esteroidales. (5).

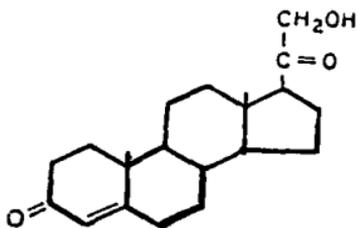




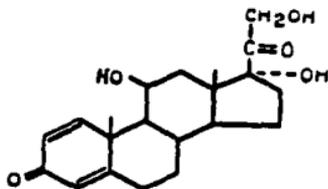
Corticosterona



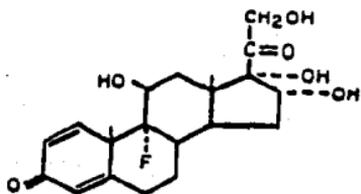
Aldosterona



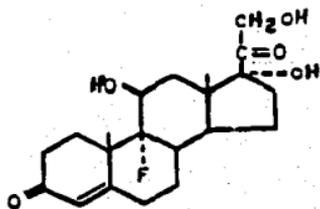
Desoxicorticosterona



Prednisolona

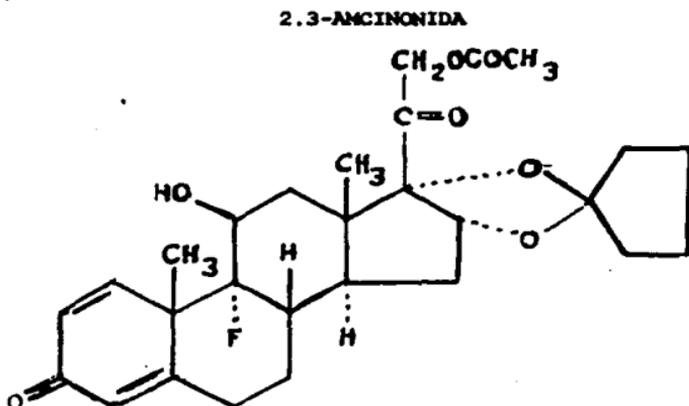


Triamcinolona



9α Fluorohidrocortisona

El uso terapéutico de los corticosteroides es ampliamente empírico. Se aplica en artritis reumatoide, carditis reumatica, asma bronquial, enfermedades inflamatorias oculares, y otras enfermedades específicas como nefritis, edema cerebral, nefrosis, lupus eritematoso, enfermedades eczematoideas de la piel, desórdenes alérgicos de la piel, neurodermatitis, pemfigus, enfermedades neoplásticas y enfermedad de Hodgkin. (5).

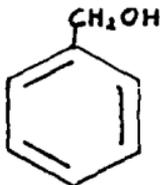


La aminonida es un potente corticosteroide efectivo por aplicación tópica en crema y su uso está indicado para aliviar las manifestaciones inflamatorias y pruriginosas que acompañan a aquellas dermatosis que responden a los corticosteroides, como psoriasis, psoriasis intertriginosa, dermatitis atópica,

dermatitis seborrética, dermatitis por contacto, dermatitis eczematosas, liquen plano, liquen simple crónico, neurodermatitis, lupus eritematoso discoide, dermatitis exfoliativa, intertrigo y dermatitis del pañal. (17)

El grado de absorción percutánea de la amcinonida al aplicarse tópicamente, está determinado por diversos factores que incluyen el vehículo, la integridad de la barrera dérmica y el uso de vendajes oclusivos. Una vez absorbida, la amcinonida es sujeta a los mismos parámetros farmacocinéticos que presentan los corticosteroides administrados por vía sistémica. Los corticosteroides se unen a las proteínas plasmáticas en grado variable y son metabolizados por el hígado y excretados por vía renal y algunos también por vía biliar. (17)

2.4 ALCOHOL BENCILICO



Densidad a 20 °C : 1.04535.

Punto de fusión: -15.19 °C.

Punto de ebullición: 204.7 °C.

Temperatura de autoignición: 837 °F.

Líquido claro e incoloro, de olor aromático ligero y sabor quemante. Ligeramente soluble en agua, miscible en alcohol, éter y cloroformo. Es poco tóxico e inflamable. Se prepara por hidrólisis de cloruro de bencilo, por medio de la reacción de Canizzaro, o por reducción catalítica. A gran escala se prepara por acción de carbonato de sodio o de potasio sobre cloruro de bencilo.

Se usa en preparación de perfumes y sabores, para desarrollo fotográfico en película de color, como solvente para gelatina y caseína en caliente, Para fabricación de otros compuestos bencílicos; En la industria farmacéutica se utiliza como agente antimicrobiano bacterioestático en productos inyectables, ungüentos y cremas. (14)

2.5 CROMATOGRAFIA

2.5.1 GENERALIDADES

En años recientes se ha observado un cambio significativo en las técnicas de análisis de fármacos. La instrumentación analítica cada vez más sofisticada, con manejo automatizado de las muestras, juega un papel importante en los laboratorios de análisis para desarrollo y control de calidad de productos farmacéuticos, lo cual permite una mayor rapidéz en el

desarrollo de nuevos productos y un mejor control de calidad.

(6)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC- High Performance Liquid Chromatography) es importante en la industria farmacéutica, y tiene aplicaciones en las áreas de aislamiento de fármacos de sus fuentes naturales, así como en la caracterización y ensayo del fármaco, y en el control de calidad y cuantificación del fármaco en el producto terminado.

(6)

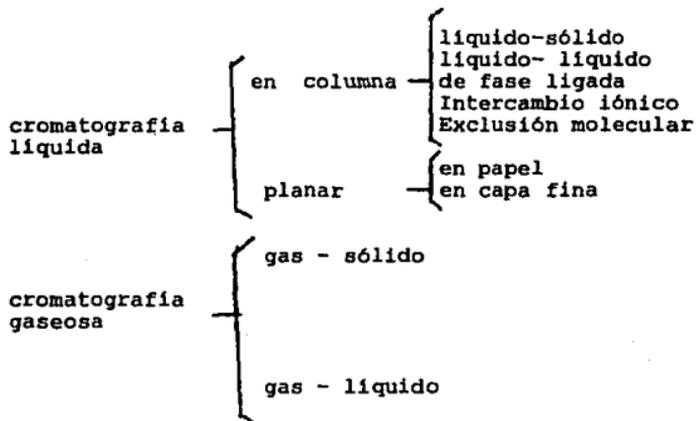
El uso de la cromatografía líquida de alta resolución ofrece sensibilidad, exactitud, precisión y conveniencia excelentes; quizá su principal ventaja es la especificidad, ya que al analizar el compuesto es separado de una serie de impurezas. (3)

La cromatografía se define como el procedimiento mediante el cual se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla, por medio de las fuerzas competitivas que las dos fases, una fija o estacionaria y otra móvil, ejercen sobre un soluto. En este proceso intervienen fuerzas tanto físicas como químicas. (8, 18)

Un sistema cromatográfico consiste en una fase estacionaria, capaz de ejercer fuerzas de retención sobre un soluto, y una fase móvil, que pasa continuamente a través de la fase estacionaria y que ejerce fuerzas de disolución sobre el

mismo soluto. El proceso mediante el cual el solvente de la fase móvil arrastra finalmente al soluto, se llama elución. La separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico, se debe a que la fase estacionaria retiene con mayor fuerza a los componentes más afines a ella, y por lo tanto, estos componentes tardarán más en eluir. (8).

En general, los métodos cromatográficos se clasifican según la naturaleza de la fase móvil:



Cuadro 1
Clasificación de métodos cromatográficos

En el caso de la cromatografía líquida de alta resolución se utilizan columnas delgadas y sistemas de alta presión que propician una separación más eficiente de los componentes de la muestra en pocos minutos. (20)

Los sistemas de cromatografía de líquidos se pueden diferenciar por el tipo de fuerzas de retención que presenta la fase estacionaria, según su naturaleza, sobre el soluto, lo cual da origen a distintos tipos de cromatografía, como la de adsorción, de reparto, de intercambio iónico y de exclusión molecular.

La elución de un soluto en un sistema cromatográfico es una función de la polaridad y dependerá de la dispersión de las moléculas del soluto entre las de la fase móvil y de la localización de las cargas de cada especie molecular. Si la molécula de soluto es polar, será atraída por los dipolos de una fase móvil polar y se unirá electrostáticamente a ellos, siendo por lo tanto eluida. También puede presentarse el establecimiento de puentes de hidrógeno y atracciones de tipo electrostático entre las moléculas de soluto y fase móvil.

