



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA
CUANTIFICAR ACETATO DE PARAMETASONA EN
TABLETAS Y SUSPENSION, POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ALMA SERRANO BARAJAS



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

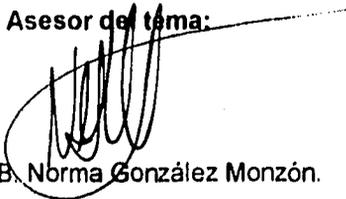
Jurado asignado:

Presidente: Prof. Isaura Luisa Carrera García.
Vocal: Prof. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez.
Secretario: Prof. Norma Trinidad González Monzón.
1er. Suplente: Prof. Ma. Teresa Buentello Rodríguez.
2do. Suplente: Prof. Georgina Margarita Maya Ruiz.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorios Syntex. S.A. de C.V. División Farmacéutica.
Departamento de Investigación y Desarrollo.
Laboratorio de Desarrollo Analítico.

Asesor del tema:



Q.F.B. Norma González Monzón.

Supervisor técnico:



Q.F.B. Pedro Alonso Albarrán.

Sustentante:



Alma Serrano Barajas.

Dedicatorias

A Dios

Por permitirme vivir y ser feliz.

A mis padres

A quienes debo todo en la vida.

A mi mamá:

*Porque con nada puedo
recompensar toda una vida
llena de lucha, sacrificios,
trabajo y entrega a
nosotras.*

A mi papá:

*Por su ejemplo de estudio,
trabajo y honestidad.*

A mis hermanos:

*Porque su presencia es
insustituible en mi vida.*

A Lily:

*Por demostrar día a
día el significado de la
amistad.*

A Rosalba, Carlos, Manuel y Alicia por los momentos compartidos en la Facultad y aún después.

Agradecimientos

Con un profundo y sincero agradecimiento a Pedro Alonso A por darme la oportunidad de ser parte de su equipo, por toda la paciencia, la ayuda, la orientación y las facilidades otorgadas para desarrollar este trabajo. Por el apoyo brindado en todo momento y sobretodo por creer en mí y contribuir a mi formación como profesionalista.

A la profesora Norma González M por aceptar ser parte de esta tesis. Por el interés y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus comentarios y sugerencias para hacerlo aún mejor.

A todas y cada uno de los integrantes del Departamento de Desarrollo Analítico por su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	2
III. GENERALIDADES	3
III.1 Cromatografía	3
III.2 Validación de métodos analíticos	29
III.3 Corticoesteroides	42
III.4 Monografía de Acetato de Parametasona	51
IV. PARTE EXPERIMENTAL	59
A. Desarrollo del método	60
B. Descripción del método	64
C. Validación del método	76

V. RESULTADOS	89
VI. DISCUSION DE RESULTADOS	141
VII. CONCLUSIONES	147
VIII. BIBLIOGRAFIA	149
IX. ANEXOS	157

I. INTRODUCCION

La importancia de la calidad de los medicamentos es un tema que no se pone a discusión. En general, la situación actual del control de calidad de los medicamentos puede considerarse satisfactoria ya que se dispone de varias herramientas del control y del aseguramiento de la calidad, tales como la validación de métodos analíticos, programas de calibración de instrumentos, auditorías de calidad y capacitación de personal, entre otras, que permiten la obtención de resultados confiables durante el análisis de medicamentos. Sin embargo, siempre es posible mejorar y facilitar dicho control a través de las Buenas Prácticas de Manufactura y de las verificaciones analíticas de los procedimientos involucrados en la manufactura del producto.

En lo que a verificaciones analíticas se refiere, la metodología empleada para controlar procesos y productos ha venido avanzando a grandes pasos científica y tecnológicamente. A pesar de esto, no debe olvidarse que un resultado analítico sólo nos acerca al valor verdadero. Hasta el momento, no es posible aún tener la certeza plena de que el resultado obtenido es la verdad absoluta. Por esta razón, una validación adecuada de la metodología permite conocer sobre qué margen de error se está trabajando y "controlar" dicho error.

Así como se entiende y se acepta que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos deben ser probados y controlados para asegurar la calidad final, de la misma manera, dentro del aseguramiento de la calidad en el laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos, constituyen el proceso que debe ser controlado para asegurar la calidad de los resultados, lo cual se logra a través de la validación.

La validación de métodos analíticos verifica que la metodología propuesta, esté basada en principios científicos adecuados y que cumpla con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizada.

Como consecuencia, la validación de métodos analíticos permite asegurar la aceptación y utilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

En el presente trabajo, se describe el desarrollo y principalmente la validación de un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta presión, para cuantificar, durante estudios de estabilidad, Acetato de Parametasona, un fármaco de naturaleza esteroide con propiedades antiinflamatorias, formulado en dos presentaciones farmacéuticas, tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL.

II. OBJETIVO

- Desarrollar un método indicador de estabilidad de Acetato de Parametasona formulado en dos presentaciones farmacéuticas, tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL, utilizando cromatografía de líquidos de alta presión en fase inversa.
- Validar el método desarrollado, demostrando su aplicación en estudios de estabilidad de Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL.

III. GENERALIDADES

III.1 CROMATOGRAFIA

III.1.1 DESARROLLO HISTORICO.

La cromatografía tuvo sus inicios en 1850 con la separación de anilinas realizada por F. F. Runge¹. En el proceso utilizó papel filtro y un disolvente para lograr la separación de varios colorantes.

En 1905, Ramsey² utilizó técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente, el botánico ruso Tswett^{2,3} empleó la cromatografía de elución para la separación de extractos vegetales. A este proceso lo denominó separación de tintas, de ahí el origen de la palabra cromatografía que, literalmente, significa escritura de color. Esta técnica permaneció ignorada hasta 1930 cuando el sueco Tiselius² y sus colaboradores introdujeron dos técnicas de elución, el análisis frontal y el análisis por desplazamiento.

En 1941, Martin y Synge^{1,2} sugirieron la posibilidad de utilizar un gas como fase móvil. En ese mismo año, introdujeron la cromatografía de reparto, técnica que evolucionó llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel.

En 1952, Martin y James^{1,2} fueron los primeros en describir un cromatógrafo de gases, técnica analítica que a la postre se ha convertido en una de las más útiles para el análisis de gases y compuestos

orgánicos volátiles. Sin embargo, el verdadero potencial de la cromatografía de gases se logró hasta 1954 cuando Ray¹ describe el primer cromatograma.

Fue hasta 1967-1969 cuando se produjeron avances considerables en la cromatografía de líquidos, los dos más relevantes fueron: introducción de altas presiones y el desarrollo de sistemas de detección continua. Otro suceso de importancia fue la descripción del primer cromatograma para cromatografía de líquidos de alta presión realizado por Kirkland, Huber, Preiss y Lispk³.

A partir de entonces, esta técnica ha evolucionado rápidamente dentro del campo farmacéutico, debido a la versatilidad de su aplicación, al aumento considerable de instrumentos para realizarla y a la gran cantidad de publicaciones que aparece día a día. En la actualidad la cromatografía de líquidos de alta presión constituye una herramienta indispensable en el área de control de calidad, desarrollo farmacéutico, control de procesos y química clínica⁴.

III.1.2 DEFINICION^{2,6}.

La cromatografía es una técnica que permite la separación e identificación de los componentes de una mezcla de compuestos. La separación es el resultado de un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria.

Es conveniente señalar que la cromatografía es en esencia una técnica de separación no de identificación, sin embargo, cuando se encuentra acoplada a un sistema de detección puede ser utilizada para identificar los componentes separados en la columna. La identificación requiere del empleo de una sustancia de referencia. Cuando un componente de la muestra, presenta el mismo tiempo de retención de la sustancia de referencia, bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación positiva es muy alta ⁵.

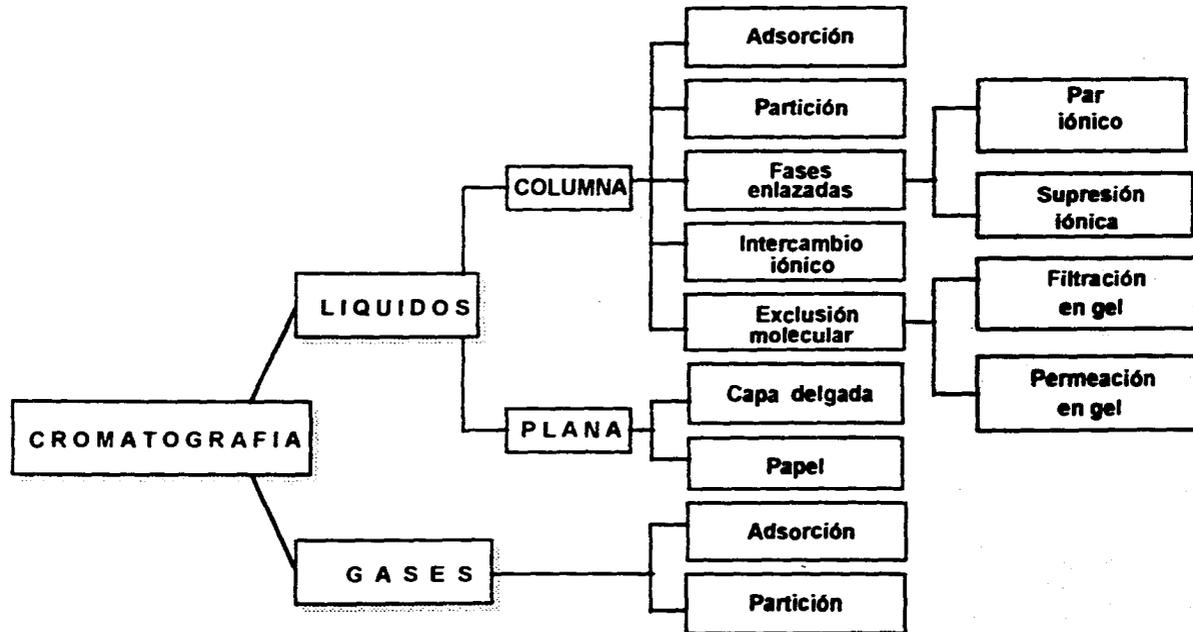
La gran importancia que los métodos cromatográficos han cobrado en la actualidad proviene fundamentalmente de su velocidad de análisis y de la posibilidad de trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra. Por otra parte, se dispone de métodos cromatográficos económicos y de gran simplicidad en su empleo como la cromatografía en capa delgada y la cromatografía en papel, mientras que otros permiten la automatización casi completa en separaciones de rutina con un equipo más complejo, como es el caso de la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta presión ⁴.

III.1.3. CLASIFICACION ^{2,5}.

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía, tal como se indica en la figura 1.

FIGURA 1.

CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA.



A continuación, se describen brevemente los mecanismos de separación y algunas de las aplicaciones de los diferentes tipos de cromatografía de líquidos en columna, por ser la técnica utilizada en la realización de este trabajo.

III.1.3.1 Cromatografía líquido - sólido o de adsorción.

El mecanismo de separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido ². Algunos de los sólidos utilizados con más frecuencia son alúmina y sílica gel.

Este tipo de cromatografía líquida tiene un campo de aplicación muy extenso, comprende la mayoría de los compuestos orgánicos de peso molecular intermedio (220 - 1000) no iónicos. Se puede aplicar a la separación de compuestos de estructura similar pero que posean diferentes grupos funcionales en la molécula, series homólogas e incluso cierto tipo de isómeros de posición ⁴.

Generalmente, la cromatografía líquido - sólido es utilizada en fase normal.

III.1.3.2 Cromatografía líquido - líquido o de partición.

Originalmente se dió el nombre de cromatografía de partición al proceso cromatográfico presente sobre una fase estacionaria líquida impregnada en un soporte, idealmente inerte y una fase móvil constituida por otro líquido inmiscible al primero. El proceso de equilibrio es prácticamente idéntico al de la extracción líquido - líquido ⁵.

La cromatografía de partición puede llevarse a cabo en fase normal o en fase inversa.

III.1.3.3 Cromatografía de fases enlazadas.

El desarrollo espectacular que tuvo la cromatografía de líquidos de alta presión en la década de los setentas condujo a la síntesis de las llamadas "fases estacionarias químicamente unidas", en las cuales la fase estacionaria en lugar de ser impregnada sobre el soporte se encuentra unida químicamente a él por ligaduras covalentes. Estas fases se clasificaron originalmente dentro de la cromatografía de partición, tienen la ventaja de ser más estables que el líquido impregnado, su utilización es más simple y se obtienen eficiencias mayores, por estas razones, han desplazado casi completamente a la cromatografía de partición sobre fases impregnadas ⁶.

La sílica es un sustrato reactivo que puede ser enlazado a diversos grupos funcionales, los más frecuentemente enlazados a ella son cadenas hidrocarbonadas C₈ - C₁₈, grupos fenilo, ciano y amino. La fase enlazada más utilizada es el soporte octadecilsiloxi conocido también como fase C₁₈ ó fase ODS ⁷.

Las fases enlazadas pueden ser utilizadas en fase normal o en fase inversa.

Bajo cualquiera de sus formas, la retención y separación de los compuestos por cromatografía de reparto se basa en las diferentes interacciones a las cuales se encuentran sometidos los solutos en el seno de la fase móvil y en el de la fase estacionaria, es decir, depende de las diferencias de "solubilidad" de los solutos entre las dos fases ⁴.

En general, los compuestos polares y medianamente polares se separan por cromatografía de partición en fase normal, las fases enlazadas por grupos cianopropil y aminopropil son comunes por este uso. Los compuestos menos polares se separan por cromatografía de partición en fase inversa y en este caso, las fases enlazadas por grupos C₁₈, C₈ y fenilo son las más utilizadas⁷.

Como resultado de su gran versatilidad, las fases químicamente unidas han sido responsables del gran crecimiento de la cromatografía de líquidos en los últimos años. Actualmente, las fases enlazadas son el empaque más popular en este tipo de cromatografía debido a que la mayoría de los componentes son solubles en fases móviles constituidas por mezclas acuosas - orgánicas y pueden ser separados en fase inversa. Se ha estimado que entre el 60% y 90% de todas las separaciones en cromatografía de líquidos se realiza sobre fases enlazadas en la modalidad de fase inversa. La razón de esta popularidad se debe, entre otras, a las siguientes ventajas⁴:

- * Reproducibilidad de las separaciones.
- * Estabilidad de la columna, si se trabaja entre pH 3 - 7.
- * Fácil acceso de los disolventes utilizados como fase móvil, los cuales pueden ser obtenidos con un alto grado de pureza.
- * Rápido equilibrio de los disolventes en la columna.
- * Disponibilidad de una gran versatilidad de fases estacionarias.

III.1.3.4 Cromatografía de intercambio iónico.

La separación se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones ².

El intercambio iónico involucra la sustitución de una especie iónica por otra. Algunos de los empaques tienen grupos cargados negativamente y se utilizan para el intercambio de especies catiónicas. Otros, diseñados para intercambiar especies aniónicas, están provistos de grupos cargados positivamente. Los grupos funcionales utilizados comúnmente son los de tipo sulfonato para intercambio catiónico y los de tipo amina cuaternaria para el intercambio aniónico ⁸.

El campo principal de aplicación de la cromatografía de intercambio iónico es el área de la Bioquímica. En efecto, una gran cantidad de productos biológicos son sensibles a la temperatura y no pueden analizarse directamente por cromatografía de gases. Estos productos son generalmente solubles en agua o ionizables a un pH adecuado, por lo que su separación por cromatografía de intercambio iónico es la indicada ⁴.

III.1.3.5 Cromatografía de par iónico ⁸.

La cromatografía de pares de iones, puede considerarse un subconjunto de la cromatografía de fase inversa, en ella se trabaja con especies ionizadas o ionizables en columnas de fase inversa.

En cromatografía de pares de iones se añade a la fase móvil un reactivo de par iónico en una concentración baja. El reactivo de par iónico se

encuentra ionizado por sí mismo. Un ion del reactivo se retiene en la fase estacionaria, normalmente neutra, proporcionándole su carga. Esta fase estacionaria cargada puede entonces retener y separar solutos de iones orgánicos de carga opuesta, formándose complejos de par iónico reversibles con la muestra ionizada. Así, con un contraión adecuado, los compuestos iónicos o ionizables pueden convertirse en compuestos eléctricamente neutros que pueden repartirse entre las fases móvil y estacionaria no polar. Al mismo tiempo, la fase estacionaria no habrá perdido su habilidad para retener y separar sustancias orgánicas no ionizadas.

III.1.3.6 Cromatografía de supresión iónica⁷.

Este tipo de cromatografía es también un subconjunto de la cromatografía de fase inversa.

Una solución amortiguadora puede ser adicionada a la fase móvil para ajustar el pH de tal manera que suprima la ionización de algunos de los componentes ionizables de la muestra, de esta forma, se permite la separación por cromatografía de fase inversa mucho más fácilmente que por la cromatografía de intercambio iónico tradicional.

III.1.3.7 Cromatografía de exclusión molecular⁷.

La cromatografía de exclusión se basa en la retención selectiva de las moléculas de los solutos en función de su tamaño molecular, debido a la mayor o menor penetración o incluso a la exclusión de dichas moléculas de los poros de una fase estacionaria apropiada, así, las moléculas que son demasiado grandes para el poro migran rápidamente mientras que

las que son pequeñas penetran en los poros prolongando su tiempo de elución.

La cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de permeación en gel son frecuentemente referidas como cromatografía de exclusión molecular. La primera de estas técnicas utiliza un disolvente acuoso como fase móvil y es empleada para separar péptidos y proteínas. Por otra parte, la cromatografía de permeación en gel utiliza un disolvente orgánico como fase móvil y generalmente es aplicada a la caracterización y determinación de la distribución de pesos moleculares de polímeros sintéticos.

III.1.4 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION (CLAP) ⁵.

Esta técnica es conocida también como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia o Cromatografía Líquida Moderna.

El éxito de la aplicación de la CLAP para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir, del tipo y dimensiones de la columna, de la composición y velocidad de la fase móvil, etc.

VENTAJAS Y LIMITACIONES SOBRE OTRAS TECNICAS ANALITICAS ^{2,6}.

La cromatografía líquida de alta presión presenta una serie de ventajas que la han llevado a ser una de las técnicas más utilizadas hoy en día, sin embargo, al igual que toda técnica analítica muestra también

limitaciones. En la tabla 1, se señalan algunas de las ventajas y limitaciones de esta técnica cromatográfica.

TABLA 1. Ventajas y limitaciones de la cromatografía de líquidos de alta presión sobre otras técnicas analíticas.

VENTAJAS	LIMITACIONES
<ul style="list-style-type: none"> - Velocidad de análisis. - Alta resolución. - Resultados cuantitativos. - Alta sensibilidad. - Automatización. - Amplio espectro de aplicación. 	<ul style="list-style-type: none"> - La fase móvil debe disolver la muestra. - Instrumentación costosa. - No existe detector universal y sensible. - Elevado costo de operación. - Grado de especialidad mayor.

EL PROCESO DE SEPARACION CROMATOGRAFICO ⁶.

La cromatografía de líquidos de alta presión es una técnica de separación basada en la distribución de los compuestos de una muestra entre dos fases, una estacionaria con gran área de superficie y otra móvil de naturaleza líquida que fluye a través de la fase estacionaria. Cuando la mezcla de compuestos es adicionada a la fase móvil, cada uno de ellos establece equilibrios entre ambas fases reteniéndose selectivamente en la fase estacionaria. Esto origina que el grado de movimiento de cada compuesto sea diferente, como resultado, los componentes de la mezcla son separados.

Existen dos factores que determinan la eficiencia de la separación de los compuestos: la migración diferencial y la dispersión molecular.

Migración diferencial.

La migración diferencial es originada por las diferencias en las velocidades de migración de diferentes compuestos a través de la columna. La migración diferencial es función del equilibrio de distribución de cada uno de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria, por lo tanto, está determinada por todas aquellas variables que afectan el equilibrio de distribución: la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación. Cuando se quiere alterar la migración diferencial, basta alterar una de estas tres variables.

La migración diferencial es la base de la separación cromatográfica, sin una diferencia en velocidades de migración para dos compuestos, no es posible efectuar ninguna separación.

Dispersión molecular.

La segunda consideración para la separación cromatográfica es la dispersión de las moléculas a lo largo de la columna. Esta dispersión es causada por los siguientes procesos físicos:

- a. **Difusión de Eddy.** Es originada por los diferentes flujos microscópicos que la fase móvil sigue entre las partículas empacadas en la columna. En consecuencia, las moléculas de la muestra toman diferentes caminos entre el empaque. La difusión

aumenta progresivamente a medida que la fase móvil atraviesa la columna.

- b. Transferencia de masa en la fase móvil.** Este proceso físico se da por diferencias originadas en el flujo al pasar la fase móvil entre dos partículas vecinas. La fase móvil adyacente a las partículas se mueve lentamente, en consecuencia, las moléculas cercanas a las partículas de fase estacionaria se desplazan a distancias cortas, mientras que las moléculas en el centro del flujo lo hacen a una mayor distancia.

- c. Transferencia de masa en la fase móvil estancada.** Se denomina fase móvil estancada aquella contenida en los poros de las partículas que forman el empaque de la columna, debido a que se encuentra prácticamente sin movimiento. La transferencia de masa en la fase móvil estancada se presenta debido a la interacción de dichos poros con las moléculas de la muestra. Éstas se mueven por difusión hacia adentro y afuera del poro, las primeras moléculas difunden una gran distancia dentro del poro y cuando retornan a la fase móvil lo hacen lentamente trasladándose una cierta distancia dentro de la columna, las moléculas que difunden posteriormente dentro del poro emplean menor tiempo dentro de él al encontrarlo saturado, por consiguiente, retornan rápidamente a la fase móvil teniendo un desplazamiento diferente.

- d. Transferencia de masa en la fase estacionaria.** Este fenómeno se presenta debido a las interacciones entre las moléculas contenidas en el poro y la fase estacionaria. Cuando las

interacciones son muy fuertes, las moléculas son retenidas durante mayor tiempo, retornando lentamente a la fase móvil, de tal manera que viajarán una distancia corta en la columna. En contraste, las moléculas que interaccionan en menor grado alcanzarán una distancia mayor.

FASE NORMAL Y FASE INVERSA ⁷.

La cromatografía de líquidos puede ser llevada a cabo en dos formas, de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y a la de la fase estacionaria involucradas en la separación: en fase normal y en fase inversa.

En la cromatografía de líquidos en fase normal, la retención depende de las interacciones entre la parte polar de la fase estacionaria y el soluto. Para que la retención ocurra, el material de empaque debe ser más polar que la fase móvil con respecto a la muestra. Por lo tanto, la fase estacionaria es generalmente sílica y las fases móviles típicas son hexano, cloruro de metileno, dietil éter y mezclas de estos disolventes.

En la cromatografía en fase inversa el empaque es no polar y el disolvente es polar con respecto a la muestra. La retención es el resultado de la interacción entre los componentes no polares de la muestra y la fase estacionaria. Las fases estacionarias típicas son cadenas hidrocarbonadas (C_{18} , C_8 , etc.) y las fases móviles están constituidas por mezclas de disolventes orgánicos y agua, tales como: metanol - agua, acetonitrilo - agua, etc.

En la interpretación más estricta, la fase normal y la fase inversa son términos que están relacionados únicamente a la polaridad de la columna y de la fase móvil con respecto a la de la muestra. En la tabla 2 se

muestran algunas de las características de la cromatografía de líquidos en fase normal y en fase inversa.

TABLA 2. Características de la cromatografía de líquidos en fase normal y en fase inversa.

CARACTERISTICA	FASE NORMAL	FASE INVERSA
- Polaridad de la fase estacionaria.	- Alta.	- Baja.
- Polaridad del disolvente.	- Baja - media.	- Media - alta.
- Orden de elución de la muestra.	- Eluye primero el menos polar.	- Eluye primero el más polar.
- Efecto del incremento de la polaridad del disolvente.	- Reduce el tiempo de elución.	- Aumenta el tiempo de elución.

COMPONENTES DE UN SISTEMA CLAP ^{2,5,7,8,9}

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta presión consta de las siguientes partes:

Sistema de bombeo.

La característica fundamental de una bomba cromatográfica es que sea capaz de proporcionar un flujo constante, reproducible, exacto y libre de

pulsaciones. También es importante su resistencia a líquidos corrosivos y la facilidad para realizar su limpieza.

La fase móvil debe ser suministrada en un intervalo amplio de flujos y presiones. Una bomba utilizada en cromatografía de líquidos de alta presión debe ser capaz de operar en un intervalo de 1500 a 6000 psi.

Para muchas de las columnas sólo es necesario generar gastos moderados de 0.5 - 2 mL/min. Otra característica deseable en el sistema de bombeo es la capacidad de manejar un gradiente de disolvente.

Sistema de inyección.

Un factor importante para obtener una buena resolución, es la introducción adecuada de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de pequeño "paquete" ya que esto ayuda a la obtención de picos simétricos y angostos. Para minimizar la dispersión de la muestra durante el transporte en la columna, es recomendable utilizar la tubería más corta posible del inyector a la columna.

La muestra puede ser introducida en el sistema manualmente, empleando una jeringa de volumen adecuado. Sin embargo, un sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo, ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen a inyectar.

Columna.

La columna se considera la parte fundamental de la cromatografía ya que en ella se lleva a cabo la separación.

Básicamente, una columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales el más utilizado, es el acero inoxidable.

Las columnas más utilizadas en CLAP tienen una longitud de 15 - 30 cm y están rellenas con partículas de tamaño de 3 - 10 micras, las cuales pueden ser de forma regular o irregular. El diámetro interno de las columnas está generalmente comprendido entre 2 y 5 mm.

Precolumna.

Es recomendable utilizar una precolumna empacada con la misma fase estacionaria de la columna analítica, para prolongar la vida útil de ésta.

La función de la precolumna consiste en la adsorción de componentes indeseables de la muestra, que al entrar en contacto con la fase estacionaria pueden modificarla o dañarla irreversiblemente.

La precolumna no modifica significativamente la eficiencia de la columna, está diseñada para volúmenes totales relativamente pequeños y volúmenes muertos mínimos, así que no causa ensanchamiento de los picos.

Detector.

Es un instrumento que mide en forma continua algunas propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra y genera en esa forma una señal debida a la concentración de la muestra, conforme ésta sale de la columna.

Las principales características que debe tener un detector son las siguientes:

- a. **Capacidad de respuesta.** La respuesta generada puede ser universal o selectiva, de acuerdo a la capacidad del detector para responder a todo tipo de muestras o a alguna específica.
- b. **Alta sensibilidad.** La sensibilidad se define como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produzca dicha señal.
- c. **Bajo nivel de ruido.** El ruido es la señal del instrumento que no es atribuible a la muestra, puede ser ocasionada por pequeñas variaciones en el flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire en el sistema, etc.
- d. **Linealidad.** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.
- e. **Volumen muerto.** El volumen de la celda del detector debe ser pequeño para evitar la pérdida de eficiencia, de preferencia debe ser menor de 10 μL .

Los detectores que se emplean son:

- Detector de UV
- Detector de índice de refracción
- Detector electroquímico
- Detector de fluorescencia

Los detectores de absorbancia en el UV - Visible son los más comercializados en CLAP, en los casos más favorables permiten la detección de nanogramos de soluto, presentan además baja sensibilidad a las variaciones de temperatura y a las pulsaciones de la bomba.

Registrador.

Al eluir un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador o un integrador.

En el caso del graficador, es necesario calcular manualmente el área o altura obtenida para cada pico.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas o alturas de las señales. Estos integradores registran las señales e imprimen el área y/o altura de los picos en forma numérica.

En la figura 2 se presenta el esquema básico de un equipo de CLAP.

Fase móvil.

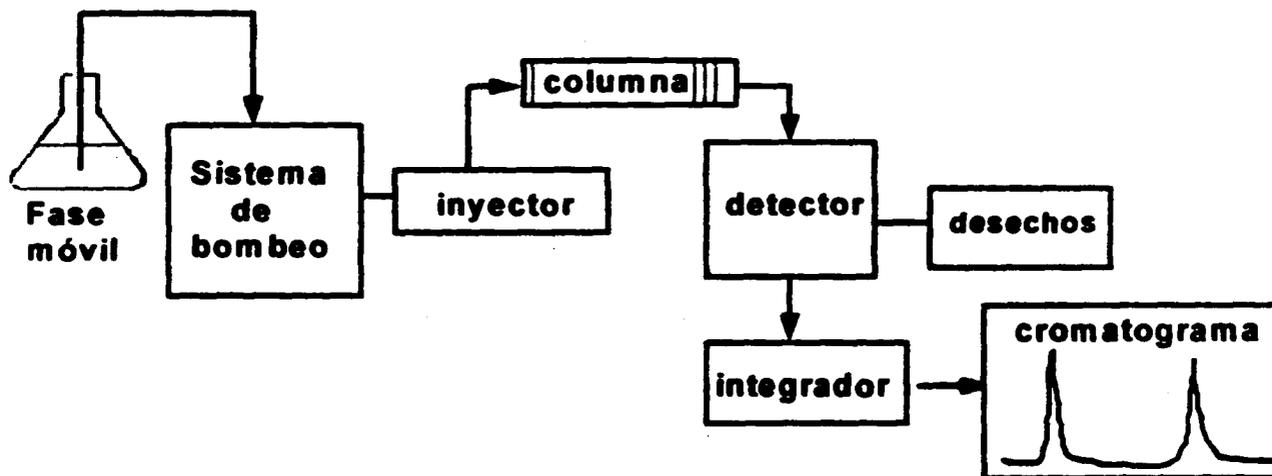
Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes durante el proceso de separación. A continuación se mencionan algunas de las características que debe presentar toda fase móvil utilizada en cromatografía líquida:

1. Alta pureza.
2. Disolver la muestra.
3. No degradar o disolver la fase estacionaria.
4. Baja viscosidad.
5. Compatibilidad con el detector.
6. No interactuar con las partes del cromatógrafo:
tuberías, válvulas, etc.

Es recomendable utilizar un recipiente cerrado para evitar la evaporación de disolventes volátiles.

El recipiente debe ser preferentemente de vidrio, plástico inerte o cualquier otro material que no sea atacado por disolventes orgánicos. Debe estar acondicionado de tal manera que la fase móvil pueda ser degasificada y posteriormente succionada a través de un filtro que evite el paso de pequeñas partículas que puedan dañar el sistema de bombeo, la columna o el detector. La degasificación de la fase móvil puede ser realizada por burbujeo de helio o con vacío y agitación. Es aconsejable también, filtrar previamente la fase móvil a través de membranas con un tamaño de poro apropiado.

FIGURA 2
COMPONENTES DE UN EQUIPO BASICO DE CLAP.



PARAMETROS CROMATOGRAFICOS ^{2,5, 7,10,11.}

Los parámetros que deben ser considerados para lograr una buena separación de los componentes de una muestra son: el número de platos teóricos, la resolución, el factor capacidad, la selectividad y el factor de coleo.

Platos teóricos (N).

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$N = 16 \cdot [t / W]^2$$

En donde t es el tiempo de retención de la sustancia de interés y W es el ancho del pico en la base, obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base.

El tiempo de retención se define como el tiempo en que el componente de una muestra permanece en la columna y se mide desde el momento en que se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal. El tiempo de retención es característico de la sustancia y puede variar en función de la columna, de la fase móvil y de la temperatura utilizadas. Por lo general se expresa en segundos o minutos.

El número de platos teóricos es el parámetro cromatográfico que mide la eficiencia de la columna, es decir, la capacidad de ésta para proporcionar picos estrechos y bien separados. A mayor valor de N, la columna tendrá una mayor eficiencia.

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como velocidad de flujo, temperatura, fase estacionaria y dimensiones de la columna.

Resolución (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos componentes. Se calcula de la siguiente manera:

$$R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_2 + W_1)}$$

Donde t_1 y t_2 son los tiempos de retención para los componentes 1 y 2 y W_1 y W_2 son los anchos de las bases de los picos 1 y 2, obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

La resolución se varía modificando la composición de la fase móvil y/o la naturaleza de la fase estacionaria. Un valor de R mayor o igual a 1.5 significa una separación completa de los componentes en la línea base.

Factor capacidad (k').

Es una medida de la interacción del componente de una muestra con una combinación específica de fase móvil - fase estacionaria. El término k' es una medida del volumen de fase móvil requerido para eluir un compuesto de la columna. El factor capacidad se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Donde t es el tiempo de retención del compuesto en estudio y t₀ es el tiempo de retención de un compuesto no retenido en la columna.

Generalmente, son deseables valores de k' en un rango de 2 a 10, para obtener una buena separación.

Selectividad (α).

La selectividad de una columna es una medida de la separación relativa de los picos de los compuestos analizados. Se determina a través de la siguiente relación:

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2}$$

Donde k'₁ y k'₂ son los factores capacidad para los compuestos 1 y 2, respectivamente.

La selectividad de una columna es función de los coeficientes de distribución de los compuestos a separar.

Factor de coleo (T).

Es una medida de la asimetría de un pico bajo las condiciones de operación. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad. El valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado. El factor de coleo se expresa por la siguiente ecuación:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde:

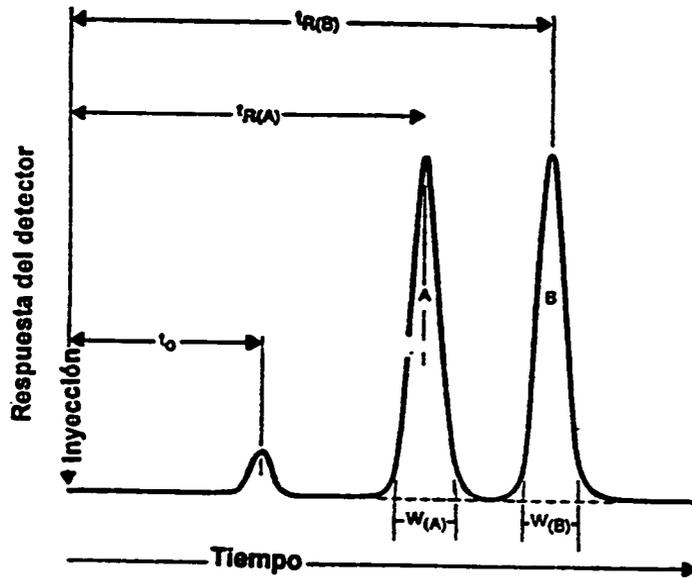
$W_{0.05}$ = ancho de la base del pico al 5% de la altura con respecto a la línea base.

f = distancia desde el inicio del pico hasta la mitad de la anchura con respecto a $W_{0.05}$.

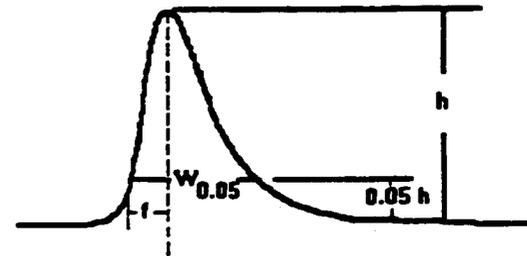
En la figura 3, se ilustra la determinación de los parámetros cromatográficos de número de platos teóricos, resolución, factor capacidad, selectividad y factor de coleo.

FIGURA 3.