En base a la polaridad de las fases móvil y estacionaria, se pueden utilizar dos tipos de sistema cromatográfico: el de fase normal, cuando la fase móvil está integrada por líquidos orgánicos no polares y la fase estacionaria es relativamente polar, y el de fase reversa, cuando la fase móvil está

constituida por líquidos acuosos o polares y la fase estacionaria es apolar.

2.5.2- EQUIPO UTILIZADO EN HPLC.

Columnas: Consisten en un tubo cilíndrico empacado con la fase estacionaria; El material de construcción de la columna, su forma y sus dimensiones, el material de empaque y otras características de las columnas son de mucha importancia para el desempeño del sistema cromatográfico. Existen en el mercado una gran cantidad de columnas listas para utilizarse, y su elección depende de las necesidades específicas de cada caso. (17)

Bombas: Son dispositivos capaces de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para que esta fluya a una velocidad específica y atraviese la columna cromatográfica. Existen diversos tipos de bombas cromatográficas, siendo las más comunes las de flujo constante, que pueden ser de un pistón, de pistón recíproco y de jeringa. Es importante que el sistema de bombeo proporcione un flujo uniforme, ya que de lo contrario, se pueden producir pequeñas variaciones en la línea base que afectan directamente a las áreas de los picos.

Detectores: Su función es detectar los diferentes componentes de la muestra cuando estos salen de la columna.

Existen de diversas clases, siendo los más comunes los espectrofotómetros UV-Visible o IR, refractómetros, fotómetros, fluorómetros, fotómetros de llama, espectros de absorción atómica, etc.. El detector debe tener una gran sensibilidad y es preciso establecer sus límites de detección. Debe ser capaz de detectar picos consecutivos sin perder eficiencia.

Integradores: Se encargan de transcribir la señal eléctrica que produce el detector, cuantificando las áreas bajo la curva de cada pico y registrándolas.

2.5.3. PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

La elución de un compuesto a través de un sistema cromatográfico idealmente da origen a una curva de tipo gaussiana al graficar la respuesta del detector, que es proporcional al número de moléculas que salen de la columna, contra el tiempo de elución.

Las principales características o parámetros de los picos cromatográficos son:

Tiempo de retención: Es el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico y la detección máxima que se produce para cada compuesto.

Area bajo la curva: Representa la cantidad de moléculas obtenidas de cada soluto de la muestra.

Resolución: Expresa si realmente el sistema cromatográfico es capaz de separar a dos compuestos entre sí. Se define como la diferencia entre los tiempos de retención de dos picos dividida entre el promedio del ancho de la base, expresado en términos de tiempo.

Número de platos teóricos (N): El concepto de plato teórico es un modelo físico capaz de reproducir lo que sucede en el interior de la columna cromatográfica, según se va produciendo la separación. Si consideramos que el interior de la columna está constituido no por partículas, sino por una serie de tamices sucesivos, en los que la luz del tamiz es el paso libre y su zona impenetrable es la retención, cada uno de estos tamices constituirá un plato teórico. Por lo tanto, al aceptar que la separación cromatográfica se realiza en torno a zonas transversales imaginarias, entre más platos posea la columna, más eficiente será.

Al número de platos teóricos se le asigna el concepto de eficiencia de la separación cromatográfica, pues entre mayor sea N , la capacidad separativa de la columna será mayor.

El número de platos teóricos, está en función de la distribución estadística de las moléculas respecto al tiempo

que tardan en salir de la columna. Cuanto mayor sea N , la agudeza del pico será mayor.

Factor de asimetría: El factor de asimetría mide la agudeza del pico. Un factor de asimetría de la unidad, indica un pico perfectamente simétrico. Un factor de asimetría mayor o menor que la unidad, significa coqueo del frente del pico correspondiente.

2.5.4. METODOS DE CUANTIFICACION EN HPLC

Después de que se han determinado las áreas de los picos se procede a cuantificar el principio activo, ya sea mediante estandarización externa o por estandarización interna.

El método de estandarización externa consiste en cuantificar comparando las áreas de los picos de la muestra y el estándar. Este método presenta las ventajas siguientes:

- 1.- Simplifica la preparación de las soluciones a analizar.
- 2.- Elimina la necesidad de un estándar interno.
- 3.- Se evitan problemas causados por una coelución del estándar interno y de productos de degradación desconocidos.

La concentración de un estándar externo debe ser cercana a la esperada en la solución de la muestra, y las áreas de los

picos deben ser comparables, evitando así cancelar errores en las medidas. La cantidad de sustancia de interés en la muestra se puede calcular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{A_m \cdot P_s \cdot D_m}{A_s \cdot P_m \cdot D_s} \cdot 100$$

en donde:

- % = Porcentaje del activo en la muestra.
- A_m = Área bajo la curva del pico de la muestra.
- A_s = Área bajo la Curva del pico del estándar.
- P_m = Peso de la muestra.
- P_s = Peso del estándar.
- D_m = Dilución de la muestra.
- D_s = Dilución del estándar.

El método de estandarización interna consiste en adicionar una sustancia determinada a la solución de prueba. La relación entre las áreas de los picos de las sustancias de interés y de la sustancia adicionada es comparada de un cromatograma a otro. Un estándar interno debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- 1.- Su pico debe ser completamente separado de los otros picos del cromatograma.
- 2.- Debe eluir cerca de los solutos que serán cuantificados.
- 3.- Preferiblemente su estructura y el área del pico deben ser parecidas a las de la muestra a analizar.

- 4.- No debe estar presente en la muestra a analizar ni ser producto de degradación de la misma. No debe degradar a la muestra.
- 5.- Debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de trabajo.
- 6.- Debe ser fácilmente disponible y de alta pureza.

Existen dos variaciones en las técnicas para el uso del estándar interno: una involucra una relación entre las respuestas, y la otra, la determinación de factores de respuesta. En el primer caso, se prepara una solución de la muestra y una solución del estándar, a las cuales se les adiciona una misma cantidad del estándar interno. Después de obtener el cromatograma de la muestra y del estándar, se determina la respuesta analítica (R) en cada caso:

$$R = \frac{\text{Area del pico de la sustancia de interés}}{\text{Area del pico del estándar interno}}$$

Se relacionan entonces en forma directa las respuestas analíticas de la muestra y del estándar, para cuantificar la sustancia de interés. La segunda forma de utilizar el estándar interno es por medio de la determinación de factores de respuesta, dividiendo el peso de la muestra entre la

correspondiente área del pico. Después el factor de respuesta se utiliza para calcular la concentración de la muestra:

$$FR = \frac{Asr \cdot Psi \cdot Dsr}{Asi \cdot Dsi \cdot Psr}$$

$$\% = \frac{Am \cdot Psi \cdot Dm \cdot 100}{Asi \cdot Dsi \cdot Pm \cdot FR}$$

En donde:

FR = Factor de respuesta.

Asr = Área del pico del estándar de referencia.

Am = Área del pico de la muestra.

Asi = Área del pico del estándar interno.

Psr = Cantidad del estándar de referencia.

Psi = Cantidad del estándar interno.

Pm = Cantidad de la muestra.

Dsr = Dilución del estándar de referencia.

Dm = Dilución de la muestra.

Dsi = Dilución del estándar interno.

Entre las ventajas de la utilización de un estándar interno, se encuentra que se corrigen ligeras variaciones en el volumen de inyección en el cromatógrafo. Así mismo, se eliminan errores causados por pequeñas diferencias en las diluciones cuantitativas de la muestra y el estándar, causadas, por

ejemplo, por diferencias de temperatura al momento de realizar la dilución; La relación entre la cantidad de sustancia de interés y la cantidad de estándar interno, es constante desde el momento en que este se añade a la muestra. (2).