Determinación de resolución,
número de platos teóricos y selectividad.



Determinación del factor de coileo.



III.2 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de métodos analíticos es la evidencia documentada por estudios de laboratorio de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas ¹².

De acuerdo a la USP XXII, los requisitos que debe cumplir la validación de un método analítico farmacopeico son: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, intervalo, linealidad y tolerancia.

La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y en base a ésta los procedimientos de ensayo se han clasificado en las categorías siguientes ¹²:

- Categoría I.** Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.
- Categoría II.** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites.
- Categoría III.** Métodos analíticos para la determinación de las características del comportamiento del producto (pruebas de disolución, liberación de fármacos, etc.).

Para cada una de estas categorías los requisitos de validación son diferentes. En la tabla 3 se encuentran los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos en base a las categorías mencionadas.

Tabla 3.

Parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos.

PARAMETRO	C A T E G O R I A			
	I	II		III
		Cuantitativa	Prueba de límite	
Precisión.	sí	sí	no	sí
Exactitud.	sí	sí	*	*
Límite de detección.	no	no	sí	*
Límite de cuantificación.	no	sí	no	*
Especificidad.	sí	sí	sí	*
Intervalo.	sí	sí	*	*
Linealidad.	sí	sí	no	*
Tolerancia.	sí	sí	sí	sí

* Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis particular.

La validación de métodos analíticos debe asegurar que el método, instrumentos, disolventes, reactivos y todos los materiales utilizados durante el análisis son adecuados para el compuesto analizado ¹³.

CLASIFICACION DE LOS PARAMETROS DE VALIDACION SEGUN HOKANSON¹⁴.

Los parámetros de validación se dividen de la siguiente manera, en base a las características que evalúan el comportamiento del método:

1. Parámetros que evalúan la adecuabilidad del sistema:

Especificidad,
Linealidad,
Límites de detección y de cuantificación.

2. Parámetros que evalúan la efectividad del proceso de preparación de la muestra:

Exactitud.

3. Parámetros que incluyen aspectos relacionados al sistema, al proceso de preparación de la muestra y al analista:

Precisión,
Tolerancia.

DEFINICIONES.

Las definiciones de los parámetros de validación, mencionadas a continuación, están enfocadas a la validación de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta presión.

LINEALIDAD.

Es la capacidad del método para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentración establecido ¹².

En el proceso de validación del método se debe determinar la linealidad del sistema y la linealidad del método analítico ¹⁵.

a) Linealidad del sistema.

La determinación de la linealidad del sistema tiene como objetivo demostrar que el sistema cromatográfico, especialmente el detector, origina una respuesta lineal de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentración, en cuyo punto intermedio se encuentra el 100% de la cantidad a cuantificar por el método de análisis.

La linealidad del sistema se evalúa a través de la correlación existente entre la concentración y la respuesta obtenida de la sustancia de interés. Una línea recta que pasa por el cero, indica una linealidad apropiada del instrumento dentro del intervalo establecido ¹³.

b) Linealidad del método.

Los estudios de linealidad demuestran la capacidad del método para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo de concentración establecido ¹⁴.

La linealidad del método se expresa en términos de la variación alrededor de la pendiente calculada por regresión lineal, por otra parte el intercepto es una medida de los errores sistemáticos del método ^{16, 17}.

Un método se considera lineal si la relación de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada, presenta el comportamiento de una línea recta cuyos parámetros son los siguientes ^{18,19}:

Pendiente $\cong 1$

Ordenada al origen $\cong 0$

Coefficiente de correlación $\cong 1$

EXACTITUD.

La exactitud del método es la concordancia absoluta entre el contenido del analito obtenido al aplicar el método a la muestra y el valor verdadero del contenido del analito en la muestra ²⁰.

Generalmente se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés ¹².

Precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados individuales obtenidos cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea ¹².

Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de desviación estándar relativa.

La precisión es una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método analítico bajo las condiciones de operación establecidas.

a) Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones de operación.

b) Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de operación.

En el proceso de validación de un método analítico se evalúa la precisión del sistema y la del método ¹³.

1) Precisión del sistema ¹³.

Es determinada como repetibilidad del sistema.

Esta prueba determina si el sistema cromatográfico elegido es capaz de detectar siempre la misma cantidad de la sustancia de interés, con la mínima variación posible, cuando es analizada repetidamente.

2) Precisión del método ¹⁵.

La precisión del método es evaluada como repetibilidad y reproducibilidad.

El Vocabulario Internacional de Metrología ²¹ señala que el término de exactitud ²¹ es un concepto cualitativo y que el término de precisión ²¹ no debe ser utilizado para indicar exactitud.

Límite de detección.

Es la mínima concentración de la sustancia de interés presente en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas ¹².

Generalmente se expresa como un valor del umbral de ruido en unidades de concentración ²².

Un estimado del límite de detección es determinado como la respuesta igual a dos veces el nivel de ruido del sistema cromatográfico ^{12,22}

Límite de cuantificación.

Es la concentración más baja de la sustancia de interés que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas ¹⁴.

Un estimado del límite de cuantificación es determinado como cinco veces el límite de detección o como la respuesta igual a diez veces el nivel de ruido del sistema cromatográfico ^{12,21}.

Tolerancia.

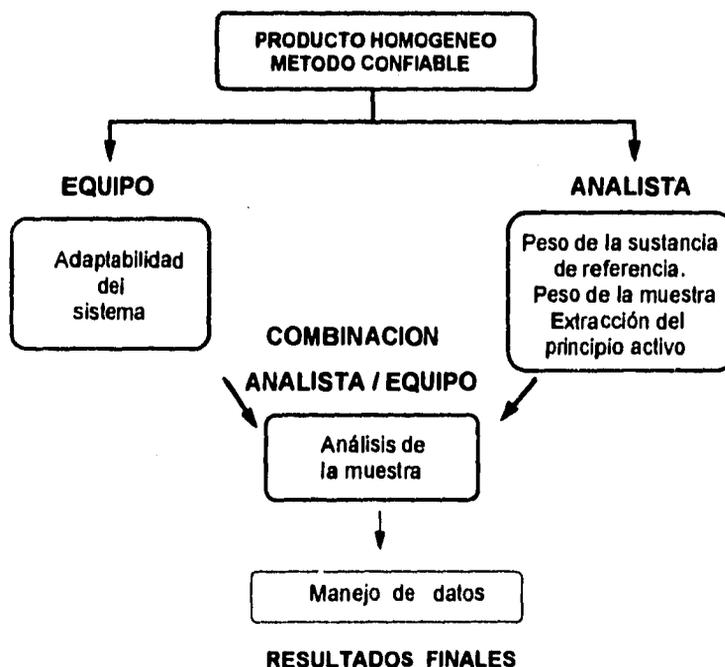
La tolerancia del método es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones de operación establecidas ¹².

Generalmente se expresa como la carencia de influencia en los resultados analíticos obtenidos por cambios en las condiciones de operación establecidas.

Para determinar la tolerancia del método es necesario identificar primeramente las variables críticas del mismo, para lo cual es conveniente subdividirlo en partes, las cuales pueden involucrar al equipo, al analista y al método. En la figura 4 se muestra esta división ²³.

Figura 4.

Relaciones entre el equipo, método, técnicas y muestra en una secuencia típica del análisis de un producto farmacéutico.



De los resultados de estos estudios, se obtienen los detalles que definen y fijan las variables críticas del método, los cuales deben ser incluidos en el procedimiento analítico. La importancia de estos estudios no puede ser sobre-estimada. Aunque su realización consume tiempo, es recomendable llevarlos a cabo, debido a que evitan la obtención de resultados inesperados ²³.

Un aspecto importante a considerar dentro de la tolerancia del método, se refiere a la estabilidad de las soluciones de la sustancia de referencia y de las soluciones muestra, determinación que se describe a continuación.

Estabilidad de soluciones analíticas ¹⁵.

La estabilidad de las soluciones analíticas indica la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de ser almacenada durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

ESPECIFICIDAD.

Es la capacidad del método analítico para cuantificar exacta y específicamente a la sustancia de interés, en presencia de los componentes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra ¹².

La demostración de especificidad muestra su máxima aplicación cuando la técnica propuesta se emplea para determinar el compuesto en estudios de estabilidad.

Un método indicador de estabilidad debe ser capaz de separar a la sustancia de interés de excipientes, sustancias relacionadas, impurezas de la síntesis y productos de degradación.

Generalmente se expresa como la interferencia obtenida entre el análisis de muestras adicionadas de productos de degradación, sustancias relacionadas o ingredientes del placebo y el análisis de muestras sin adición de impurezas. La especificidad es una medida del grado de interferencia (o ausencia de) en el análisis de muestras complejas.

La determinación de la prueba de especificidad en métodos indicadores de estabilidad está limitada tanto a la información conocida de la sustancia de interés, como a la de las posibles interferencias y a la disponibilidad de éstas últimas²⁴.

Si las sustancias relacionadas, subproductos de la síntesis y productos de degradación son conocidos y están disponibles, deben adicionarse a placebos del producto y demostrar que no interfieren con la respuesta de la sustancia en estudio.

En el caso de que los productos de degradación de la sustancia de interés no sean conocidos, la especificidad del método se demuestra ante productos de degradación formados en muestras sometidas a condiciones que aceleran la descomposición del producto. La selección y aplicación de estas condiciones de degradación, en la demostración de la especificidad de la metodología propuesta, se realiza en función de la investigación de las características fisicoquímicas de la sustancia de interés y del producto por analizar con el fin de seleccionar aquellas condiciones que proporcionen resultados adecuados.

La especificidad del método debe ser demostrada también ante productos de degradación de los excipientes de la formulación del producto, lo cual se consigue acelerando la degradación del placebo bajo condiciones de degradación adecuadas ¹⁴.

Las muestras degradadas son analizadas con la técnica propuesta, verificando que los productos de degradación puedan ser separados de la sustancias de interés.

Es aconsejable analizar las muestras degradadas con un método alternativo indicador de pureza, tal como la cromatografía en capa delgada, modificando la fase móvil, la fase estacionaria e incluso el revelador para asegurar que no existe ningún compuesto que interfiera; una segunda opción consiste en hacer cambios en la longitud de onda a la que se detecta el producto y comparar los resultados obtenidos en la longitud de onda original ¹⁸. El empleo de un sistema de detección por arreglo de diodos permite comprobar la pureza de las señales cromatográficas de los compuestos de interés, al comparar simultáneamente los espectros de las señales obtenidas en barridos realizados a diferentes longitudes de onda ¹¹.

ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA ⁵

El buen funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos se verá influenciado en la calidad del análisis. Por lo tanto, es necesario considerar todos los componentes del sistema, principalmente la columna y el flujo de la fase móvil con el fin de obtener resultados óptimos en la separación.

La adaptabilidad del sistema es una determinación que tiene como objetivo, establecer las especificaciones de los parámetros cromatográficos necesarios para obtener resultados confiables en un análisis. El poder de separación en cualquier sistema de cromatografía de líquidos de alta presión, es función principalmente de los parámetros de platos teóricos, factor de coe, factor capacidad y resolución.

La adaptabilidad del sistema es una prueba que debe ser realizada día a día antes de la inyección de las muestras por analizar, para asegurar la efectividad del sistema.

La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo que puede someterse a una prueba general de funcionamiento.

Los valores aceptables para los parámetros de la adaptabilidad del sistema pueden ser establecidos a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de especificidad y de tolerancia del método analítico.

III.3 CORTICOESTEROIDES

Las glándulas suprarrenales constan de dos partes diferentes en origen, estructura y funciones. La médula, de origen ectodérmico, similar al origen del sistema nervioso y la corteza, de origen mesodérmico, similar a las gónadas²⁵.

Desde la tercera década de este siglo, ya se aceptaba que es la corteza y no la médula, la fracción de la glándula que mantiene la vida. Si bien es posible que la vida continúe cuando la función de la corteza adrenal está totalmente suprimida, aparecen desórdenes metabólicos graves y se pierde totalmente la capacidad de respuesta del organismo al estrés fisiológico o ambiental. Este papel vital de la corteza adrenal se debe a la producción de un grupo de hormonas de naturaleza esteroide^{26, 27}.

La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides: los corticoesteroides con 21 átomos de carbono y los andrógenos con 19. Los principales corticoesteroides son el cortisol, la corticosterona y la aldosterona²⁶.

CLASIFICACION Y ACCION FARMACOLOGICA.

De acuerdo a las potencias basadas en la retención de Na^+ y al depósito de glucógeno, los corticoesteroides se clasifican tradicionalmente en dos grupos principales: mineralocorticoides y glucocorticoides²⁸.

MINERALOCORTICOIDES.

Los mineralocorticoides están involucrados en la retención de iones sodio (Na^+) en el fluido extracelular y iones potasio (K^+) dentro de la célula, manteniendo así la distribución normal de agua y de iones cloruro (Cl^-), dando como resultado el mantenimiento del volumen y presión sanguíneos. Su regulación y función están estrechamente relacionadas con el sistema renina - angiotensina y tienen gran importancia en la clínica de la hipertensión ²⁵.

GLUCOCORTICOIDES.

Los glucocorticoides aumentan la glucemia y el glucógeno hepático, por estímulo de la gluconeogénesis a expensas de proteínas; promueven la movilización de ácidos grasos y el catabolismo proteico. También tienen efectos importantes sobre el sistema hematopoyético haciendo decrecer el número de linfocitos, eosinófilos y basófilos, mientras que aumentan el número de neutrófilos, plaquetas y eritrocitos ²⁵

Los glucocorticoides parecen afectar a todas las células, aunque no de la misma manera. El interés se enfoca principalmente en sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores ²⁷

ACCIONES ANTIINFLAMATORIAS E INMUNOSUPRESORAS ²⁶.

Las acciones inmunosupresoras y antiinflamatorias de los glucocorticoides están estrechamente relacionadas, porque son el resultado de la inhibición de las funciones específicas de los leucocitos.

En varios casos, estos efectos son consecuencia de la inhibición inducida por los glucocorticoides sobre la producción y/o la acción de las linfoquinas.

Acciones antiinflamatorias.

Los glucocorticoides tienen la capacidad de prevenir o suprimir el desarrollo de las manifestaciones de la inflamación. Inhiben la respuesta inflamatoria, cualquiera que sea el agente causal: radiante, mecánico, químico, infeccioso o inmunológico.

Los corticoesteroides inhiben no sólo los fenómenos tempranos del proceso inflamatorio (edema, depósito de fibrina, dilatación capilar, migración de leucocitos hacia el área inflamada y actividad fagocitaria), sino también las manifestaciones tardías (proliferación de capilares y fibroblastos, depósito de colágeno y aún más tarde, cicatrización).

La supresión de la inflamación por parte de los glucocorticoides, se debe a la capacidad que presentan para inhibir el reclutamiento de leucocitos y monocitos - macrófagos en las áreas afectadas, inhibiendo la capacidad de estas células para elaborar diversas sustancias quimiotácticas, así como factores que intervienen en la mayor permeabilidad capilar, vasodilatación y contracción de diversos músculos lisos no vasculares.

Acciones inmunosupresoras.

Los glucocorticoides también son muy valiosos para el tratamiento de enfermedades que resultan de reacciones inmunes indeseables. Estas enfermedades varían desde condiciones que son el resultado de la

inmunidad humoral, como la urticaria, hasta aquellas mediadas por mecanismos de inmunidad celular, como el rechazo de transplante de órganos. Los glucocorticoides no eliminan los estados de inmunidad humoral o celular, pero impiden sus manifestaciones. Hasta el momento, la mayoría de las acciones estudiadas, implican la destrucción de la comunicación intracelular entre los leucocitos a través de la interferencia en la producción de la función de las linfoquinas.

METODOS DE ANALISIS DE CORTICOESTEROIDES.

Actualmente se dispone de una amplia variedad de técnicas analíticas para el análisis cuantitativo de corticoesteroides, entre las cuales se encuentran separaciones cromatográficas, determinaciones espectrofotométricas y electroquímicas. A continuación se describen los métodos más utilizados en la cuantificación de corticoesteroides en productos farmacéuticos.

• METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

Los corticoesteroides pueden ser analizados cualitativa y cuantitativamente por espectrofotometría ultravioleta, visible e infrarroja.

1. Espectrofotometría visible y ultravioleta.

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación

electromagnética de longitudes de onda en una banda bien definida y estrecha, esencialmente monocromática ⁵.

Cuando las moléculas interactúan con la energía radiante, en la región visible y ultravioleta, la absorción de energía consiste en el desprendimiento de un electrón externo de la molécula. En los compuestos covalentes saturados que contienen heteroátomos, están presentes electrones p sin compartir, además de electrones σ . La absorción de la energía incidente se produce como resultado de una transición $n \rightarrow \sigma^*$. En los compuestos no saturados, la absorción resulta en el desprendimiento de electrones π . Las moléculas que contienen grupos absorbentes simples, llamados cromóforos, presentan transiciones a longitudes de onda características ⁸.

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible (380-780 nm) y ultravioleta (190-380 nm) como procedimiento de valoración, se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, de la longitud de la celda y de la concentración, por lo cual, la concentración puede ser determinada fotométricamente ⁵.

a. Absorción visible.

Se basa en la medición de la absorción visible de soluciones coloridas producidas por la reducción de diferentes sustancias al reaccionar con corticoesteroides. El análisis simultáneo de una solución blanco y una curva de calibración permite la determinación de la concentración del corticoesteroide analizado.

Los métodos reportados en la literatura para la determinación de corticoesteroides emplean reacciones con azul de tetrazolio, fenilhidrazina e isoniacida ^{28,29}. De estos, el método más utilizado y optimizado es el que emplea azul de tetrazolio ^{30,31,32,33}.

En la actualidad, la reacción del azul de tetrazolio para la determinación cuantitativa de corticoesteroides tiene muchas variantes, pero el método más utilizado es una modificación del procedimiento de Mader y Buck ³¹, el cual es el método farmacopeico oficial para la valoración de esteroides totales ⁵.

En soluciones altamente alcalinas, el azul de tetrazolio oxida al alfa carbonil de la cadena lateral del C-17 de los corticoesteroides y él se reduce cuantitativamente para producir un compuesto colorido cuya concentración se mide espectrofotométricamente a $\lambda = 525 \text{ nm}$ ^{31, 5}.

b. Absorción ultravioleta.

Se basa en la comparación de la absorbancia producida por la solución de la sustancia problema con la absorbancia de una solución de la sustancia de referencia ⁵.

La determinación cuantitativa de los corticoesteroides por espectrofotometría en el ultravioleta puede ser realizada en virtud de la presencia del cromóforo $\Delta^4 - 3 - \text{ceto}$, el cual presenta una absorptividad molar de aproximadamente 10,000 a $\lambda = 254 \text{ nm}$, en etanol ³⁴.

2. Absorción infrarroja.

Se basa en la medición de la absorción de luz producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante en el rango de infrarrojo en función de la longitud de onda ⁵.

La cuantificación por espectrofotometría infrarroja constituye el método oficial de cuantificación de Acetato de Parametasona en tabletas (USP XXII).

- **METODOS CROMATOGRÁFICOS.**

- a. **Cromatografía de líquidos de alta presión.**

La cromatografía de líquidos de alta presión representa la técnica analítica de elección para el desarrollo de métodos de cuantificación de corticoesteroides en productos farmacéuticos, debido a que permite la generación de métodos exactos, precisos, sensibles y sobretodo, específicos, ante excipientes, sustancias relacionadas y productos de degradación ^{29,35}.

Las modalidades de cromatografía de partición en fase normal y en fase inversa pueden ser aplicadas a la cuantificación de corticoesteroides en productos farmacéuticos. En la actualidad, existen reportados en la literatura una gran variedad de métodos analíticos que utilizan cromatografía de líquidos de alta presión para la cuantificación de corticoesteroides en diversas formas farmacéuticas ^{29, 36, 37, 38, 39}.

La detección de corticoesteroides, generalmente se realiza por absorción en el ultravioleta, aprovechando la presencia del grupo cromóforo dienona, el cual presenta un máximo de absorción aproximadamente a $\lambda = 242 \text{ nm}$ ¹².

También existen métodos que utilizan cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a un sistema de derivatización post - columna, para realizar la determinación de corticoesteroides⁴⁰.

b. Cromatografía en capa delgada.

La cromatografía en capa delgada presenta un amplio desarrollo de técnicas para la determinación de corticoesteroides en productos farmacéuticos^{41,42,43,44,45}, sin embargo, su aplicación ha disminuido considerablemente debido al surgimiento de la cromatografía de líquidos de alta presión.

Después de la separación cromatográfica en placa, la cuantificación de corticoesteroides puede ser realizada por espectrofotometría al ultravioleta, al visible o por fluorodensitometría⁴².

• METODOS ELECTROQUIMICOS

a. Polarografía.

La polarografía es un método analítico en el cual se reducen (o con menos frecuencia se oxidan) cantidades pequeñas de materia por electrólisis, en un electrodo de goteo de mercurio. La corriente de la

celda en el curso de la electrólisis se mide a varios voltajes y se grafica la curva corriente - voltaje. Existe una meseta en la curva, en la cual, la corriente es proporcional a la concentración de la sustancia reducible en la solución. Empleando una curva de calibración adecuada, se puede determinar la concentración de la sustancia reducible ⁴⁶.

Se han diseñado métodos polarográficos para la determinación de corticoesteroides en varias formas farmacéuticas ^{47,48,49}, estableciéndose un mecanismo de electrorreducción polarográfica de algunos $\Delta^4,3$ - cetoesteroides y $\Delta^{1,4},3$ - cetoesteroides ⁵⁰.

La aplicación de la polarografía en el análisis farmacéutico de productos en estabilidad está limitada, debido a que, al no realizarse previa a lectura polarográfica, una separación de los componentes de la muestra, difícilmente puede ser utilizada en estudios de estabilidad, sólo será aplicable si la degradación destruye totalmente el grupo funcional que se reduce en la lectura polarográfica ⁵¹.

III.4 MONOGRAFIA DE ACETATO DE PARAMETASONA

Nombres ^{52,53,54}

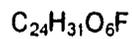
Químico: 6 α - fluor - 11 β . 17, 21 - trihidroxi - 16 α - metil pregna -
1,4 - dieno - 3,20 - diona - 21 - acetato.

6 α - fluor - 16 α - metilprednisolona - 21 - acetato.

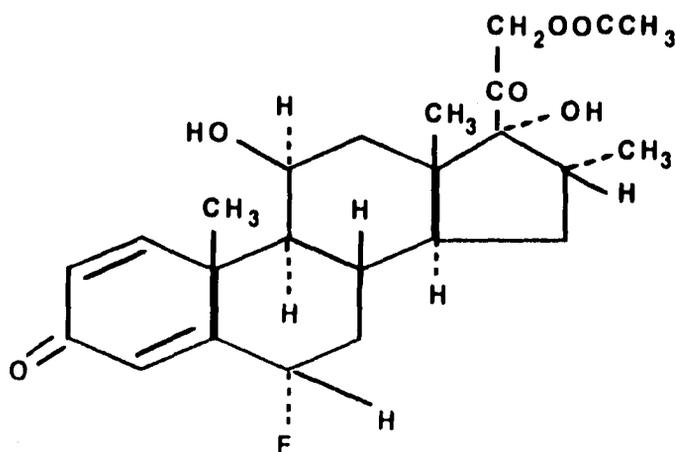
Genérico: Acetato de Parametasona.

Registrados: Dilar, Haldrona, Monocortin, Triniol.

Estructura química ¹²



434.50



Descripción²⁷

Polvo cristalino, esponjoso, blanco a blanco cremoso, inodoro, debe evitarse la exposición a la luz.

Temperatura de fusión²⁷

Funde a 240 °C con descomposición.

Solubilidad⁵³

Soluble en cloroformo (1 g en 50 mL), éter, metanol (1 g en 40 mL), acetona y etanol. Insoluble en agua.

Ensayos de identidad^{12,54}

1. Por reacción química.

Disolver 5 mg de muestra en 2 mL de metanol. Adicionar 0.5 mL de solución metanólica de azul de tetrazolio al 0.2% y 1.5 mL de solución metanólica de NaOH al 12%. Después de un minuto se obtiene un color rosa - púrpura.

2. Espectroscopía Infrarroja.

El espectro de absorción en la región infrarroja, de una dispersión en bromuro de potasio, de Acetato de Parametasona previamente secado en vacío a 105 °C durante 4 horas, exhibe máximos a las mismas

longitudes de onda que una solución de la sustancia de referencia similarmente preparada y analizada.

3. Espectroscopía ultravioleta.

El espectro de absorción ultravioleta de una solución de 1 en 50 000 de Acetato de Parametasona en metanol exhibe máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una solución de la sustancia de referencia de Acetato de Parametasona, similarmente preparada y analizada. Las absorbancias respectivas, calculadas sobre base seca, a la longitud de onda de máxima absorción (aproximadamente a 242 nm), no difieren en más del 4.0%.

4. Rotación específica.

La rotación específica de una solución clorofórmica de 10 mg/mL, calculada sobre base seca, se encuentra entre + 67° y + 77°.

5. Difracción de rayos X.

El patrón de difracción de rayos X de Acetato de Parametasona, cumple lo descrito en la USP XXII, página 1017.

Ensayos de pureza⁵⁴

- a. Una solución al 1% en cloroformo debe ser clara y libre de materia extraña.
- b. Metales pesados: No más de 20 ppm.

c. Arsénico: No más de 5 ppm.

d. Esteroides relacionados y otras impurezas: No más de 3 %.

Pérdida al secado¹²

No más del 1% de su peso cuando se seca en vacío a 105°C por 4 horas.

Residuo de Ignición⁵⁴

No más de 0.1%.

Valoración¹²

a) Materia prima.

Contiene no menos de 95.0% y no más de 101.0% de Acetato Parametasona calculado sobre base seca.

La valoración oficial (USP XXII) de Acetato de Parametasona en materia prima, inicia con la separación e identificación de la sustancia de interés por medio de cromatografía en capa delgada, utilizando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de cloruro de metileno:nitrometano:ácido acético glacial (60:40:1), como fase móvil. Después de identificar y separar las bandas de sílica gel correspondientes a las soluciones de la sustancia de referencia y de la muestra, la cuantificación es realizada por comparación de la absorción ultravioleta a $\lambda = 242$ nm de ambas soluciones, similarmente preparadas y analizadas.

b) Tabletas.

Contiene no menos del 85.0% y no más del 115.0% de la cantidad etiquetada de Acetato de Parametasona.

De acuerdo al método oficial (USP XXII), el análisis cuantitativo de Acetato de Parametasona en tabletas, se realiza por espectrofotometría de infrarrojo a una longitud de onda de máxima absorbancia de 6.04 μm .

El Acetato de Parametasona es extraído de la matriz y separado de los excipientes con una serie de extracciones agua - cloroformo. La cuantificación se realiza por comparación de la absorbancia de soluciones de la sustancia de referencia y de la muestra, similarmente preparadas, obtenidas a $\lambda = 6.04 \mu\text{m}$, utilizando celdas de 1 mm y cloroformo como blanco.

Indicaciones terapéuticas ⁵⁵

El Acetato de Parametasona es un glucocorticoide sintético, con propiedades antirreumáticas, antiinflamatorias y antialérgicas, demostradas ampliamente. Por lo tanto, está indicado en todos los padecimientos que responden al tratamiento con glucocorticoides.

El uso terapéutico del Acetato de Parametasona comprende entre otras, su aplicación en los siguientes padecimientos: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatitis por contacto, asma bronquial, neuritis óptica, Síndrome de Loeffler no tratable por otros métodos, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, manejo paliativo de la leucemia aguda en la niñez, colitis ulcerativa, etc.

Farmacocinética⁵⁵

El Acetato de Parametasona posee una vida media biológica prolongada (36 - 72 horas).

Después de su administración oral, el Acetato de Parametasona se absorbe en forma rápida y completa en el tracto gastrointestinal. El metabolismo se lleva a cabo en el hígado y en menor grado en riñón y tejidos. La vía de eliminación es la renal.

Contraindicaciones²⁵

La terapia con Acetato de Parametasona está contraindicada pero si es necesario se debe usar con la mayor precaución, en las siguientes enfermedades: úlcera péptica, cardiopatía o hipertensión con insuficiencia cardíaca congestiva, infecciones, psicosis, diabetes, osteoporosis, glaucoma y herpes simple.

Efectos secundarios²⁵

A dosis altas o administrado por períodos prolongados, puede producir alteraciones hidroelectrolíticas, *facies lunar*, insomnio, hipertricosis, hipertensión y otras alteraciones de menor importancia. En terapias prolongadas a dosis altas, puede presentarse cuadro de síndrome de Cushing.

Dosis y vías de administración.

- **Formulación oral:** Dosis inicial diaria: 2 a 24 mg.

- **Formulación inyectable:**
 - Administración intramuscular. Tratamiento inicial: La dosis inicial es de 10 - 40 mg cada 48 horas.

 - Tratamiento de sostén: 10 - 40 mg cada dos a cuatro semanas. La dosis deberá ser reducida gradualmente.

 - Administración intraarticular o periarticular: 5 -20 mg cada 5 a 20 días.

Presentaciones farmacéuticas ⁵⁵

Tabletas 1, 2 y 6 mg.

Suspensión inyectable de 20 mg/mL.

Toxicología ⁵²

La DL₅₀ en rata es de 392 ± 23 mg/Kg en dosis única por vía intraperitoneal.

Empaque y almacenamiento ²⁷

Conservar en recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

58

IV. PARTE EXPERIMENTAL

El fármaco en estudio es el Acetato de Parametasona formulado en dos presentaciones farmacéuticas: tabletas y suspensión. A continuación, se presenta la formulación cuali - cuantitativa de ambos productos:

Cada tableta contiene:

Acetato de Parametasona 1 mg
Excipiente c.b.p.....170 mg

Cada 100 mL de suspensión contienen:

Acetato de Parametasona.....20 mg
Excipiente c.b.p.....100 mL

El trabajo experimental consistió en el desarrollo y validación de un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta presión en fase inversa, para cuantificar este principio activo en las formulaciones citadas durante estudios de estabilidad.

La parte experimental se encuentra dividida en tres partes, en la primera se mencionan las etapas a través de las cuales se llevó a cabo el desarrollo del método, en la segunda se describe la metodología

propuesta para el análisis cuantitativo de Acetato de Parametasona en tabletas y en suspensión, y finalmente en la tercera etapa, se describe el procedimiento de validación del método analítico.

A. DESARROLLO DEL METODO.

La finalidad del desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos, para el análisis de preparados farmacéuticos, consiste en la búsqueda y selección de condiciones cromatográficas adecuadas que generen una resolución óptima entre la sustancia en estudio y demás componentes de la formulación, de tal manera que permitan determinar cuantitativamente el compuesto de interés en el producto analizado.

Para lograr ésto, el desarrollo del método analítico debe iniciarse estableciendo los objetivos que se persiguen con su aplicación. Para el caso particular de este trabajo, se desea desarrollar un método indicador de estabilidad de Acetato de Parametasona formulado en tabletas y en suspensión. Así, un mismo sistema cromatográfico (fase móvil y columna) deberá ser específico ante los excipientes y productos de degradación presentes en ambas matrices. Por otra parte, la precisión del método deberá ser menor o igual a 1.5% y los tiempos de corrida cromatográfica serán tan cortos como lo permita la prueba de especificidad y la adecuabilidad del sistema.

Una vez establecidos los objetivos del método, las características fisicoquímicas y de estabilidad de la sustancia en estudio y de los excipientes de la formulación, se determinan las condiciones iniciales de separación. La revisión bibliográfica señala que el Acetato de

Parametasona es un principio activo soluble en metanol, acetonitrilo, cloroformo y éter. Basándose en que la técnica de análisis elegida es cromatografía de líquidos en fase inversa, los disolventes a considerar son metanol y acetonitrilo. Por razones de toxicidad y costos, el disolvente de primera elección es metanol.

En lo referente a la estabilidad de Acetato de Parametasona en solución, existen estudios reportados³⁸ que revelan que los corticoesteroides de estructura similar son especialmente estables a pH = 4.

Por otra parte, el estudio de la composición de las muestras, indica que los excipientes de ambas formulaciones, tabletas y suspensión, son altamente solubles en agua.

En base a lo anterior, una fase móvil compuesta de metanol - agua con ajuste de pH cercano a 4 es adecuada para el análisis de Acetato de Parametasona y puede ser utilizada también como disolvente de dilución de las muestras, ya que la adición de agua logrará la dispersión de los excipientes de la formulación, tabletas o suspensión, favoreciendo la interacción Acetato de Parametasona-metanol, lográndose de esta manera, la solubilización del principio activo y por lo tanto su extracción de la matriz.

La preparación preliminar de la muestra es el siguiente paso en el desarrollo del método, en esta parte, el tamaño de la muestra es un factor importante principalmente en la búsqueda de respuestas lineales en un intervalo de concentración. De acuerdo al coeficiente de absortividad molar para Acetato de Parametasona⁵² ($\log \epsilon = 4.16$), una absorbancia alrededor de 0.6 unidades se obtiene con una concentración aproximada de 0.02 mg/mL, la cual se obtiene en el caso de las tabletas, diluyendo la muestra correspondiente a 170 mg de granulado (equivalente a 1 mg de

principio activo), a 50 mL y en el caso de la suspensión, diluyendo 5 mL de muestra (equivalente a 1 mg de principio activo), a 50 mL.

El máximo de absorción de Acetato de Parametasona se encuentra a una longitud de onda de $\lambda = 242$ nm, sin embargo, debido a la mayor disponibilidad de detectores de longitud de onda fija con filtros de $\lambda = 254$ nm, se realizarán inicialmente recobros a esta longitud de onda, evaluándose la exactitud del método.

Los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo con las condiciones iniciales de separación y preparación preliminar de la muestra, determinan las acciones a seguir para su optimización.

La aparición y los tiempos de retención de los excipientes y productos de degradación de ambas formulaciones (los cuales serán función de su afinidad por la columna), señalan el orden de elución que deberá presentar el estándar interno en la corrida cromatográfica para conservar la especificidad del método.

Un método analítico desarrollado en base a los objetivos de aplicación y a las propiedades fisicoquímicas de la sustancia y del producto en estudio, permitirá que sea utilizado en las aplicaciones deseadas, siempre bajo las condiciones experimentales establecidas.

En la figura 5 se presentan las etapas a través de las cuales, se llevó a cabo el desarrollo del método analítico.

Figura 5.

Etapas del Desarrollo del Método.



B. DESCRIPCION DEL METODO.**1.MATERIALES****a. Instrumentos y equipos**

- **Cromatógrafo de líquidos de alta presión, Waters, equipado con los siguientes módulos:**
 - 1) **Bomba isocrática, modelo 6000 - A.**
 - 2) **Automuestreador WISP, modelo 712 - D.**
 - 3) **Detector de longitud de onda fija, modelo 440.**
 - 4) **Integrador electrónico, modelo 3392 - A, Hewlett Packard.**

- **Cromatógrafo de líquidos de alta presión, con detector por arreglo de diodos, modelo 79886 - A, Hewlett-Packard .**

- **Balanza analítica con sensibilidad de 0.01 mg, modelo 1712, Sartorius.**
- **Potenciómetro, modelo Φ 45, Beckman.**
- **Parilla de agitación magnética, modelo PC - 320, Corning.**
- **Bomba de vacío, Barnat.**
- **Baño de ultrasonido, modelo B52, Branson.**
- **Agitador mecánico mixer, modelo 16700, Thermolyne.**
- **Centrifuga, modelo K, IEC.**

b. Material.