2.5.5. CROMATOGRAFIA DE CORTICOSTERIOIDES

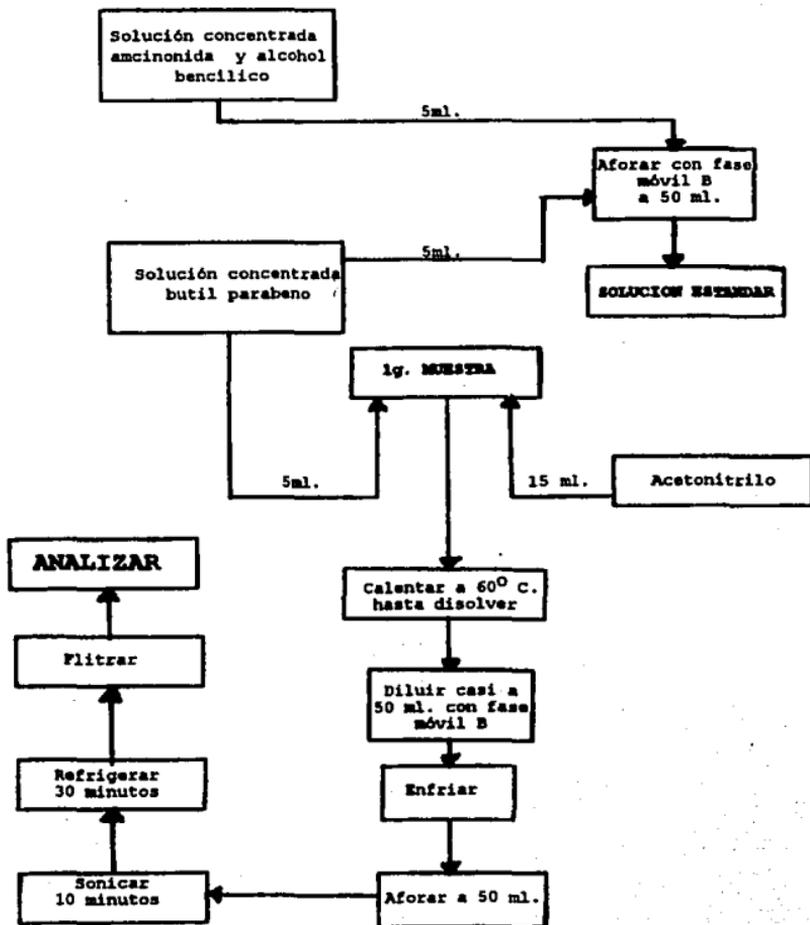
Los esteroides fueron los compuestos en los cuales se observó inicialmente el potencial de la cromatografía líquida de alta resolución aplicada en análisis farmacéutico; muchos métodos analíticos son adecuados para la determinación de corticosteroides, como son las reacciones de desarrollo de color con azul de tetrazolio o isoniacida, cromatografía en capa fina seguida de mediciones espectrofotométricas UV o colorimétricas o por cromatografía gas - líquido. La determinación de esteroides por HPLC ha llegado a ser el método de análisis de dichos compuestos más usual, principalmente porque la mayoría de estos compuestos se pueden analizar por un método general, que requiere una preparación de la muestra muy sencilla. (1, 23).

La cromatografía líquida de alta resolución es un instrumento poderoso que provee métodos específicos para analizar corticosteroides en preparaciones farmacéuticas. Los métodos son especialmente adecuados para corticosteroides en crema, lociones y ungüentos debido a que la complejidad del

excipiente interfiere potencialmente con los métodos UV o colorimétricos, siendo la mayoría de estas interferencias eliminadas con los métodos HPLC. (26).

III - PARTE EXPERIMENTAL

3.1- DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1- MATERIAL

- Matraces volumétricos de 50 ml.
- Pipetas volumétricas de diversas capacidades.
- Matraces Kitasato de 500 ml. y 1000 ml.
- Probetas graduadas de diversas capacidades.
- Papel filtro Watman No. 1.
- Membrana Gelman Matricel Alpha 200 de 0.2 micras.

3.2.2- REACTIVOS

- Acetonitrilo grado U.V. (Baxter - Burdick & Jackson).
- Alcohol bencílico grado reactivo. (J.T. Beaker. Estándar secundario. Pureza 99.79%).
- Aminonida. (Materia prima. Estándar secundario. Pureza 98.97 %).
- Butil parabeno. (Estándar. Pureza 100%).
- Metanol grado U.V. (Baxter - Burdick & Jackson).

3.2.3- EQUIPO

- Balanza analítica.
- Ultrasonido: Branson mod. 1200.
- Columna HPLC: Zorbax ODS 4.6mm ID x 25 cm.
- Bombas HPLC: Waters mod. 510.
- Inyector HPLC: Reodyne Loop fijo 20 µl.
- Controlador de gradiente: Waters.
- Detector: Waters mod. 484.
- Integrador: Waters mod. 745 B.

3.3 METODO ANALITICO

3.3.1- FASE MOVIL

- Fase móvil A: Mezclar 350 ml. de acetonitrilo y 650 ml. de agua HPLC. Degasificar antes de usarse.
- Fase móvil B: Mezclar 700 ml. de acetonitrilo y 300 ml. de agua HPLC. Degasificar antes de usarse.

3.3.2- PREPARACION DE ESTANDARES

- Solución concentrada de amcinonida y alcohol bencilico: Pesar 10 mg. de amcinonida y 200 mg. de alcohol bencilico en un

matraz volumétrico de 50 ml. Diluir a la marca con fase móvil B. Sonicar 5 minutos y mezclar.

- Solución concentrada de butil parabeno (estándar interno):
Pesar 6.25 mg. de butil parabeno en un matraz volumétrico de 50 ml. Diluir a la marca con fase móvil B. Sonicar 5 minutos y mezclar.
- Solución estándar de análisis: Pipetear 5 ml. de solución concentrada de amcinonida y alcohol bencílico y 5 ml. de solución concentrada de butil parabeno en un matraz volumétrico de 50 ml. Diluir a la marca con fase móvil B y mezclar. Filtrar a través de membrana Gelman Matricel Alpha 200 de 0.2 micras.

3.3.3- PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar aproximadamente 1g. de muestra en un matraz volumétrico de 50 ml.. Agregar 5 ml. de solución concentrada de butil parabeno y 15 ml. de acetonitrilo. Calentar en un baño de agua a 50 - 60 °C. hasta disolver la muestra completamente. Agregar fase móvil B casi hasta la marca cuando la muestra se encuentra aún caliente. Enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente. Diluir a la marca con fase móvil B. Agitar vigorosamente. Sonicar durante 10 minutos. refrigerar durante 30 minutos. Filtrar a través de papel Watman No. 1 y

posteriormente a través de membrana Gelman Matricel Alpha 200 de 0.2 micras.

3.3.4- PREPARACION DE LA COLUMNA

Antes de iniciar el análisis lavar la columna cromatográfica, pasando a flujo de 1 ml. por minuto:

- a) Durante 30 minutos, metanol - agua 50:50.
- b) Durante 30 minutos, acetonitrilo - agua 50:50.
- c) Durante 20 minutos, fase móvil A.
- d) Durante 20 minutos, mezcla de fase A - fase B
85% - 15%.
- e) Durante 20 minutos, mezcla de fase A - fase B
70% - 30%.

3.3.5 - PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

- Fase móvil: 70% fase A - 30% fase B.
- Flujo: 2.0 ml. por minuto.
- Velocidad de graficación 0.5 cm/min.
- Atenuación: De 0 a 8 minutos 128. De 8 minutos en adelante 32.
- Nivel de ruido: 1200.
- Inyectar por duplicado 20 µl de estándar y de cada muestra.

CALCULOS:

% DE AMBININIDA O = (RM/RE) X (CE/CM) X 100
ALCOHOL BENCILICO

RM = ABC MUESTRA / ABC BUTIL
PARABENO MUESTRA

RE = ABC ESTANDAR / ABC BUTIL
PARABENO ESTANDAR

CE = CONCENTRACION EL ESTANDAR

CM = CONCENTRACION DE LA MUESTRA

(ABC = Area Bajo la Curva.)

3.3.6 - PARAMETROS A EVALUAR

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Analizar un estándar de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno, utilizando velocidad de carta de 2cm. por minuto.

Determinar:

- a) Número de platos teóricos de la columna para cada compuesto de interés, según la fórmula:

$$\text{NUMERO DE PLATOS TEORICOS} = .25 \times (t_r / W_{5\alpha})^2$$

Donde: t_r = Tiempo de retención en segundos.

$W_{5\alpha}$ = Ancho de la base del pico, a una distancia de 4.4% de la altura total del pico.

- b) Factor de resolución entre alcohol bencílico y butil parabeno y entre amcinonida y butil parabeno.

$$\text{FACTOR DE RESOLUCION} = (t_2 - t_1) / 1/2 (a_2 + a_1)$$

Donde: t_1 y t_2 = Distancia medida en milímetros desde el inicio de la corrida al máximo de cada pico.

a_1 y a_2 = Ancho de la base del pico, extendiendo los bordes de los lados hasta la línea base.

c) Factor de asimetría de cada pico.

$$\text{FACTOR DE ASIMETRIA} = w_{0.05} / 2f$$

Donde: $w_{0.05}$ = Ancho de la base del pico al 5% de su altura total.

f = Distancia medida del máximo del pico al borde trasero del mismo al 5% de su altura total.

ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Analizar soluciones estándar correspondientes al 100% de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno por separado, así como muestra de producto terminado y placebo. Identificar la respuesta analítica de los principios activos y de los excipientes. El sistema será específico si no hay ninguna interferencia con los picos de los principios activos de interés, debida a algún otro componente de la muestra.

PRECISION DEL SISTEMA

Analizar por sextuplicado una solución estándar correspondiente al 100% de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno.

El sistema se considerará preciso si el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva de cada compuesto de interés es menor o igual a 2%.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Preparar a partir de la solución concentrada de amcinonida y alcohol bencílico, estándares que contengan 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% y 160% de dichos principios activos, y analizarlos por duplicado.

Tabular, para cada principio activo, el promedio del área bajo la curva contra la concentración de cada muestra. Calcular el coeficiente de regresión y el coeficiente de determinación.

Calcular el coeficiente de variación de los factores obtenidos al dividir el promedio del área bajo la curva entre la concentración de principio activo en cada muestra.

El sistema se considerará lineal si el coeficiente de correlación es mayor a 0.99, el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, y el coeficiente de variación es menor de 2%.

PRECISION, EXACTITUD Y LINEARIDAD
DEL METODO.

Se utilizará el método de placebo añadido, preparando 6 muestras correspondientes a cada concentración (80%, 100% y 120% para amcinonida y 50%, 100% y 150% para alcohol bencílico).

Pesar por sextuplicado, junto con 1g. de placebo, 8mg. de amcinonida y 0.1g de alcohol bencílico (80% y 50% respectivamente), 10mg. de amcinonida y 0.2g de alcohol bencílico y (100%) y 12mg. de amcinonida y 0.3g de alcohol bencílico (120% y 150% respectivamente). Agregar a cada muestra 5ml. de una solución de 62.5mg. de butil parabeno en 50 ml. de fase móvil B. Continuar el tratamiento de las muestras normalmente.

Filtrar las muestras después de refrigerarlas; colocar cuantitativamente 5 ml. de cada solución filtrada en un matraz de 50 ml. y aforarlos con fase móvil B. Filtrar en membrana y analizar cada muestra.

Comparar el resultado obtenido con un estándar preparado de la misma manera para cada concentración, pero sin agregar placebo. Calcular para cada muestra el porcentaje de recobro de amcinonida y de alcohol bencílico.

El método se considerará preciso si el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos es menor al 2% y la media de los mismos se encuentra entre 98% y 102%. Así mismo, el intervalo de confianza debe incluir el 100%.

La exactitud del método se determinará de acuerdo a la prueba de t de Student. El método será exacto si t calculada < t teórica.

La linealidad del método se determinará tabulando los mg. adicionados contra los mg. recuperados. Calcular el coeficiente de regresión (r), el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). El método se considerará lineal si $r = 0.99$, $r^2 = 0.98$, $m = 1$ y $b = 0$.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Proporcionar una muestra de producto terminado a dos analistas, para que se analice por triplicado y en dos días distintos.

Calcular el coeficiente de variación de los resultados que se obtengan y realizar el análisis de varianza correspondiente para determinar la fuente de variación.

El método se considerará reproducible si el coeficiente de variación es menor a 2%.

ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA

Preparar cuatro muestras de producto terminado; guardar las muestras antes de filtrarlas, 3 de ellas en refrigeración y una a temperatura ambiente.

Analizar las cuatro muestras a las 0, 24 y 48 hrs. de preparadas.

Realizar el análisis estadístico correspondiente (prueba t de Dunnet), para determinar si la muestra analítica es estable o no en dichas condiciones.

3.4- ANALISIS ESTADISTICO

3.4.1- Linearidad del sistema y del método:

Los datos deben describir una línea recta correspondiente a la ecuación $y = mx + b$, donde

n = Número de mediciones.

x = Cantidad adicionada.

y = Cantidad recuperada.

m = Pendiente.

b = Ordenada al origen.

r = Coeficiente de regresión.

r^2 = Coeficiente de determinación.

FORMULAS:

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

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

$$r = \sqrt{\frac{\sum xy}{\sum x^2 + \sum y^2}}$$

$$r^2 = \frac{\Sigma xy}{\Sigma x^2 * \Sigma y^2}$$

3.4.2- PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO.

la exactitud del método se evaluará por medio de la prueba t de Student, donde:

g = Grados de libertad = n - 1.

X = Promedio de % de recobro

s = Desviación estándar de % recobro.

n = Número de datos

$$t \text{ calculada} = \frac{X - 100}{s / \sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza:

"t" = t teórica de la tabla de distribución de t Student, con $\alpha = 0.05$ y los grados de libertad calculados.

$$I.C. (\alpha 0.05) = X \pm \frac{s * t^*}{\sqrt{n}}$$

3.4.3 - REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

La reproducibilidad del método se evaluará mediante el análisis de varianza de los resultados considerando el modelo de dos factores aleatorios (analistas y días).

Tabular los resultados de acuerdo a la siguiente tabla:

| | | ANALISTAS | |
|-------|--|-----------|--------|
| | | I | II |
| | | X1 | X7 |
| DIA 1 | | X2 c1 | X8 c3 |
| | | X3 | X9 |
| | | X4 | X10 |
| DIA 2 | | X5 c2 | X11 c4 |
| | | X6 | X12 |

a = Número de analistas.

d = Número de días.

C = Celda

r = Número de análisis realizados por un analista en un día.

n = Número total de análisis.

a1 = Analista 1

a2 = Analista 2

d1 = Día 1

d2 = Día 2

Cálculos:

Grados de libertad:

$$\text{Analistas: } a-1 = 2-1$$

$$\text{Días: } d-1 = 2-1$$

$$\text{Interacción analista día} = (a-1)(d-1) = 1$$

$$\text{Error residual} = ad(r-1)$$

$$\text{Error total} = adr - 1$$

Total analistas:

$$\Sigma X_{a1} = X_1 + X_2 + \dots + X_6$$

$$\Sigma X_{a2} = X_7 + X_8 + \dots + X_{12}$$

$$\Sigma X = \Sigma X_{a1} + \Sigma X_{a2}$$

Total días:

$$\Sigma X_{d1} = X_1 + X_2 + X_3 + X_7 + X_8 + X_9$$

$$\Sigma X_{d2} = X_4 + X_5 + X_6 + X_{10} + X_{11} + X_{12}$$

Totales de celdas:

$$C_1 = X_1 + X_2 + X_3$$

$$C_2 = X_4 + X_5 + X_6$$

$$C_3 = X_7 + X_8 + X_9$$

$$C_4 = X_{10} + X_{11} + X_{12}$$

Factor de corrección:

$$FC = \frac{(\sum X)^2}{n}$$

Suma de cuadrados de analistas:

$$SCa = \frac{(\sum Xa1)^2}{6} + \frac{(\sum Xa2)^2}{6} - FC$$

Suma de cuadrados de días:

$$SCd = \frac{(\sum Xd1)^2}{6} + \frac{(\sum Xd2)^2}{6} - FC$$

Suma de cuadrados celdas:

$$SCC = \frac{\sum C^2}{6} - FC$$

Suma de cuadrados de interacción analista - días:

$$SCa-d = SCC - SCa - SCd$$

Suma de cuadrados del error total:

$$SCET = \sum X^2 - FC$$

Suma de cuadrados del error residual:

$$SCER = SCET - SCa - SCd - SCa-d$$

Suma de cuadrados medios de analistas:

$$SCMa = \frac{SCa}{a - 1}$$

Suma de cuadrados medios de días:

$$SCMd = \frac{SCd}{d - 1}$$

Suma de cuadrados medios de interacción analistas - días:

$$SCMa-d = \frac{SCa-d}{(a-1)(d-1)}$$

Suma de cuadrados medios error residual:

$$SCMER = \frac{SCER}{(a)(d)(r-1)}$$

Obtener la relación de varianzas (F experimental) dividiendo la suma de cuadrados medios de los analistas, días e interacción analistas días entre la suma de cuadrados medios del error residual.

Tabular los resultados en la tabla ANADEV correspondiente.