- Matracas Kitasato de 1000 mL.
- Probetas de 1000 mL.
- Matracas Erlenmeyer de 1000 mL.
- Morteros con pistilo.
- Matracas volumétricos de 25 mL.
- Matracas volumétricos de 50 mL .
- Pipetas volumétricas de 2 mL.
- Pipetas volumétricas TC de 5 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitado de 250 mL.
- Tubos de ensaye de 150 x 100 mm con tapón de rosca.
- Gradilla para tubos de ensaye.
- Filtros acrodisc de 0.40 μ , Millipore.
- Viales de 1mL, Waters.
- Embudo de filtración de 10 cm de diámetro, modelo OM-39, Millipore.
- Membranas de filtración tipo HA de 0.45 μ y GVWP de 0.22 μ , Millipore.
- Barras magnéticas, Spinbar.

c. Reactivos y disolventes.

- Sustancia de referencia secundaria de Acetato de Parametasona.
- Sustancia de referencia interna de Difenilamina, J.T. Baker.
- Acido acético glacial, grado reactivo analítico, J.T. Baker.
- Agua grado cromatográfico, Tecsiquim.
- Metanol grado cromatográfico, Mallinckrodt.
- Metanol grado reactivo analítico, Mallinckrodt.

2. SISTEMA CROMATOGRAFICO

a. Sistema de separación.

Columna analítica: Hypersil ODS con tamaño de partícula de 5μ y dimensiones de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno.

Precolumna empacada con Vydac SC-201 RP, con tamaño de partícula de 30 - 40 μ .

Fase móvil : metanol - agua (66:34), pH = 3.8 ± 0.05 , ajustado con ácido acético glacial.

La preparación de la fase móvil se realiza de la siguiente manera:

- 1) Filtrar agua grado cromatográfico a través de membrana tipo HA de 0.45 μ .
- 2) Filtrar metanol grado cromatográfico a través de membrana tipo GVWP de 0.22 μ .
- 3) Mezclar 340 mL de agua grado cromatográfico filtrada con 660 mL de metanol grado cromatográfico filtrado.
- 4) Homogenizar la mezcla de disolventes y ajustar el pH a 3.8 ± 0.05 , gota a gota con ácido acético glacial, manteniendo la mezcla de disolventes en agitación.
- 5) Degasificar la fase móvil con vacío y agitación moderada durante 10 minutos.

b. Condiciones cromatográficas :

Flujo:	1.0 mL/min
Presión:	2000 - 2500 psi
Volumen de inyección:	30 μ L
Longitud de onda:	254 nm
Velocidad de la carta:	0.1 cm/min
Temperatura:	Ambiente
Sensibilidad:	64 mAUFs
Cantidad inyectada:	600 ng Acetato de Parametasona

3. PROCEDIMIENTO

La determinación cuantitativa del principio activo se realiza por estandarización interna, comparando las áreas de las señales de Acetato de Parametasona y de Difenilamina obtenidas en soluciones estándar de concentración conocida, con las áreas obtenidas en la solución muestra.

a. Preparación de la curva de calibración.**a.1 Solución de Difenilamina, estándar interno.**

Pesar exactamente alrededor de 30 mg de Difenilamina, sustancia de referencia interna y colocarlos en un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 10 mL de metanol grado reactivo analítico y llevar a baño de ultrasonido durante 2 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar al volumen con el mismo disolvente. Homogenizar en mixer durante 30 segundos.

a.2 Soluciones estándar de Acetato de Parametasona.

Pesar exactamente alrededor de 10.0, 12.5 y 15.0 mg de Acetato de Parametasona, sustancia de referencia secundaria y colocarlos por separado en 3 matraces volumétricos de 25 mL. Adicionar a cada matraz 10 mL de fase móvil y llevar a baño de ultrasonido durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar al volumen con fase móvil. Homogenizar en mixer durante 30 segundos.

a.3 Soluciones estándar de calibración.

De cada una de las soluciones estándar de Acetato de Parametasona, medir con pipeta volumétrica una alícuota de 2 mL y colocarla en un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 2 mL de la solución estándar de Difenilamina y aforar con fase móvil. Homogenizar en mixer durante 30 segundos.

La concentración de Acetato de Parametasona en las soluciones estándar de calibración es de aproximadamente 16, 20 y 24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente y corresponden a una curva de calibración del 80%, 100% y 120% de Acetato de Parametasona, respectivamente.

La concentración de Difenilamina, estándar interno, en las soluciones estándar de calibración es de aproximadamente 24 $\mu\text{g/mL}$.

inyectar cada una de las soluciones estándar de calibración en el sistema, de acuerdo las condiciones cromatográficas señaladas en el punto 2.

b. Adaptabilidad del sistema.

Después de haber obtenido la curva de calibración y antes de inyectar las muestras, se deberá evaluar la adaptabilidad del sistema, inyectando la solución estándar de calibración al 100% a velocidad de carta de 1.0 cm/min. Los resultados obtenidos en la adaptabilidad del sistema se ven influenciados principalmente por la proporción de metanol - agua y pH de la fase móvil, así como por las condiciones de la columna. Bajo las condiciones que se establecen en el método y considerando los posibles factores que pudieran afectar, una columna Hypersil ODS de 5 μ , de 250 mm x 4.6 mm y con 3 meses de uso continuo (\pm 25 inyecciones diarias), deberá cumplir con los siguientes parámetros:

Tabla 4.

Adaptabilidad del sistema. Especificaciones de los parámetros cromatográficos del método analítico.

Señal cromatográfica	Platos teóricos (N)	Factor de coe (T)	Factor de capacidad (k')	Resolución (R)
Acetato de Parametasona.	≥ 3800	0.98 -1.20	1.6	≥ 3.0
Difenilamina, estándar interno.	≥ 3800	0.98 -1.20	2.5	

c. Preparación de las soluciones muestra.**1. Tabletas de 1 mg.**

Determinar el peso promedio de 10 tabletas, transferirlas a un mortero y triturarlas hasta obtener un polvo homogéneo. Pesar de éste, una cantidad equivalente al peso promedio de las tabletas y transferirlo a un matraz volumétrico de 50 mL; adicionar 2 mL de la solución estándar de Difenilamina y 15 mL de fase móvil, llevar a baño de ultrasonido durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con fase móvil, homogenizar en mixer durante 1 minuto.

Medir 10 mL de la solución muestra y centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, inyectar del sobrenadante la cantidad de Acetato de Parametasona establecida en las condiciones cromatográficas señaladas en el punto 2.

La concentración de Acetato de Parametasona y Difenilamina en la solución muestra es de aproximadamente 0.02 y 0.024 mg/mL, respectivamente.

2. Suspensión de 0.2 mg/mL.

Analizar el contenido de por lo menos 2 frascos, agitar manualmente la suspensión y transferirla a un vaso de precipitados provisto de una barra magnética. Homogenizar la muestra durante 5 minutos.

Manteniendo la muestra en agitación, medir 5 mL de suspensión utilizando pipetas volumétricas TC, aforar en la marca TC y transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL, lavar la pipeta con aproximadamente 5 mL de fase móvil y coleccionar los lavados en el mismo matraz. Adicionar 2 mL de la solución estándar de Difenilamina y 10 mL de fase móvil, llevar al baño de ultrasonido durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar al volumen con fase móvil, homogenizar en mixer durante 1 minuto.

Filtrar la suspensión a través de filtros acrodisc de 0.40μ e inyectar del filtrado la cantidad de Acetato de Parametasona establecida en las condiciones cromatográficas señaladas en el punto 2.

La concentración de Acetato de Parametasona y Difenilamina en la solución muestra es de aproximadamente 20 y 24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

4. IDENTIFICACION

La identificación de Acetato de Parametasona y Difenilamina se establece comparando los tiempos de retención obtenidos en el cromatograma de la solución muestra con los tiempos de retención obtenidos en el cromatograma de la solución estándar de calibración. El orden de elución es el siguiente:

1. Acetato de Parametasona, $t_r = 8.28 \text{ min} \pm 5\%$
2. Difenilamina, $t_r = 11.01 \text{ min} \pm 5\%$

La prueba de identificación positiva para las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina se muestra en la figura 6.

Figura 6

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE LAS SEÑALES DE INTERES.



a) Solución estándar de trabajo

Acetato de Parametasona, tr=8.28 min

Difenilamina, tr=11.01 min



b) Solución muestra de tabletas de 1 mg

Acetato de Parametasona,

tr = 8.25,

Difenilamina,

tr = 10.97 min



c) Solución muestra de suspensión de 0.2 mg/mL

Acetato de Parametasona,

tr = 8.33 min

Difenilamina,

tr=11.07 min

5. CALCULOS

a. Curva de Calibración

El factor de respuesta de Acetato de Parametasona obtenido en las soluciones estándar de calibración, se calcula de la siguiente manera:

$$FR = \frac{A_i}{A_s} \times P_s$$

Donde:

FR = Factor de respuesta (mg).

A_i = Area de la señal de Difenilamina, estándar interno, obtenida en el cromatograma de la solución estándar de trabajo.

A_s = Area de la señal de Acetato de Parametasona, sustancia de referencia secundaria, obtenida en el cromatograma de la solución estándar de trabajo.

P_s = Peso, expresado en mg, de la sustancia de referencia de Acetato de Parametasona, utilizado en la preparación de la solución estándar de calibración.

Calcular el factor de respuesta promedio (FRP), la desviación estándar (DE) y la desviación estándar relativa (DER). Si la DER es menor o igual a 1.5%, se procede a la preparación de la muestras, si no es así, se investiga la fuente de error y se repite la preparación de la curva de calibración, si es necesario.

b. Muestras

La cantidad de Acetato de Parametasona obtenida en las soluciones muestras se calcula de la siguiente manera:

Tabletas.

$$\text{mg obtenidos} = \text{FRP} \times \frac{\text{Am}}{\text{Ai}} \times \frac{1}{25} \times \frac{2}{50} \times \frac{\text{Pp}}{\text{Pm}} \times 50$$

Donde:

FRP = Factor de respuesta promedio.

Am = Area de la señal de Acetato de Parametasona, obtenida en el cromatograma de la solución muestra.

Ai = Area de la señal de Difenilamina, estándar interno, obtenida en el cromatograma de la solución muestra.

Pm = Peso de la muestra (mg).

Pp = Peso promedio de las tabletas (mg).

Suspensión:

$$\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ obtenidos} = \text{FRP} \times \frac{\text{Am}}{\text{Ai}} \times \frac{1}{25} \times \frac{2}{50} \times \frac{50}{5}$$

Donde:

FRP =Factor de respuesta promedio.

Am = Area de la señal de Acetato de Parametasona, obtenida en el cromatograma de la solución muestra.

Ai = Area de la señal de Difenilamina, estándar interno, obtenida en el cromatograma de la solución muestra.

El por ciento de Acetato de Parametasona en las muestras se calcula de la siguiente manera:

Tabletas.

$$\% \text{ Acetato de Parametasona} = \frac{\text{mg obtenidos}}{\text{mg etiquetados}} \times 100$$

Una tableta contiene 1 mg de Acetato de Parametasona.

Suspensión.

$$\% \text{ Acetato de Parametasona} = \frac{\text{mg/mL obtenidos}}{\text{mg/mL etiquetados}} \times 100$$

C. VALIDACION DEL METODO.

La validación del método analítico debe asegurar que las características del sistema utilizado (instrumentos, disolventes, reactivos, etc) y de la metodología propuesta, sean adecuadas para satisfacer las aplicaciones prácticas deseadas¹³. En base a esto, la validación del método analítico se dividió en dos partes:

- a) Validación del sistema.
- b) Validación de la metodología.

A continuación se describe la metodología aplicada para la determinación de cada uno de los parámetros de validación del método analítico⁵⁸.

C.1. VALIDACION DEL SISTEMA.

Dentro de la validación del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad y precisión.

1. LINEALIDAD.

La linealidad del sistema se determinó preparando un total de 12 soluciones estándar de calibración de Acetato de Parametasona a 6 diferentes concentraciones, correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120% de la concentración considerada como el 100% en la curva de calibración. Cada concentración se preparó por duplicado y se analizó utilizando la metodología analítica propuesta.

Para cada una de las soluciones estándar de trabajo analizadas, se determinó la relación del área de Acetato de Parametasona

(As), con respecto al área de Difenilamina (Ai), estándar interno y se realizó la gráfica de la relación de áreas (As/Ai) en función de la concentración de Acetato de Parametasona. La linealidad del sistema fue evaluada a través del coeficiente de correlación de la misma.

2. PRECISION.

La repetibilidad del sistema fue evaluada como repetibilidad y se determinó inyectando seis veces una solución estándar de trabajo al 100 %, bajo las condiciones establecidas en el método analítico.

Para cada inyección, se calculó la relación de área de Difenilamina (Ai) con respecto al área de Acetato de Parametasona (As). La repetibilidad del sistema fue evaluada mediante la desviación estándar relativa (DER) de las 6 relaciones (Ai/As) calculadas.

C.2 VALIDACION DE LA METODOLOGIA.

La validación de la metodología propuesta se realizó determinando los parámetros de optimización de la extracción de Acetato de Parametasona, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia y especificidad.

1. OPTIMIZACION DE LA EXTRACCION DE ACETATO DE PARAMETASONA EN LAS MUESTRAS.

La optimización de la extracción de Acetato de Parametasona en tabletas y suspensión se realizó en función del tiempo de

extracción de las muestras en el ultrasonido, analizando los porcentajes de Acetato de Parametasona obtenidos, en muestras sometidas a diferentes tiempos de extracción.

Los tiempos de extracción evaluados fueron 5 y 10 minutos, para cada uno de ellos, se prepararon 6 muestras de tabletas y 3 muestras de suspensión.

2. LINEALIDAD.

a) Tabletadas de 1 mg.

La linealidad del método se determinó analizando 12 placebos adicionados a 6 diferentes concentraciones de Acetato de Parametasona, correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120 % de la concentración considerada como el 100% en la curva de calibración. Cada concentración se preparó por duplicado y se adicionó a 170 mg de placebo de tabletas de Acetato de Parametasona.

El placebo de Acetato de Parametasona empleado en la determinación de la linealidad del método, fue preparado por el Departamento de Desarrollo Farmacéutico en la Planta Piloto de los Laboratorios Syntex S.A. de C.V., de acuerdo al proceso de fabricación, con un tamaño de lote de 500 g.

b) Suspensión.

La linealidad del método se determinó analizando 12 placebos adicionados a 6 diferentes concentraciones de Acetato de Parametasona, correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120

% de la concentración considerada como 100% en la curva de calibración. Cada concentración se preparó por duplicado y se adicionó a 5 mL de placebo de suspensión de Acetato de Parametasona.

El placebo de Acetato de Parametasona empleado en la determinación de la linealidad del método, fue preparado por el Departamento de Desarrollo Farmacéutico, en la Planta Piloto de los Laboratorios Syntex, S.A. de C.V., de acuerdo al proceso de fabricación, con un tamaño de lote de 500 mL.

3. EXACTITUD.

La exactitud del método se evaluó utilizando los resultados obtenidos en la prueba de la linealidad (2), determinando el % de recobro de Acetato de Parametasona en cada uno de los placebos adicionados.

4. COMPARACION DE LA CUANTIFICACION DEL METODO POR INTEGRACION DE AREAS Y ALTURAS.

Con el objeto de comparar estadísticamente la cuantificación del método por integración de las áreas y alturas de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina, se aplicó una prueba de t y una prueba de F a los % de recobro obtenidos utilizando las soluciones preparadas para las determinaciones de linealidad y exactitud del método. La prueba de t indica si la media del % de recobro obtenido por áreas y alturas es estadísticamente diferente, mientras que la prueba de F indica si existen diferencias significativas entre las varianzas obtenidas en las dos poblaciones de resultados ⁵⁷.

5. PRECISION.

La precisión fue evaluada como:

a. Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método se determinó preparando seis muestras independientes de tabletas y suspensión, realizando el análisis bajo las mismas condiciones de operación y calculando el % de Acetato de Parametasona obtenido en cada una de ellas.

b. Reproducibilidad del método.

La reproducibilidad del método fue realizada por dos analistas en dos días diferentes, cada analista trabajó 3 muestras de tabletas y 3 muestras de suspensión en cada día.

La precisión del método fue realizada con muestras de tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL, provenientes de lotes de producción.

6. LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION.

El límite de detección (LD) de Acetato de Parametasona fue estimado como la respuesta igual a 2 veces el nivel de ruido (n) del sistema cromatográfico, es decir, $LD = n * 2$.

El límite de cuantificación (LC) de Acetato de Parametasona fue estimado como la respuesta igual a 10 veces el nivel de ruido (n) del sistema cromatográfico, $LC = n * 10$.

El nivel de ruido (n) se determinó inyectando por duplicado, fase móvil en el sistema cromatográfico bajo las siguientes condiciones de integración:

Atenuación: -1
Threshold: 0

La respuesta obtenida para el ruido generado por el sistema cromatográfico fue medida en altura en milímetros (mm) utilizando un ocular Baush & Lomb con precisión de 0.1 mm. Se realizaron mediciones a diferentes tiempos de retención, obteniendo finalmente una altura promedio en mm, la cual fue transformada a unidades de milivolts (mV), considerando que para el tipo de integrador utilizado ⁵⁸, HP 3392 A, el tamaño de la carta del papel es de 150 mm y a una atenuación de -1 equivale a 0.5 mV.