3.4.4.- EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Para evaluar la estabilidad de la muestra analítica, se realizará la prueba de t de Dunnet, utilizando el programa SAEVMA para validación de métodos analíticos.

IV - RESULTADOS

4.1- SISTEMA GROMATOGRAFICO

4.1.1- ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Se desarrolló un cromatograma de estándar de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno, a una velocidad de carta de 2cm por minuto. Se calcularon el número de platos teóricos para cada compuesto, los factores de resolución entre amcinonida y butil parabeno y alcohol bencílico y butil parabeno y el factor de asimetría de cada pico de interés. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.1.2- NUMERO DE PLATOS TEORICOS

Amcinonida:

Altura del pico: 4.8 cm.

Ancho del pico 4.48 (w5a) = 19 mm.

Tiempo de retención (seg) = 813.6 seg.

Numero de platos teóricos: 45841.06

Alcohol bencílico:

Altura del pico: 11 cm.

Ancho del pico 4.4% (w5a) = 3 mm.

Tiempo de retención (seg) = 96.6 seg.

Numero de platos teóricos: 25921.0

Butil parabeno:

Altura del pico: 6.2 cm.

Ancho del pico 4.4% (w5a) = 10 mm.

Tiempo de retención (seg) = 333.6 seg.

Numero de platos teóricos: 27822.24

4.1.3- FACTOR DE RESOLUCION (R)

| | ANCHO DE BASE | DISTANCIA DE RETENCION | R |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------|----------|
| ALCOHOL BENCILICO | 3.5 mm | 31 mm | 14.36 |
| BUTIL PARABENO | 7.5 mm | 110 mm | |
| AMCINONIDA | 14 mm | 270 mm | 14.88 |

Cuadro 1.- Factores de resolución entre alcohol bencílico y butil parabeno y amcinonida y butil parabeno.

4.1.4- FACTOR DE ASIMETRIA

| | F | ANCHO DE BASE (5 ϕ) | FACTOR DE ASIMETRIA |
|-------------------|--------|-------------------------------|------------------------|
| ALCOHOL BENCILICO | 1.5 mm | 4.0 mm | 1.3 |
| BUTIL PARABENO | 3.0 mm | 9.0 mm | 1.5 |
| AMCINONIDA | 8.0 mm | 19.0 mm | 1.18 |

Cuadro 2.- Factores de asimetría de alcohol bencílico, butil parabeno y amcinonida.

4.2- ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

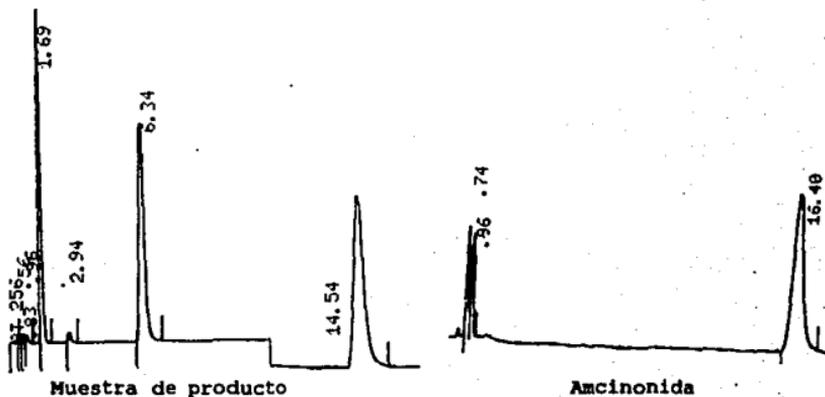
Se analizaron soluciones correspondientes al 100% de amcinonida, alcohol bencilico y butil parabeno por separado, así como muestra de producto terminado y placebo. Se detectaron los picos de interés, y se comprobó que no hay interferencia producida por otros componentes de la muestra.

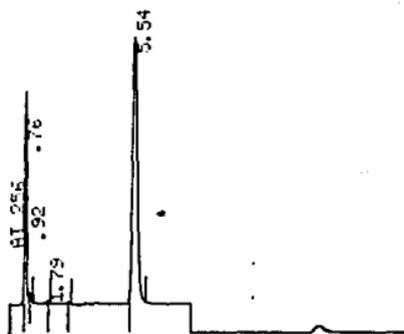
Los tiempos de retención correspondientes a los compuestos de interés son:

ALCOHOL BENCILICO: 1.69 MIN.

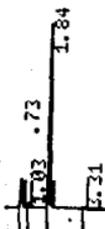
BUTIL PARABENO: 6.34 MIN.

AMCINONIDA: 14.54 MIN.

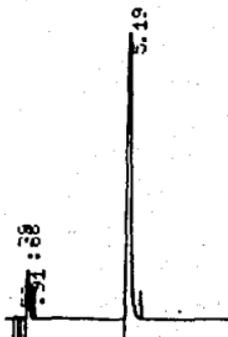




Placebo con butil parabeno



Alcohol bencilico



Butil parabeno

4.3- PRECISION DEL SISTEMA

Se analizó por sextuplicado una solución estándar de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno. Se calculó el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva obtenidas para cada compuesto:

| AMCINONIDA | | ALCOHOL BENCILICO | BUTIL PARABENO |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | 875546 | 1415399 | 2183395 |
| | 890038 | 1442047 | 2231145 |
| | 849098 | 1426893 | 2212047 |
| | 854924 | 1409048 | 2167217 |
| | 869038 | 1411971 | 2185149 |
| | 868523 | 1412035 | 2185532 |
| X | 867861.16 | 1419555.50 | 2194080.83 |
| S | 14643.21 | 12664.71 | 23174.33 |
| C.V. | 1.68% | 0.89% | 1.06% |

Cuadro 3.- Precisión del sistema cromatográfico.

4.4- LINEARIDAD DEL SISTEMA

Se determinó la linealidad del sistema para amcinonida y alcohol bencílico, analizando soluciones correspondientes al 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140%, y 160% de principio activo. Se determinó el coeficiente de regresión y de determinación para cada compuesto, así como el coeficiente de variación del factor (área bajo la curva / concentración). El análisis se realizó por duplicado.

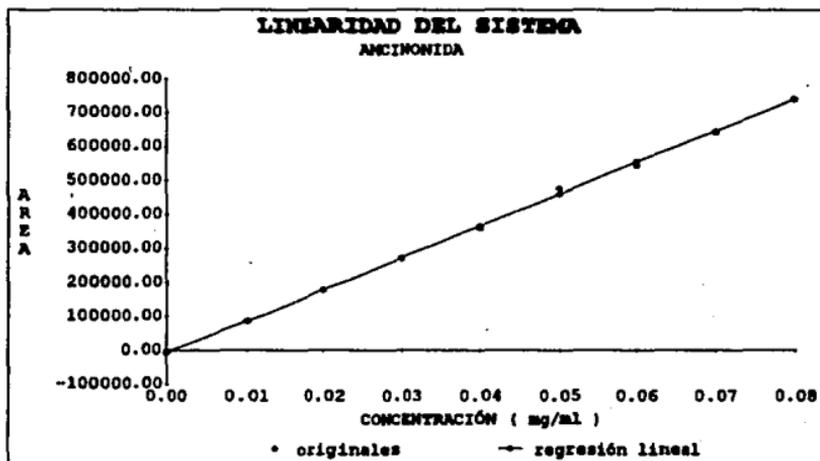
Los resultados obtenidos son los siguientes:

AMCINONIDA

| CONCENTRACION mg/ml | AREA (promedio) | INTERPOLACION |
|------------------------|----------------------|---------------|
| 0.00 | -6761.69 | -6761.69 |
| 0.01 | 87730.00 | 86617.83 |
| 0.02 | 178952.50 | 179997.35 |
| 0.03 | 270716.00 | 273376.89 |
| 0.04 | 361385.00 | 366756.42 |
| 0.05 | 478213.00 | 460135.95 |
| 0.06 | 545303.00 | 556515.48 |
| 0.07 | 642636.00 | 646895.01 |
| 0.08 | 742907.00 | 740274.54 |

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9993
 COEFICIENTE DE DETERMINACION: 0.9987
 ORDENADA AL ORIGEN: -6761.69
 COEFICIENTE DE VARIACION: 2.6%

Cuadro 4.- Linealidad del sistema cromatográfico para determinación de amcinonida.