Para conocer el valor de LD y LC en unidades de concentración se prepararon soluciones estándar de Acetato de Parametasona a 10 concentraciones diferentes, correspondientes al 0.0, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 y 12.0% de la concentración considerada como el 100% en la curva de calibración, las cuales fueron inyectadas en el sistema cromatográfico de acuerdo a las condiciones de operación establecidas en el método:

Atenuación : 7
Threshold: 6

En cada uno de los 10 cromatogramas obtenidos se midió la respuesta en altura de la señal de Acetato de Parametasona, utilizando un ocular Baush & Lomb con precisión de 0.1 mm.

Las respuestas obtenidas en mm fueron transformadas a unidades de milivolts (mV), considerando que para el tipo de integrador utilizado⁵⁸, HP 3392 A, el tamaño de la carta del papel es de 150 mm y a una atenuación de 7 equivale a 128 mV. Con los resultados generados se construyó la gráfica de respuesta (mV) en función del % de Acetato de Parametasona y sobre el intervalo de confianza inferior al 95% de la recta obtenida por mínimos cuadrados, se interpolaron los valores de mV de los límites de detección y de cuantificación, calculados considerando que $LD = n * 2$ y $LC = n * 10$. De esta manera, se obtuvieron los valores correspondientes en unidades de concentración (%).

7. ESPECIFICIDAD.

Es importante recordar que el método propuesto será aplicado en estudios de estabilidad y por lo tanto, debe ser específico ante excipientes, sustancias relacionadas y productos de degradación del principio activo, de los excipientes y ante aquellos obtenidos por la interacción principio activo - excipientes.

Actualmente no se dispone de los productos de degradación de Acetato de Parametasona. Debido a esto, la especificidad del método analítico se demostró ante productos de degradación de materia prima, placebos y producto terminado, obtenidos durante su almacenamiento en condiciones drásticas de degradación.

Las condiciones de degradación fueron seleccionadas en base a las siguientes consideraciones:

- Reacciones químicas características de los grupos funcionales presentes en la molécula de Acetato de Parametasona, aplicables a la estabilidad de medicamentos ⁵⁹.
- Estabilidad de la forma farmacéutica analizada ^{51,59}
- Estabilidad de los excipientes de la formulación ⁶⁰.

De acuerdo a la fórmula estructural, el Acetato de Parametasona puede ser degradado bajo condiciones de hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación y fotólisis .

Por otra parte, de acuerdo a la presentación del medicamento, el programa de estabilidad de formas farmacéuticas líquidas involucra generalmente el análisis de muestras sometidas a diferentes condiciones de temperatura. Mientras que uno de los aspectos críticos del programa de estabilidad de formas farmacéuticas sólidas es el estudio del efecto de la humedad, de la temperatura y de la luz sobre el producto de interés ⁶¹.

En base a lo anterior, las condiciones de degradación elegidas para obtener productos de degradación en materia prima de Acetato de Parametasona, en la formulación de tabletas y en la formulación de la suspensión se presentan en la tabla 5.

TABLA 5

**CONDICIONES DE DEGRADACION PARA MATERIA PRIMA Y
FORMULACIONES DE ACETATO DE PARAMETASONA.**

MATERIA PRIMA	TABLETAS	SUSPENSION
Hidrólisis ácida / 80°C Hidrólisis básica / 80°C Oxidación 80°C 75% H.R. / 40°C Humedad / 80°C Luz solar Luz fluorescente (2000 Luxes)	Oxidación 80°C 75% H.R. / 40°C Humedad / 80°C Luz solar Luz fluorescente (2000 Luxes)	Hidrólisis ácida Hidrólisis ácida / 80°C Hidrólisis básica / 80°C Oxidación Ciclado de 60°C / 45°C 80°C Luz solar Luz fluorescente (2000 Luxes)

La hidrólisis ácida se llevó a cabo con ácido clorhídrico 0.1 N.

La hidrólisis básica se llevó a cabo con hidróxido de sodio 0.1 N.

La oxidación se llevó a cabo con peróxido de hidrógeno al 30%.

Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de degradación durante un período de 30 días, al cabo del cual, fueron analizadas por duplicado, siguiendo la metodología propuesta, con la finalidad de cuantificar el Acetato de Parametasona presente en cada una de ellas y de esta manera identificar las condiciones de la prueba en las que se formaron productos de degradación.

7.1 Pureza cromatográfica de las señales de interés.

Con el objeto de verificar que no se presente coelución de picos debidos a excipientes, sustancias relacionadas y/o productos de degradación sobre las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina, se determinó la pureza cromatográfica de estas señales en soluciones estándar de trabajo, soluciones muestras recientemente preparadas y en muestras degradadas bajo las condiciones señaladas en la tabla 5. Todas las muestras fueron preparadas e inyectadas en el sistema siguiendo las condiciones cromatográficas establecidas en el método analítico.

La pureza de los picos se determinó por cromatografía de líquidos de alta presión, utilizando un sistema de detección por arreglo de diodos (DAD), analizando las muestras en un intervalo de $\lambda = 200 - 400$ nm y realizando barridos puntuales a las siguientes longitudes de onda:

- $\lambda = 254$ nm (longitud de onda del método)
- $\lambda = 242$ nm (longitud de onda de máxima absorción de Acetato de Parametasona).
- $\lambda = 280$ nm (longitud de onda cercana al máximo de absorción de Difenilamina).

8. TOLERANCIA.

Este parámetro se determinó realizando modificaciones en el sistema de separación señalado en el método, al variar la composición de la fase móvil y la columna utilizadas en el mismo y evaluando su efecto sobre los parámetros cromatográficos de

las señales de interés, específicamente sobre el número de platos teóricos, factor de coleo, factor capacidad y resolución de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina.

La estabilidad de soluciones analíticas (soluciones estándar y soluciones muestra), preparadas de acuerdo a la metodología propuesta y almacenadas bajo condiciones específicas durante un intervalo de tiempo definido, fue determinada también como parte de la tolerancia del método.

A continuación se describe la metodología aplicada en la determinación de este parámetro de validación.

A. Modificaciones del sistema de separación: fase móvil y columna cromatográfica.

A.1 Efecto de la composición de la fase móvil sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

Se evaluó el efecto de la proporción de metanol - agua y del pH de la fase móvil, sobre las características cromatográficas de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina. El efecto se evaluó utilizando una columna Hypersil ODS, 5 μ , 250 mm x 4.6 mm (columna del método) e inyectando soluciones estándar de calibración al 100%.

a. Efecto de la proporción metanol - agua en la fase móvil.

Se prepararon fases móviles variando la proporción de metanol - agua y ajustando el pH a un valor de 3.8.

Las proporciones de metanol - agua evaluadas fueron las siguientes:

a) Metanol - Agua, 62:38, pH = 3.8

b) Metanol - Agua, 70:30, pH = 3.8

b. Efecto del pH de la fase móvil.

Se prepararon fases móviles variando el pH de las mismas en un intervalo de $\text{pH} = 3.8 \pm 0.5$ y manteniendo la proporciones de metanol - agua en 66:34.

Las composiciones de fase móvil evaluadas fueron las siguientes:

a) Metanol - Agua, 66:34, pH = 3.3

b) Metanol - Agua, 66:34, pH = 4.3.

A.2 Efecto de la columna sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

El efecto de la columna sobre las características cromatográficas de las señales de interés, Acetato de Parametasona y Difenilamina, fue evaluado utilizando columnas de diferentes marcas, tamaño de partícula, % de carbono y dimensiones. La evaluación se realizó inyectando soluciones estándar de calibración al 100%.

Las columnas evaluadas fueron las siguientes:

- A) Adsorbosphere, C18, 5 μ , 250 mm x 4.6 mm, Alltech.
- B) Spherisorb ODS-1, 5 μ , 250 mm x 4.6 mm, Alltech.
- C) μ Bondapak, C18, 10 μ , 300 mm x 3.9 mm, Waters.
- D) Lichrosphere, RP, 5 μ , 12.5 mm x 4, Merck.

B. Estabilidad de las soluciones analíticas.

Se determinó la estabilidad de las soluciones estándar de calibración y de las soluciones muestra de tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL, con el objeto de determinar el período de tiempo en que pueden ser utilizadas durante un análisis obteniendo resultados confiables.

Las condiciones probadas fueron las siguientes:

1. Soluciones estándar de calibración.

Se prepararon dos curvas de calibración, una de ellas fue mantenida a temperatura ambiente y la otra a 5 °C.

2. Soluciones muestra.

Se prepararon 6 muestras de tabletas y 6 muestras de suspensión, tres de las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y tres se mantuvieron a 5°C.

La estabilidad de las soluciones preparadas se determinó cuantificando el % de Acetato de Parametasona en las soluciones estándar y en las soluciones muestra mantenidas a temperatura ambiente y a 5°C a las 0, 24, 48 y 72 horas después de su preparación.

V. RESULTADOS

A. VALIDACION DEL SISTEMA.

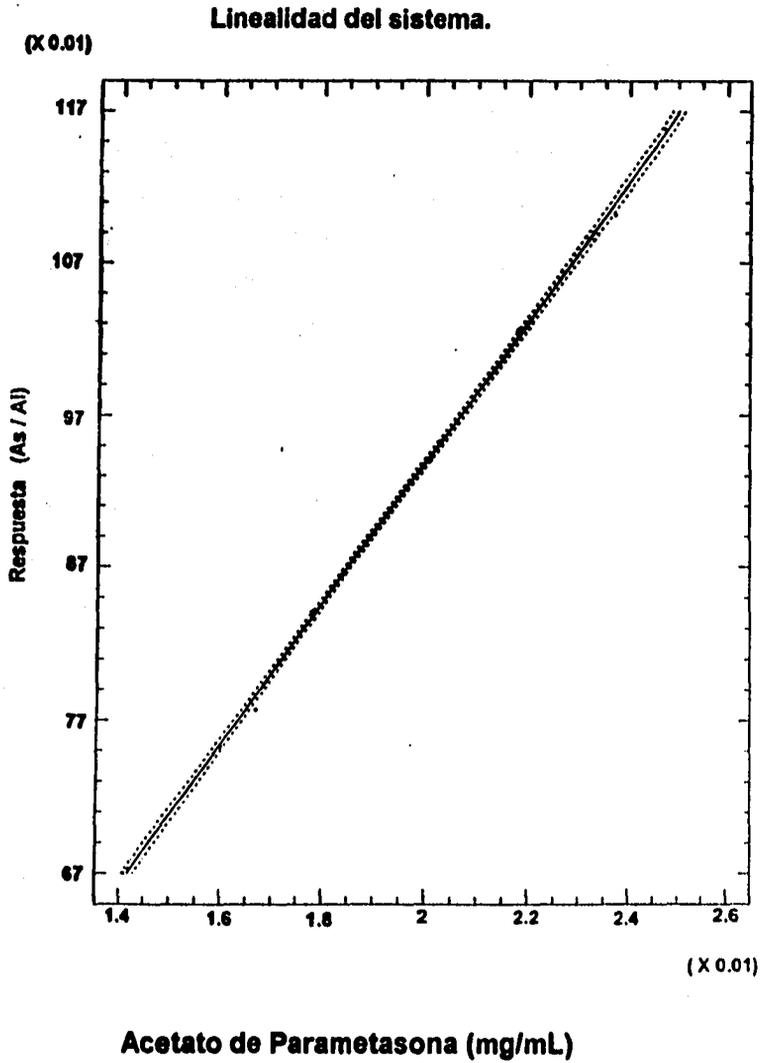
1. Linealidad.

Los resultados obtenidos en la linealidad del sistema se muestran en la tabla 6 y gráficamente en la figura 7. En ellos se observa que el sistema cromatográfico, especialmente el detector, es capaz de originar una respuesta lineal de Acetato de Parametasona en un intervalo de concentración del 70 al 120% de la cantidad a cuantificar por el método analítico.

TABLA 6. Linealidad del sistema.

Nivel	Estándar	Peso (mg)	Concentración (mg/mL)	Relación (As/AI)
70	1	8.88	0.0142	0.6731
	2	8.82	0.0141	0.6702
80	1	10.45	0.0167	0.7771
	2	10.00	0.0160	0.7529
90	1	11.15	0.0178	0.8406
	2	11.50	0.0184	0.8653
100	1	12.67	0.0203	0.9535
	2	12.57	0.0201	0.9410
110	1	13.64	0.0218	1.0253
	2	13.62	0.0218	1.0261
120	1	14.80	0.0237	1.1020
	2	15.45	0.0247	1.1582

Figura 7



* Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%.

2. Precisión.

En la tabla 7, se encuentran los resultados obtenidos en la precisión del sistema, la cual, fue determinada como repetibilidad. El valor de la desviación estándar relativa (DER) indica que existe una mínima variación cuando el sistema cromatográfico analiza repetidamente la sustancia de interés.

TABLA 7. Repetibilidad del sistema.

Inyección No.	Relación áreas (Ai/As)	Parámetros estadísticos
1	1.1134	media = 1.1152 DE = 0.003 DER = 0.27% n = 6
2	1.1186	
3	1.1119	
4	1.1138	
5	1.1205	
6	1.1131	

B. VALIDACION DE LA METODOLOGIA.

1. Optimización de la extracción de Acetato de Parametasona en soluciones muestra.

En la tabla 8 se muestran los porcentajes de Acetato de Parametasona obtenidos en cada uno de los tiempos de extracción evaluados, para tabletas y suspensión.

TABLA 8. Optimización de la extracción de Acetato de Parametasona.

Tiempo de extracción (min)	TABLETAS 1 mg		SUSPENSION 0.2 mg/mL		
	% Acetato de Parametasona		Parámetros estadísticos	% Acetato de Parametasona	
5	98.05	98.58 98.46 99.01 97.74 97.90	media = 98.29% DE = 0.48 DER = 0.49% n = 6	100.24 101.46 99.93	media = 100.54% DE = 0.81 DER = 0.80% n = 3
10	97.98	98.68 99.51 99.31 98.58 99.96	media = 99.00% DE = 0.72 DER = 0.73% n = 6	100.80 100.12 100.43	media = 100.45% DE = 0.34 DER = 0.34% n = 3

En el caso de las tabletas, un porcentaje de Acetato de Parametasona satisfactorio se obtiene con un tiempo de extracción de 10 minutos en el ultrasonido, generándose una DER aceptable. Para la suspensión, se obtienen porcentajes de recobro similares y satisfactorios con un tiempo de extracción de 5 y de 10 minutos; sin embargo, se obtiene una DER menor si las muestras son llevadas al ultrasonido durante 10 minutos.

2. Linealidad.

Los resultados obtenidos en la linealidad del método se muestran en la tabla 9 y gráficamente en las figuras 8 y 9. Los coeficientes de correlación obtenidos ($r > 0.999$), para las gráficas de ambas formas farmacéuticas, indican que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de Acetato de Parametasona, en un intervalo de concentración del 70 al 120%.

Este resultado se confirmó con la evaluación estadística de la linealidad del método. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 y en ellos se observa que para las dos formulaciones analizadas, el intervalo de confianza al 95% de la pendiente incluye el valor de 1 y el del intercepto incluye el valor de cero. Por lo tanto, la metodología propuesta posee un comportamiento lineal en el intervalo de concentración evaluado. Las fórmulas empleadas en la evaluación estadística de la linealidad se encuentran en el anexo A.

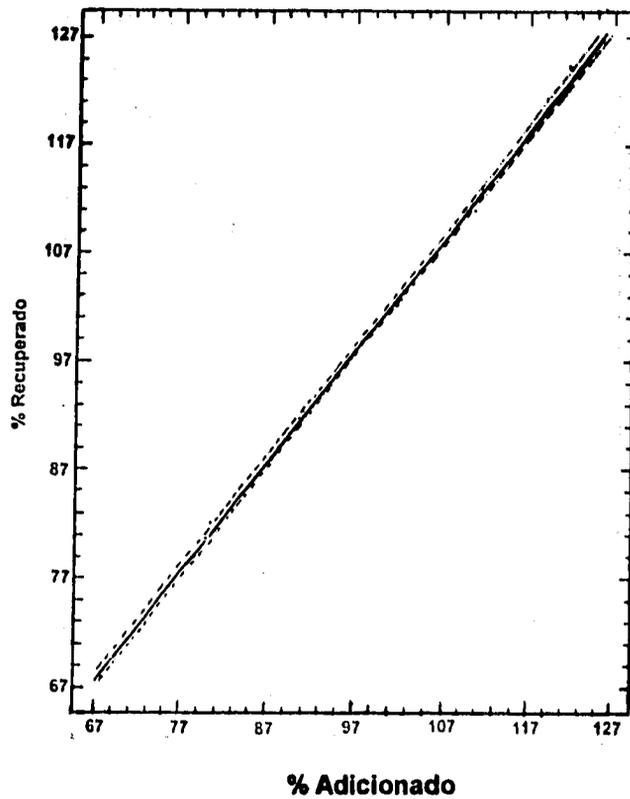
TABLA 9. Linealidad del método.

Nivel (%)	Muestra No.	Tabletas 1 mg		Suspensión 0.2 mg/mL	
		% Adicionado	% Recuperado	% Adicionado	% Recuperado
70	1	67.92	67.84	69.44	69.52
	2	68.96	69.44	70.40	69.84
80	1	80.40	82.08	80.64	81.44
	2	79.84	80.72	79.52	78.96
90	1	91.04	92.32	94.48	95.04
	2	90.56	91.76	94.56	94.56
100	1	102.16	102.72	100.24	100.48
	2	101.76	102.24	100.48	100.40
110	1	110.16	111.44	110.72	110.48
	2	110.64	111.04	110.72	110.48
120	1	121.68	124.32	121.44	122.40
	2	121.04	122.00	120.64	121.44

Figura 8

LINEALIDAD DEL METODO.

Tabletas de 1 mg .