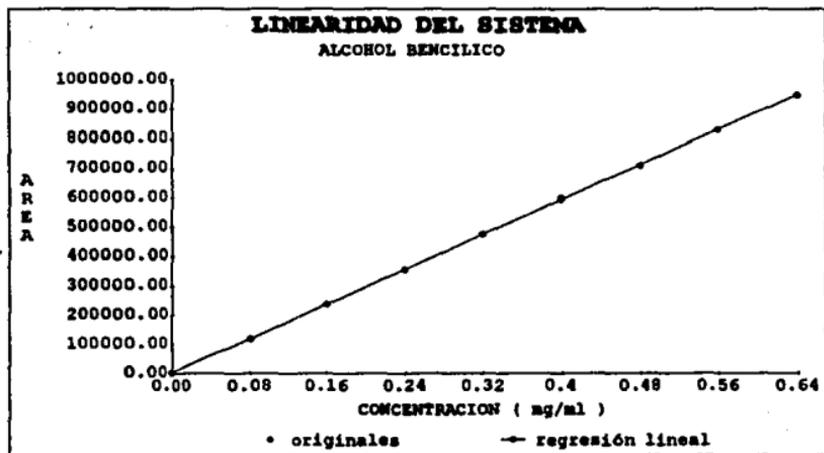
Gráfica 1- Linealidad del sistema para determinación de amcinonida.

ALCOHOL BENCILICO

| CONCENTRACION (mg/ml) | AREA (promedio) | INTERPOLACION |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| 0.00 | 927.16 | 927.16 |
| 0.08 | 117238 | 119340.45 |
| 0.16 | 236632.5 | 237753.75 |
| 0.24 | 354623.5 | 356167.05 |
| 0.32 | 476596 | 474580.35 |
| 0.4 | 602944 | 592993.64 |
| 0.48 | 707122 | 711406.95 |
| 0.56 | 829639 | 829820.24 |
| 0.64 | 945501 | 948233.54 |

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9999
 COEFICIENTE DE DETERMINACION: 0.9998
 ORDENADA AL ORIGEN: 917.16
 COEFICIENTE DE VARIACION: 0.84 %

Cuadro 5.- Linearidad del sistema cromatográfico para determinación de alcohol bencilico.



Gráfica 2- Linearidad del sistema cromatográfico para determinación de alcohol bencilico.

4.5- PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO. AMCINONIDA.

Utilizando el método de placebo añadido, se determinó la precisión y exactitud del método para determinación de amcinonida, utilizando 6 muestras correspondientes a cada concentración estudiada (80%, 100% y 120%). Se calcularon el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para comprobar la precisión del método, y la t de Student para comprobar la exactitud del método. Los resultados obtenidos son los siguientes:

| CONCENTRACION | mg adicionados | mg recuperados | % recobro |
|---------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 80.00% | 8.6 | 8.4615 | 98.39 |
| 80.00% | 8.2 | 8.323 | 101.50 |
| 80.00% | 8.4 | 8.5554 | 101.85 |
| 80.00% | 9.2 | 9.3904 | 102.07 |
| 80.00% | 8.1 | 8.1348 | 100.43 |
| 80.00% | 7.8 | 7.9279 | 101.64 |
| PROMEDIO | 8.3833 | 8.4655 | 100.98 |
| 100.00% | 10.3 | 10.1558 | 98.60 |
| 100.00% | 10.4 | 10.4426 | 100.41 |
| 100.00% | 10.4 | 10.2544 | 98.60 |
| 100.00% | 10.6 | 10.4198 | 98.30 |
| 100.00% | 10.7 | 10.7364 | 100.34 |
| 100.00% | 10.5 | 10.7321 | 102.21 |
| PROMEDIO | 10.4833 | 10.4568 | 99.74 |
| 120.00% | 12.1 | 12.2851 | 101.53 |
| 120.00% | 12.1 | 12.515 | 103.43 |
| 120.00% | 12.1 | 12.0044 | 99.21 |
| 120.00% | 12.3 | 12.3197 | 100.16 |
| 120.00% | 12.2 | 12.3354 | 101.11 |
| 120.00% | 12.2 | 12.5843 | 103.15 |
| PROMEDIO | 12.1666 | 12.34065 | 101.43 |

Cuadro 6.- Exactitud y precisión del método para determinación de amcinonida.

| | | |
|--------------------------|-----------------|------------------------------|
| PROMEDIO % DE RECOBRO | 100.71% | $t = -1.8343$ |
| DESVIACION ESTANDAR | 1.6092 | $"t"_{(\alpha 0.05)} = 2.11$ |
| COEFICIENTE DE VARIACION | 1.5978% | |
| INTERVALO DE CONFIANZA | 99.9% - 101.51% | |

4.6- LINEARIDAD DEL METODO. AMCINONIDA.

Utilizando el método del placebo añadido, se determinó la linealidad del método para determinar amcinonida; se analizaron 6 muestras para cada concentración (80%, 100% y 120%). Se tabularon los promedios de mg recuperados contra mg adicionados. El resultado obtenido fue el siguiente:

| PORCENTAJE | mg ADICIONADOS | mg RECUPERADOS |
|------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 0 | -0.1425 |
| 80% | 8.3833 | 8.4655 |
| 100% | 10.4833 | 10.4568 |
| 120% | 12.1666 | 12.3406 |

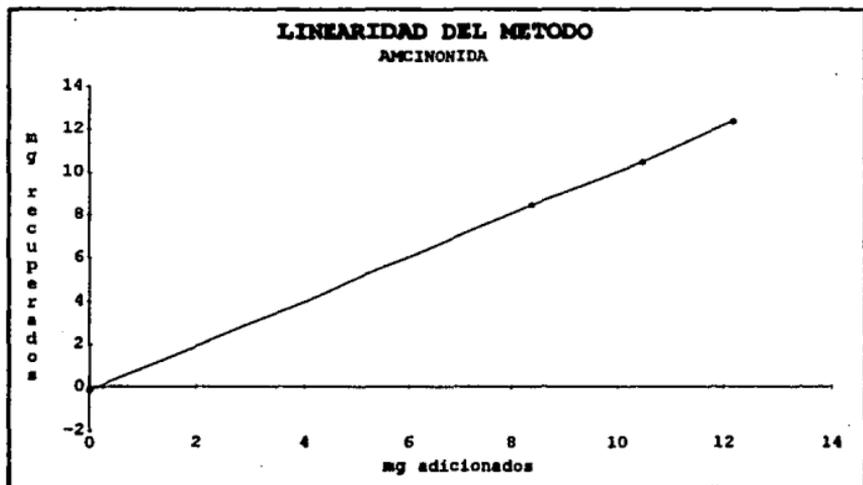
Cuadro 7.- Linealidad del método para determinación de amcinonida.

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.9990

COEFICIENTE DE DETERMINACION: 0.9980

PENDIENTE: 1.0215

ORDENADA AL ORIGEN: -0.1422



Gráfica 3.- Linearidad del método para determinación de amcinonida.

4.7- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. AMCINONIDA.

Se analizó una muestra por triplicado, realizando el análisis dos analistas y en dos días. Se realizó el análisis de varianza. Se obtuvieron los siguientes resultados:

ANALISTAS

| | I | | II |
|-------|-------|--|-------|
| | 95.03 | | 94.99 |
| DIA 1 | 93.75 | | 95.78 |
| | 94.07 | | 96.26 |
| | 97.00 | | 97.07 |
| DIA 2 | 95.43 | | 96.19 |
| | 96.16 | | 95.92 |

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.088

| FUENTE DE VARIACION | GL | SC | SCM | F |
|------------------------------|----|-------|------|-------|
| Analistas | 1 | 1.90 | 1.90 | 2.38 |
| Días | 1 | 5.19 | 5.19 | 11.33 |
| Interacción analistas - días | 1 | 1.06 | 1.06 | 2.32 |
| Error residual | 8 | 3.66 | 0.45 | |
| Error total | 11 | 11.83 | | |
| F TEORICA = 5.85 | | | | |

Cuadro 8.- Análisis de varianza. Reproducibilidad del método para determinación de amcinonida.

Se prepararon 4 muestras de producto, conservándose 3 en refrigeración (REF) y una a temperatura ambiente, analizándose a las 0, 24 y 48 horas de haberse preparado. Se realizó el análisis estadístico de la prueba de t de Dunnett. Los resultados obtenidos son los siguientes:

| HRS | REF | REF | REF | TEMP AMB |
|-------------------------|-------|-------|-----------------------|--------------|
| 0 | 96.56 | 96.98 | 96.94 | 96.17 |
| 24 | 97.45 | 96.30 | 97.06 | 96.27 |
| 48 | 96.84 | 95.41 | 100.22 | 99.32 |
| CONDICION DE ALMACENAJE | | | MEDIA | t DE DUNNETT |
| TIEMPO 0 | | | 96.6625 | |
| 24 HORAS | | | 96.7699 | 0.1135 |
| 48 HORAS | | | 97.9475 | 1.3563 |
| INTERPRETACION: | | | | |
| 24 HORAS | | | La muestra es estable | |
| 48 HORAS | | | La muestra es estable | |

Cuadro 9.- Estabilidad de la muestra analítica. Amcinonida.

4.9- PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO. ALCOHOL
BENCILICO.

Utilizando el método de placebo añadido, se determinó la precisión y exactitud del método para determinación de alcohol bencílico, utilizando 6 muestras correspondientes a cada concentración estudiada (50, 100 y 120). Se calcularon el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para comprobar la precisión del método, y la t de Student para comprobar la exactitud del método. Los resultados obtenidos son los siguientes:

| CONCENTRACION | g adicionados | g recuperados | % recobro |
|---------------|------------------|------------------|--------------|
| 50.00% | 0.1125 | 0.1125 | 100.00 |
| 50.00% | 0.1178 | 0.1175 | 99.74 |
| 50.00% | 0.1124 | 0.1129 | 100.44 |
| 50.00% | 0.101 | 0.1009 | 99.86 |
| 50.00% | 0.1203 | 0.1198 | 99.61 |
| 50.00% | 0.1115 | 0.112 | 100.48 |
| PROMEDIO | 0.1125 | 0.1126 | 100.02 |
| 100.00% | 0.2045 | 0.2031 | 99.30 |
| 100.00% | 0.2007 | 0.1995 | 99.42 |
| 100.00% | 0.193 | 0.1905 | 98.73 |
| 100.00% | 0.1989 | 0.1959 | 98.51 |
| 100.00% | 0.1924 | 0.1911 | 99.35 |
| 100.00% | 0.2058 | 0.2041 | 99.15 |
| PROMEDIO | 0.1992 | 0.1973 | 99.08 |
| 150.00% | 0.3221 | 0.319 | 99.05 |
| 150.00% | 0.303 | 0.3013 | 99.43 |
| 150.00% | 0.3071 | 0.3062 | 99.70 |
| 150.00% | 0.3139 | 0.3158 | 100.62 |
| 150.00% | 0.3095 | 0.3109 | 100.44 |
| 150.00% | 0.3061 | 0.3072 | 100.36 |
| PROMEDIO | 0.3102 | 0.3100 | 99.93 |

Cuadro 10.- Exactitud y precisión del método para determinación de alcohol bencílico.

PROMEDIO % DE RECOBRO 99.67% t = 1.9988
 DESVIACION ESTANDAR 0.6239 t (α = 0.05) = 2.11
 COEFICIENTE DE VARIACION. 0.6259
 INTERVALO DE CONFIANZA. 99.36% - 99.98%

4.10- LINEARIDAD DEL METODO. ALCOHOL BENCILICO.

Utilizando el método del placebo añadido, se determinó la linealidad del método para determinar alcohol bencílico; se utilizaron 6 muestras para cada concentración (50%, 100% y 150%). Se tabularon los promedios de g recuperados contra g adicionados. El resultado obtenido fue el siguiente:

| PORCENTAJE | g ADICIONADOS | g RECUPERADOS |
|------------|------------------|------------------|
| 0 | 0 | -0.0006 |
| 50% | 0.1126 | 0.1126 |
| 100% | 0.1992 | 0.1974 |
| 120% | 0.3103 | 0.3101 |

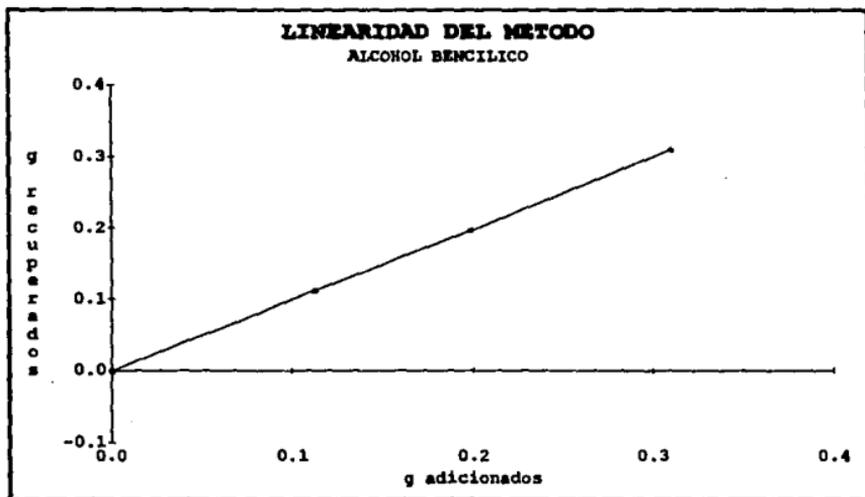
Cuadro 11.- Linealidad del método para determinación de alcohol bencílico.

COEFICIENTE DE CORRELACION: 0.99995

COEFICIENTE DE DETERMINACION: 0.99990

PENDIENTE: 0.9997

ORDENADA AL ORIGEN: -0.0006



gráfica 4.- Linearidad del método para determinación de alcohol bencílico.

4.11- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. ALCOHOL BENCILICO

Se analizó una muestra por triplicado, realizando el análisis dos analistas y en dos días. Se realizó el análisis de varianza. Se obtuvieron los siguientes resultados:

ANALISTAS

| | I | II |
|-------|--------|--------|
| | 105.43 | 106.98 |
| DIA 1 | 104.27 | 107.46 |
| | 104.58 | 103.79 |
| | 108.78 | 107.22 |
| DIA 2 | 108.20 | 106.79 |
| | 109.56 | 106.74 |

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.69%

| FUENTE DE VARIACION | GL | SC | SCM | F |
|------------------------------|----|-------|-------|-------|
| Analistas | 1 | 0.28 | 0.28 | 0.23 |
| Días | 1 | 18.20 | 18.20 | 14.92 |
| Interacción analistas - días | 1 | 7.90 | 7.90 | 6.97 |
| Error residual | 8 | 9.76 | 1.22 | |
| Error total | 11 | 36.14 | | |
| F TEORICA = 5.85 | | | | |

Cuadro 12.- Análisis de varianza. Reproducibilidad del método para dterminación de alcohol bencílico.

4.12- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA. ALCOHOL
BENCILICO.

Se prepararon 4 muestras de producto, conservándose 3 en refrigeración y una a temperatura ambiente, analizándose a las 0, 24 y 48 horas de haberse preparado. Se realizó el análisis estadístico de la prueba t de Dunnet. Los resultados obtenidos son los siguientes:

| HRS | REF | REF | REF | TEMP AMB |
|-------------------------|--------|--------|-----------------------|-------------|
| 0 | 108.12 | 107.03 | 109.40 | 108.39 |
| 24 | 106.50 | 106.93 | 109.34 | 109.24 |
| 48 | 109.07 | 108.75 | 106.67 | 109.36 |
| CONDICION DE ALMACENAJE | | | MEDIA | t DE DUNNET |
| TIEMPO 0 | | | 108.2350 | |
| 24 HORAS | | | 108.0025 | -0.2632 |
| 48 HORAS | | | 108.4625 | 0.2575 |
| INTERPRETACION: | | | | |
| 24 HORAS | | | La muestra es estable | |
| 48 HORAS | | | La muestra es estable | |

Cuadro 13.- Estabilidad de la muestra analítica. Alcohol bencílico.

4.13- ANALISIS DE RESULTADOS

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que el sistema cromatográfico es adecuado. Para los tres compuestos de interés, se obtuvo un número de platos teóricos muy alto, lo cual indica que la eficiencia de la columna es buena. Los factores de resolución obtenidos indican que la separación de los compuestos es adecuada. El factor de asimetría de los picos indica una deformación en los mismos, sin embargo, considerando que el valor ideal es de 1, la asimetría es muy ligera, y no produce mayor efecto en el resultado del análisis.

ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

El sistema cromatográfico es específico para determinar amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno, ya que ni en la muestra ni en el placebo se presentaron picos correspondientes a otros compuestos que pudieran interferir con los de los compuestos de interés.