Pendiente = 1.0166 Ordenada al origen = -0.6015

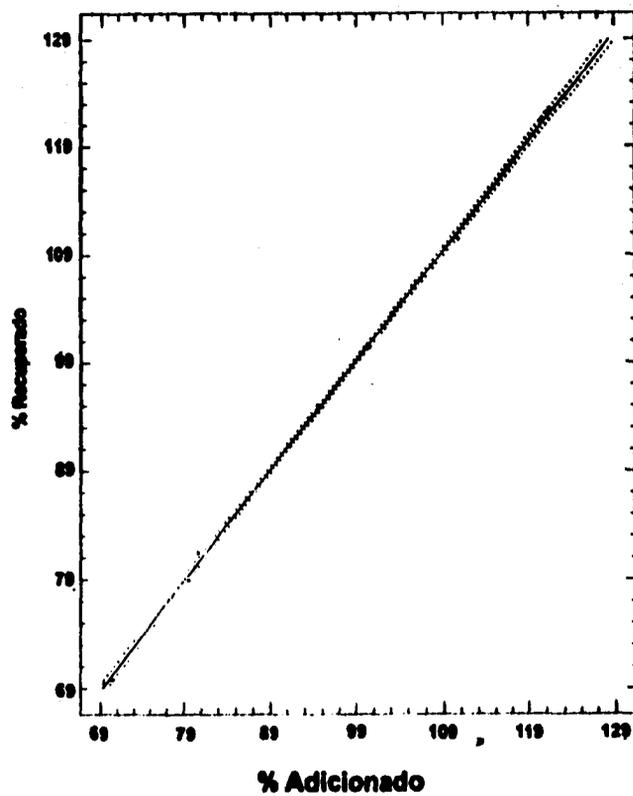
Coefficiente de correlación: 0.9994

* Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%

Figura 9

LINEALIDAD DEL METODO.

Suspensión de 0.2 mg/mL.



Pendiente = 1.0127

Intercepto = -1.0777

Coeficiente de correlación: 0.9997

* Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%

TABLA 10

Evaluación estadística de la linealidad del método.

Intervalo de confianza al 95%		
Forma farmacéutica	Pendiente	Intercepto
Tabletas	0.9926, 1.0407	-2.9315, 1.7285
Suspensión	0.9944, 1.0310	-2.8643, 0.7089

3. Exactitud.

Los resultados obtenidos en la determinación de la exactitud del método se encuentran en la tabla 11. En ellos se observa que la media de recobro obtenida es cercana al 100% y la DER obtenida durante el ensayo es menor de 0.7% para ambas formas farmacéuticas. Por otro lado, los resultados obtenidos en la evaluación estadística son también satisfactorios, los límites de confianza al 95% son estrechos y cercanos al 100%, como puede observarse en la tabla 12. Por lo tanto, se considera que el método es exacto para cuantificar el Acetato de Parametasona presente en tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL. Las fórmulas utilizadas en la evaluación estadística de la exactitud se encuentran en el anexo B.

TABLA 11. Exactitud del método.

FORMA FARMACEUTICA		TABLETAS 1 mg			SUSPENSION 0.2 mg/mL		
Placebo adicionado	Muestra	mg adicionados	mg recuperados	% recobro	mg adicionados	mg recuperados	% recobro
70	1	8.49	8.48	99.88	8.68	8.69	100.12
	2	8.62	8.68	100.70	8.80	8.73	99.20
80	1	10.05	10.26	102.09	10.08	10.18	100.99
	2	9.98	10.09	101.10	9.94	9.87	99.30
90	1	11.38	11.54	101.40	11.81	11.88	100.59
	2	11.32	11.47	101.33	11.82	11.82	100.00
100	1	12.77	12.84	100.55	12.53	12.56	100.24
	2	12.72	12.78	100.47	12.56	12.55	99.92
110	1	13.77	13.93	101.16	13.84	13.81	99.78
	2	13.83	13.88	100.36	13.84	13.81	99.78
120	1	15.21	15.54	102.17	15.18	15.30	100.79
	2	15.13	15.25	100.79	15.08	15.18	100.66

TABLA 12. Evaluación estadística de la exactitud.

Forma farmacéutica	Media de recobro (%)	DER (%)	Intervalo de confianza al 95%
Tabletas	101.00	0.67	100.57 - 101.43
Suspensión	100.11	0.57	99.75 - 100.47

4. Comparación de la cuantificación del método analítico por áreas y alturas.

a. Tabletas.

El % de recobro de Acetato de Parametasona obtenido en las soluciones preparadas para la determinación de la exactitud, fue calculado utilizando la integración de las áreas y alturas de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

b. Suspensión.

El Acetato de Parametasona no fue cuantificado por alturas debido a que los factores de respuesta de las soluciones estándar de calibración variaron a lo largo del análisis, obteniéndose una DER mayor a 2.0% para el factor de respuesta promedio. Por lo tanto, se recomienda que la cuantificación de Acetato de Parametasona en suspensión sea realizada por áreas.

TABLA 13

% recobro de Acetato de Parametasona por áreas y alturas en tabletas de 1 mg.

Nivel	Muestra	% recobro	% recobro	Diferencia (d)
		Areas (A)	Alturas (H)	A - H
70	1	99.88	99.76	0.12
	2	100.70	100.00	0.70
80	1	102.09	101.39	0.70
	2	101.10	100.80	0.30
90	1	101.40	100.79	0.61
	2	101.33	100.44	0.89
100	1	100.55	100.88	-0.31
	2	100.47	100.39	0.08
110	1	101.16	100.00	1.16
	2	100.36	100.51	-0.15
120	1	102.17	100.85	1.32
	2	100.79	100.00	0.79
Parámetros estadísticos		X = 101.00% S = 0.68 S ² = 0.46	X = 100.48% S = 0.48 S ² = 0.23	X _d = 0.52 S _d = 0.51

* S = desviación estándar.

* S² = Varianza.

Los resultados obtenidos en las pruebas de t y F se encuentran en la tabla 14. Las fórmulas utilizadas para la prueba de t y F se muestran en el anexo C.

TABLA 14. Pruebas estadísticas.

Prueba de t	Prueba de F
t _{calculada} = 2.164 t _{tablas} = 2.228	F _{calculada} = 2.0069 F _{tablas} = 3.480

$$t_{\text{calculada}} < t_{\text{tablas}}$$

No existe diferencia significativa entre las medias de los % de recobro de Acetato de Parametasona obtenidos por áreas y alturas.

$$F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$$

No existe diferencia significativa entre las varianzas de los % de recobro de Acetato de Parametasona obtenidos por áreas y alturas.

Por lo tanto, el análisis cuantitativo de Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg puede ser realizado por integración de las áreas o de las alturas de las señales cromatográficas, obteniendo resultados exactos.

5. Precisión.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de precisión, evaluada como repetibilidad y reproducibilidad del método.

- a. **Repetibilidad.** En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos en la repetibilidad del método. Los valores de DER indican que el método es repetible para cuantificar Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg y en suspensión de 0.2 mg/mL.

TABLA 15.

Repetibilidad del método.

Muestra No.	% Acetato de Parametasona	
	Tabletas 1 mg	Suspensión 0.2 mg/mL
1	98.74	98.78
2	99.93	98.29
3	99.73	98.86
4	99.69	99.04
5	99.01	97.69
6	99.09	98.70
Parámetros estadísticos	X = 99.27% DE = 0.39 DER = 0.39%	X = 98.56% DE = 0.49 DER = 0.50%

b. Reproducibilidad.

En las tablas 16 y 17, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de reproducibilidad. Los valores de DER demuestran que el método analítico es reproducible para determinar cuantitativamente Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg y en suspensión de 0.2 mg/mL.

TABLA 16

Reproducibilidad del método. Tabletas de 1 mg.

Día No.	Analista I (%)	Analista II (%)
I	97.49	99.23
	98.24	99.02
	97.51	98.73
II	101.30	98.58
	100.05	98.29
	99.24	99.67

% determinado promedio = 98.98

DE = 1.08

DER = 1.09%

n = 12

TABLA 17

Reproducibilidad del método. Suspensión de 0.2 mg/mL.

Día No.	Analista I (%)	Analista II (%)
I	99.78	100.79
	100.11	98.03
	99.94	96.51
II	98.59	98.12
	98.57	98.74
	99.45	99.34

% determinado promedio = 99.00

DE = 1.15

DER = 1.16%

n = 12

b.1 Análisis de varianza. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos en la prueba de reproducibilidad, debido a que aunque no es un requisito de validación, es importante determinar el efecto del analista, del día anidado en el analista y del error experimental sobre el ensayo de la sustancia de interés. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 18 y 19, para tabletas y suspensión, respectivamente.

Las fórmulas utilizadas en el análisis de varianza se encuentran en el anexo D.

TABLA 18.

ANALISIS DE VARIANZA. Tabletas de 1 mg.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F teórica
Analista (a)	1	7.467×10^{-3}	7.467×10^{-3}	2.12×10^{-3}	38.51
Día (d)	2	7.0576	3.5288	7.62	6.06
Error (e)	8	3.7043	0.4630	-----	-----

Interpretación de los resultados:

$F_a < F_{tablas}$ El método es reproducible por los analistas.

$F_d > F_{tablas}$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

TABLA 19

ANALISIS DE VARIANZA. Suspensión de 0.2 mg/mL

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F teórica
Analista (α)	1	2.0008	2.0008	2.15	38.51
Día (δ)	2	1.8649	0.9325	0.70	6.06
Error (ϵ)	8	10.7247	1.3406	---	---

Interpretación de los resultados:

$F_{\alpha} < F_{\text{tablas}}$ El método es reproducible por los analistas.

$F_{\delta} < F_{\text{tablas}}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

6. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC).

El valor obtenido para el nivel de ruido (n) generado en el sistema cromatográfico fue de 0.012 mV. Por lo tanto, LD = 0.024 mV y LC = 0.12 mV.

En la figura 10, se muestra el cromatograma obtenido en la determinación del nivel de ruido y las respuestas de Acetato de Parametasona generadas por soluciones al 0.8%, 5% y 12% de Acetato de Parametasona.

Por otro lado, en la tabla 20 se indican los resultados en mV, obtenidos para cada una de las soluciones preparadas, en función de la concentración (%) de Acetato de Parametasona. La figura 11 los representa gráficamente.

Los valores de LD y LC en unidades de concentración, obtenidos por interpolación en la figura 11, corresponden a 0.15% y 0.26%, respectivamente.

Figura 10

Determinación del nivel de ruido.

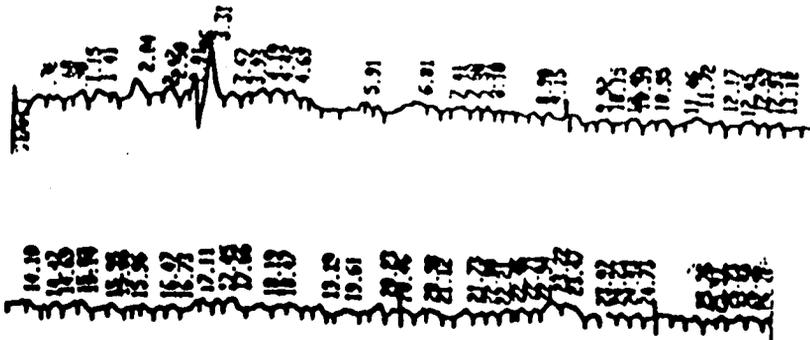


Figura 10
(Continuación)

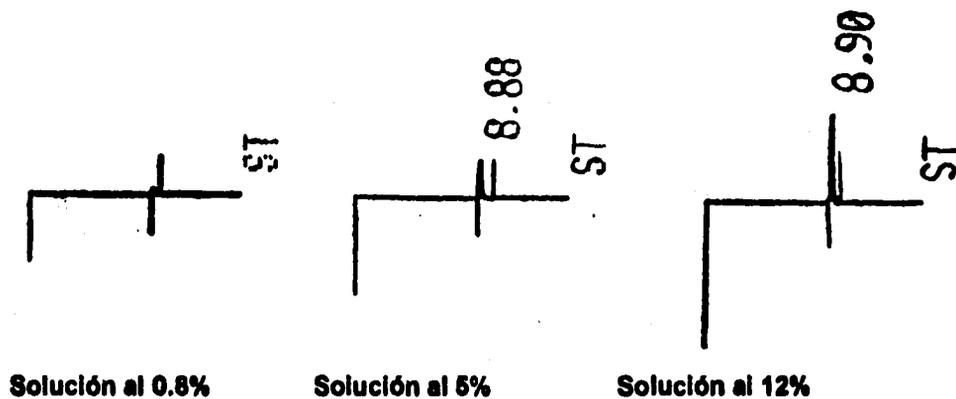
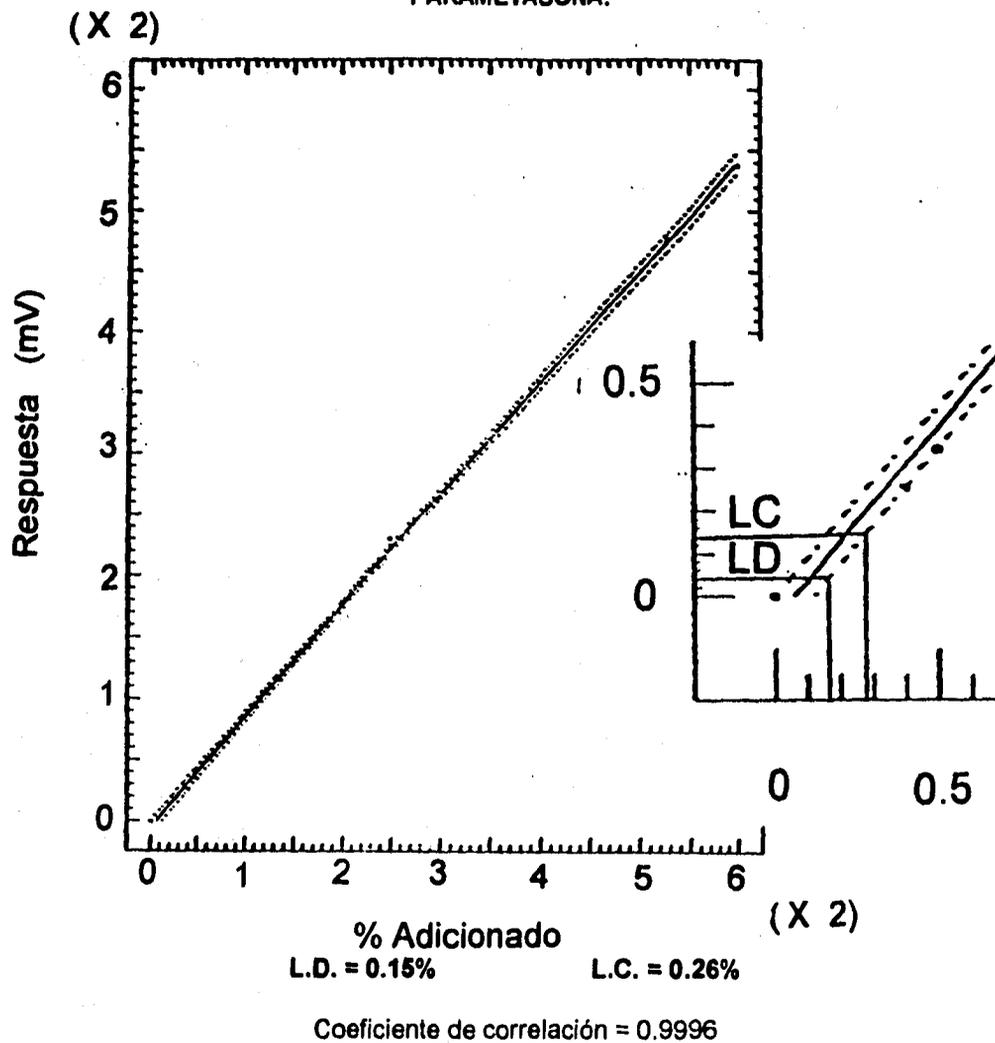


TABLA 20. LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION
DE ACETATO DE PARAMETASONA.

% Acetato de Parametasona	Respuesta (mV)
0.0	0.00
0.8	0.51
1.0	0.69
2.0	1.71
3.0	2.56
4.0	3.58
5.0	4.61
6.0	5.29
8.0	7.17
12.0	10.75

Figura 11

LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION DE ACETATO DE
PARAMETASONA.



* Las líneas punteadas representan los intervalos de confianza al 95%

7. Especificidad.

Los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras degradadas de materia prima de Acetato de Parametasona, placebos y formulación de tabletas y de suspensión, no muestran señales debidas a sustancias relacionadas, excipientes o productos de degradación que interfieran en la cuantificación de Acetato de Parametasona y Difenilamina.

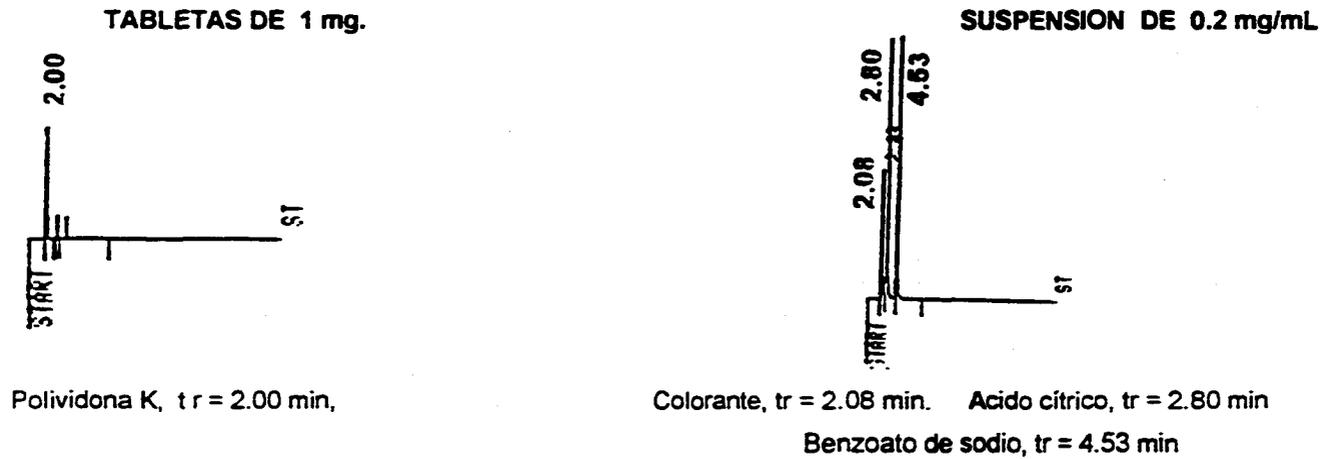
En la figura 12 se presentan los cromatogramas de los placebos de tabletas y de la suspensión. En ellos se han identificado los excipientes de ambas formulaciones y se observa que no interfieren en la cuantificación de Acetato de Parametasona y Difenilamina.