PRECISION DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

De acuerdo a los resultados obtenidos, y tomando en cuenta que los coeficientes de variación son menores de 2%, se considera que el sistema cromatográfico es preciso para la

cuantificación del área bajo la curva de amcinonida, alcohol bencílico y butil parabeno.

LINEARIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

Según los resultados obtenidos, se puede considerar que el sistema se comporta linealmente al cuantificar amcinonida y alcohol bencílico, ya que los coeficientes de correlación y de determinación son mayores de 0.99. También se observa en las gráficas el comportamiento lineal del sistema y se puede ver que la ordenada al origen es muy cercana a 0, lo cual indica una relación directa entre la cantidad de principio activo y el área bajo la curva detectada por el sistema.

PRECISION DEL METODO:

Amcinonida: De acuerdo a los resultados obtenidos, el método es preciso, ya que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor de 2%, el promedio es de 100.71% y el intervalo de confianza es de 99.9 a 101.51%.

Alcohol bencílico: De acuerdo a los resultados obtenidos, el método es preciso, ya que el promedio es de 99.67% y el coeficiente de variación es de 0.62%. El intervalo de confianza es de 99.36% a 99.98%.

EXACTITUD DEL METODO.

Aminonida: De acuerdo al resultado obtenido, el método se considera exacto, ya que la t de Student obtenida (-1.83) es menor que el valor teórico (2.11).

Alcohol bencílico: De acuerdo al resultado obtenido, se considera que el método es exacto, ya que la t experimental (1.99) es menor que la t teórica (2.11).

LINEARIDAD DEL METODO

Aminonida y alcohol bencílico: De acuerdo a los resultados, se observa que el método es lineal, ya que los coeficientes de regresión y de determinación son mayores que 0.99, la pendiente es muy cercana a 1, la ordenada al origen es cercana a 0 y al graficar mg recuperados contra mg adicionados se obtiene una línea recta. En el caso de la aminonida, debido a que al utilizar concentraciones de 50%, 100% y 150% se encontró mayor variabilidad en los resultados, el estudio se realizó con concentraciones de 80%, 100% y 120%, considerando que los límites aceptables en control rutinario de producto terminado se encuentran dentro de este rango.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

Aminonida: De acuerdo a los resultados obtenidos, el coeficiente de variación es de 1.08%, por lo cual el método es

reproducibile, ya que el requisito mínimo indispensable es que sea menor al 2%.

Alcohol bencílico: De acuerdo a los resultados obtenidos, el coeficiente de variación es de 1.69%, con lo cual la reproducibilidad del método es aceptable.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

Aminonida y alcohol bencílico: De acuerdo a los resultados obtenidos y al análisis estadístico realizado (prueba de t de Dunnett), se considera que las muestras son estables hasta 48 horas después de su preparación, conservandose de preferencia en refrigeración.

VI- CONCLUSIONES

La validación de métodos analíticos actualmente es indispensable, debido a que el control de calidad en los productos farmacéuticos es cada vez más estricto y requiere de métodos más eficientes.

El método analítico validado resultó específico, lineal, preciso, exacto y reproducible; igualmente se encontró que el sistema cromatográfico utilizado es adecuado, preciso y lineal para la determinación de los principios activos de interés.

El método analítico para determinación de amcinonida y alcohol bencílico en crema cumple con todos los requisitos mínimos que exige la Secretaría de Salud para considerarse como válido, siempre y cuando se realice de acuerdo a las especificaciones establecidas por este trabajo.

El método analítico validado es adecuado para el control de calidad rutinario del producto, lo cual permite la determinación de los principios activos de interés en un menor tiempo y a menor costo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- 1.- F.BAYLEY; "APLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY". Journal of Cromatography . 122: 73-84. 1976
- 2.- BOLAÑOS RAMIREZ, C. " VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA ESPIRONOLACTONA Y FUROSEMIDA EN CAPSULAS DE GELATINA DURA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION ". Tesis. U.N.A.M. México. 1992.
- 3.- G.T. CARTER, et. al.; " PEAK HOMOGENEITY DETERMINATION FOR DE VALIDATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHIC ASSAY METHODS ". Journal of Pharmaceutical Sciences . 71, No.3: 317 -321. 1982.
- 4.- CASTAÑEDA, PEDRO, IBQ, et. al. " GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS ". Comite de Elaboración de Guías oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. S.S.A. México. 1991.
- 5.- DÍPALMA, JOSEPH R. " BASIC PHARMACOLOGY IN MEDICINE ". Second Edition. Mc. Graw Hill Book Company. U.S.A. 1982.
- 6.- F. ERNI; " USE OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY ". Journal of Cromatography . 507: 141 - 149. 1990.

- 7.- H. FABRE, et. al.; " VALIDATION D' UNE MÉTHODE DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ". Analisis . 13, n.3: 117 - 123. 1985.
- 8.- GASTELUM M.; PEYRET R. " INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION ". Laboratorio de Control de Calidad, Cyanamid de México. México D.F.; México. Memorias. 1992.
- 9.- GOODMAN GUILMAN A; RALL T; et. al. " THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF TERAPEUTICS ". 8th. Edition. Pergamo Press. U.S.A. 1990.
- 10.- GUERRA, J.; " VALIDATION OF ANALITICAL METHODS BY FDA LABORATORIES ". Pharmaceutical Technology, march 1986. 74 - 85.
- 11.- INMAN, L. EUGENE, et. al.;" GENERAL METHOD VALIDATION GUIDELINES FOR PHARMACEUTICAL SAMPLES ". Journal of Chromatographic Science. 25: 252 -256. 1987.
- 12.- INMAN, L. EUGENE, et. al.; " CHROMATOGRAPHIC DETECTION LIMITS IN PHARMACEUTICAL METHOD DEVELOPMENT ". Journal of Chromatography. 477: 1 - 12. 1988.
- 13.- MARTIN-SMITH, MICHAEL, et. al.; " VALIDATION OF ANALYTICAL METOHDS ". Analytical Proceedings. 25: 154 - 155. 1988.

- 14.- Merck & Co. Inc. " THE MERCK INDEX ". 11 Edition. 1989.
- 15.- MILLER, C. JANE, et. al. " BASIC STATISTICAL METHODS FOR ANALYTICAL CHEMISTRY. PART 1. STATISTICS OF REPEATED MEASUREMENTS ". Analyst. 113: 1351 - 1356. 1988.
- 16.- THE PHILADELPHIA COLLEGE OF PHARMACY AND SCIENCE. "REMINGTON FARMACIA ". 17. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1987 .
- 17.- ROSENSTEIN, EMILIO. " DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEÚTICAS PLM ". Editorial PLM, S.A. de C.V. 38a. edición. México, 1992 .
- 18.- RAVINDRANATH, B. " PRINCIPLES AND PRACTICE OF CROMATOGRAPHY ". Edited by Ellis Horwood Limited. England. 1989.
- 19.- de RUIG, G. WILLEM, et. al.; " METOHD EVALUATION. CRITERIA FOR THE DETECTION OF ANALYTES IN TEST SAMPLES ". J. Assoc. off Anal. Chem. 72, No. 3: 487 - 490. 1989.
- 20.- SCHENK, JORGE H.; HANH, B, RICHARD. et. al. " QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA ". 1a. edición. C.E.C.S.A. México. 1984.
- 21.- SZEPESEI, G., Et. Al.; " SELECTION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHODS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS.

- 111- METHOD EVALUATION ". Journal of Chromatography, **464**:
265 - 278. 1989.
- 22.- TAYLOR, K. JOHN; " VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS ".
Analytical Chemistry. **55** No. 6: 600A - 608A. 1983.
- 23.- TYMES, N.W.; " THE DETERMINATION OF CORTICOIDS AND RELATED
STERIODS ANALOGS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATO-
GRAPHY ". Journal of Chromatographic Science. **15**: 151 -
155. 1977.
- 24.- U.S. Pharmacopeial Convention Inc. " THE UNITED STATES
PHARMACOPEIA ". XXII Edition. U.S.A. 1991 .
- 25.- WAYNE W. DANIEL. " BIOESTADISTICA. BASE PARA EL ANALISIS
DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD ". 3a. Edición. Ed. LIMUSA.
México 1989 .
- 26.- WILLIAMS A., PATRICIA, et. al. " HIGH PERFORMANCE LIQUID
CROMATOGRAPHY OF CORTICOSTEROIDS IN TOPICAL
PHARMACEUTICALS ". Journal of Pharmaceutical Sciences. **70**,
No. 5: 530 - 534. 1981.