Por otra parte, se cuantificó el % de Acetato de Parametasona en muestras degradadas de formulación de tabletas y de suspensión, con el fin de asegurar la presencia de productos de degradación. En la tabla 21 se reportan los % de Acetato de Parametasona promedio obtenidos en el análisis de dos muestras de cada una de las condiciones de degradación. En ella se observa que la condición de degradación más drástica para la formulación de tabletas es la humedad / 80°C, mientras que la hidrólisis básica, es la condición de degradación más drástica para la formulación de la suspensión.

Los posibles productos de degradación⁶² de Acetato de Parametasona se presentan en la figura 13.

Figura 12

CROMATOGRAMAS DE LOS PLACEBOS DE TABLETAS Y DE SUSPENSION DE ACETATO DE PARAMETASONA.



Los excipientes presentes en las formulaciones de tabletas y suspensión no interfieren en la cuantificación de Acetato de Parametasona.

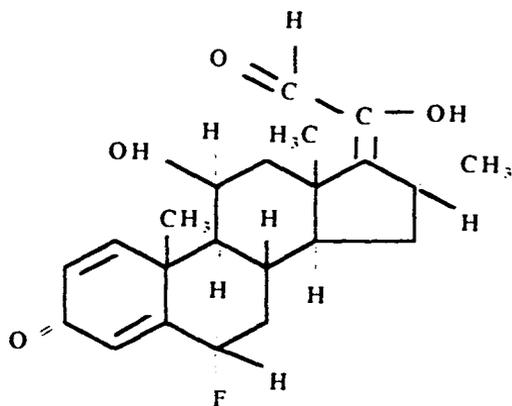
TABLA 21

% Recobro de Acetato de Parametasona en muestras degradadas.

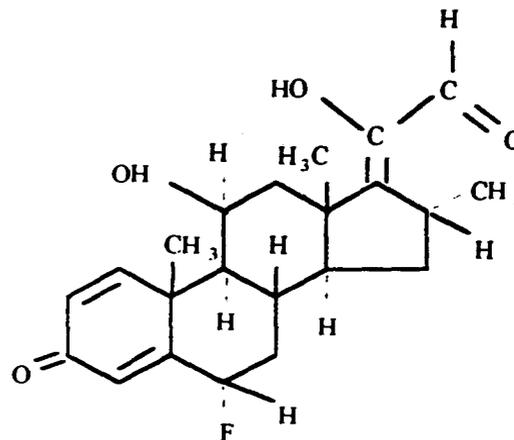
TABLETAS 1 mg		SUSPENSION DE 0.2 mg/mL	
Condición de degradación	% Acetato de Parametasona	Condición de degradación	% Acetato de Parametasona
Análisis inicial	100.46	Análisis inicial	98.85
75% H.R. / 40°C	100.71	60 °C / 45 °C	93.82
Oxidación	99.28	Oxidación	92.09
2000 luxes	96.03	Hidrólisis ácida	93.12
Luz solar	95.50	80 °C	35.03
80°C	95.76	Hidrólisis ácida / 80 °C	41.14
Humedad / 80°C	81.34	Hidrólisis básica / 80 °C	31.54
		Luz solar	88.16
		2000 luxes	86.11

Figura 13

Posibles productos de degradación de Acetato de Parametasona.

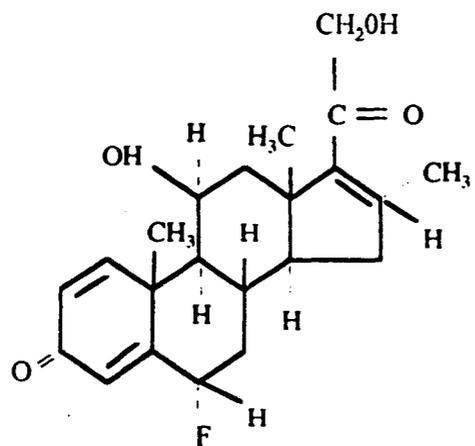


Producto de degradación A.



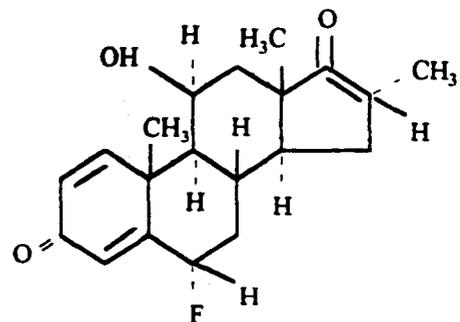
Producto de degradación B.

HIDROLISIS ACIDA

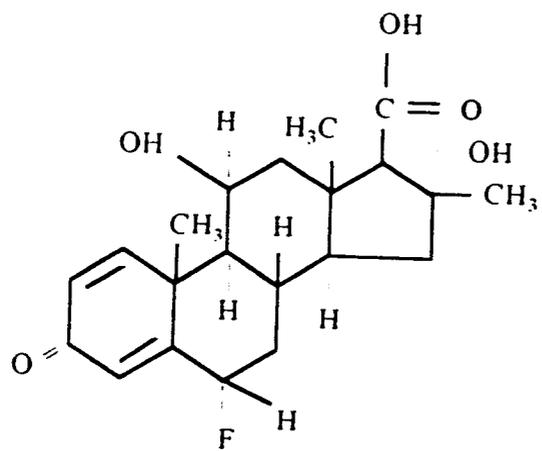


Producto de degradación C

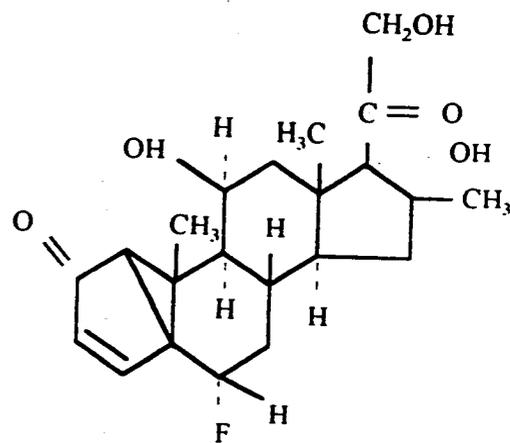
HIDROLISIS ACIDA



HIDROLISIS BASICA



OXIDACION



FOTOLISIS

a. Pureza cromatográfica de las señales de interés.

Los resultados obtenidos en la determinación de la pureza de pico realizada a diferentes longitudes de onda, demuestran que bajo las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina no existen picos debidos a excipientes, sustancias relacionadas o a productos de degradación que puedan interferir con su cuantificación, así pues, las respuestas obtenidas corresponden específicamente a la molécula intacta de Acetato de Parametasona y a la de Difenilamina, presentes en la muestra.

El detector por arreglo de diodos adquiere el espectro de un compuesto durante su elución a través de la columna de CLAP. La pureza del pico se verifica por superposición de los espectros obtenidos en muestreos realizados en diferentes secciones del pico: en la pendiente de ascenso, en la parte central y en la parte final de la elución. Los espectros obtenidos en el barrido a las longitudes de onda seleccionadas, son normalizados y superpuestos, calculándose estadísticamente los factores de match (comparación). De esta manera, una medida cuantitativa de la pureza de pico es expresada a través del parámetro "match" ¹¹.

Un valor de "match" igual a 1000, indica que no existe interferencia en la cuantificación del pico analizado. Se obtuvieron valores de "match" igual a 1000 para los picos de Acetato de Parametasona y Difenilamina en todas las muestras degradadas, como puede ser observado en las tablas 22 y 23, para muestras de tabletas y de suspensión, respectivamente.

Se muestran a continuación, reportes típicos de la pureza de los picos mostrando la superposición de los espectros de absorción obtenida a las tres longitudes de onda seleccionadas y los cromatogramas obtenidos para soluciones estándar y muestras sin degradar, así como para las muestras degradadas más representativas.

Para las condiciones de degradación restantes, se obtuvieron reportes de pureza y cromatogramas similares a los de las muestras sin degradar.

TABLA 22. Valores de "match" para las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina en muestras degradadas. Tabletas de 1 mg.

Condición de degradación	Muestra	Acetato de Parametasona		Difenilamina	
	No.	tr (min)	Pureza cromatográfica	tr (min)	Pureza cromatográfica
Sin degradar	1	7.811	1000	10.261	1000
	2	7.807	1000	10.254	1000
75 % H. R. / 40 °C	1	7.627	1000	10.067	1000
	2	7.651	1000	10.094	1000
Oxidación	1	8.168	1000	10.727	1000
	2	8.075	1000	10.613	1000
80 °C	1	7.579	1000	10.024	1000
	2	7.623	1000	10.062	1000
Luz solar	1	7.664	1000	10.115	1000
	2	7.682	1000	10.128	1000
Luz fluorescente (2000 luxes)	1	7.710	1000	10.159	1000
	2	7.702	1000	10.150	1000
Humedad / 80 °C	1	7.626	1000	10.074	1000
	2	7.617	1000	10.064	1000

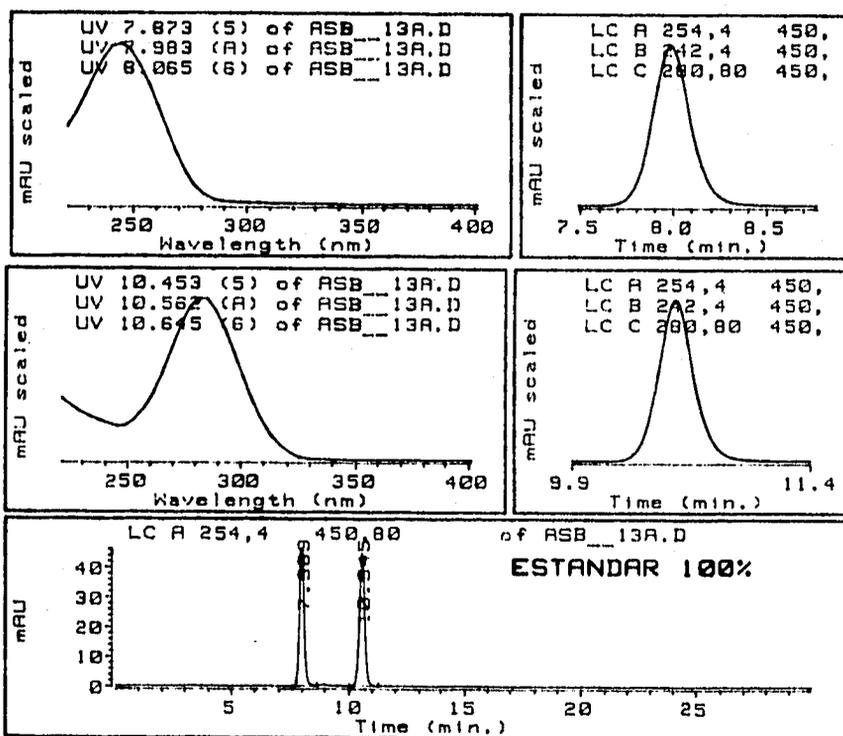
TABLA 23. Valores de "match" para las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina en muestras degradadas. Suspensión de 0.2 mg/mL.

Condición de degradación	Muestra	Acetato de Parametasona		Difenilamina	
	No.	tr (min)	Pureza cromatográfica	tr (min)	Pureza cromatográfica
Sin degradar	1	8.194	1000	10.757	1000
	2	7.727	1000	10.195	1000
Oxidación	1	7.883	1000	10.334	1000
	2	7.834	1000	10.334	1000
Hidrólisis ácida	1	8.168	1000	10.727	1000
	2	8.075	1000	10.613	1000
80 °C	1	7.795	1000	10.287	1000
	2	7.762	1000	10.251	1000
Hidrólisis ácida / 80 °C	1	7.886	1000	10.398	1000
	2	7.719	1000	10.192	1000
Hidrólisis básica / 80 °C	1	7.923	1000	10.437	1000
	2	7.904	999	10.420	1000
Luz solar	1	7.745	1000	10.226	1000
	2	7.736	1000	10.224	1000
Luz fluorescente (2000 luxes)	1	7.736	1000	10.221	1000
	2	7.728	1000	10.214	1000

Figura 14

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Pureza cromatográfica de las señales de interés determinada por detector de arreglo de diodos.

Estándar de calibración al 100%

Acetato de Parametasona, tr = 7.989 min

Difenilamina, tr = 10.945 min

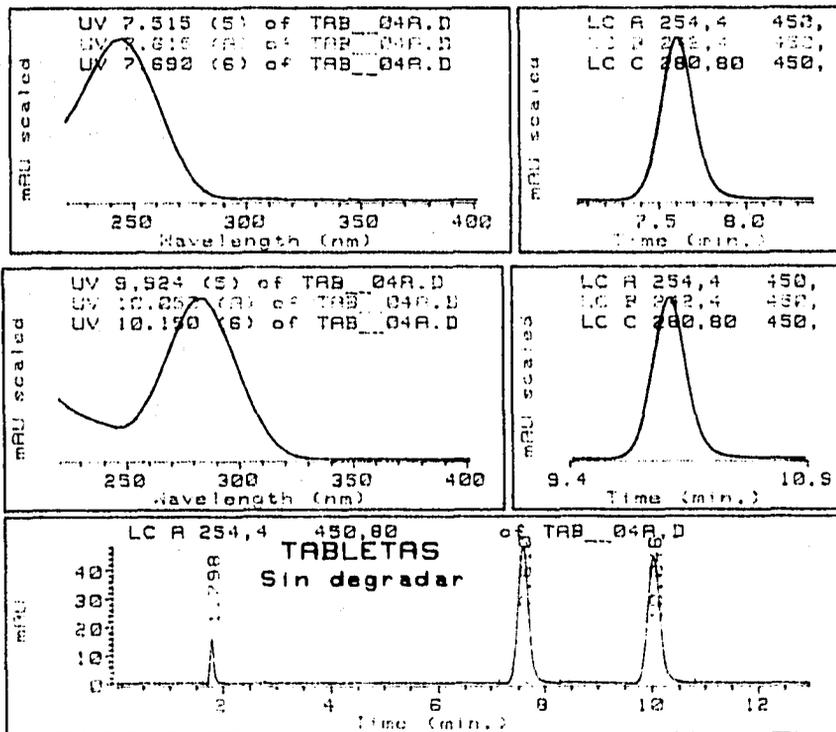
Figura 15

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Pureza cromatográfica de las señales de interés determinada por detector de arreglo de diodos.

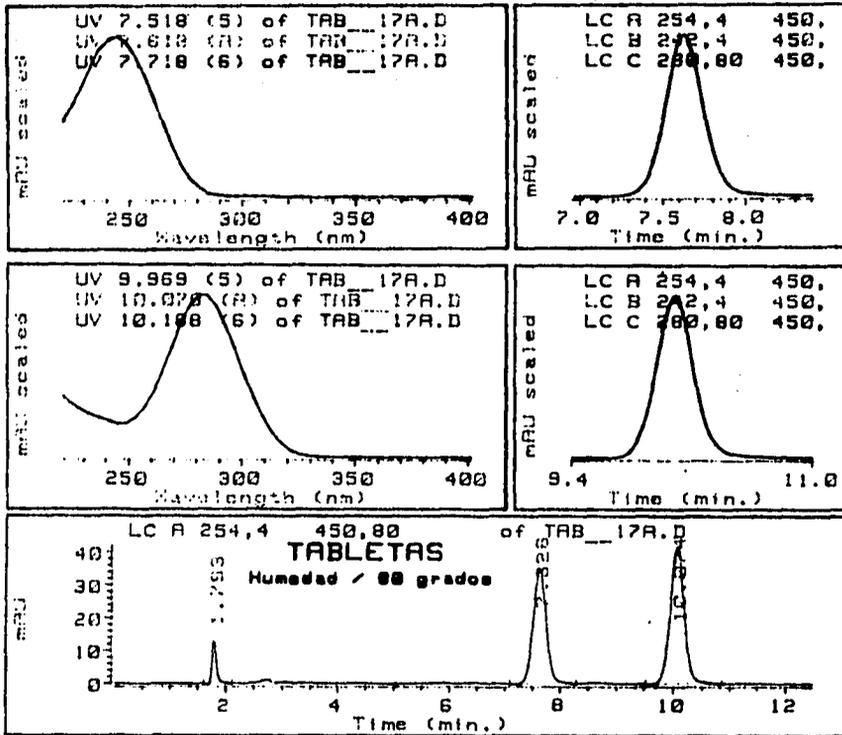
FORMULACION DE TABLETAS

a) Sin degradar



FALLA DE ORIGEN

b) Humedad / 80°C



Polividona K, tr = 1.793 min
 Acetato de Parametasona, tr = 7.626 min
 Difenilamina, tr = 10.074 min

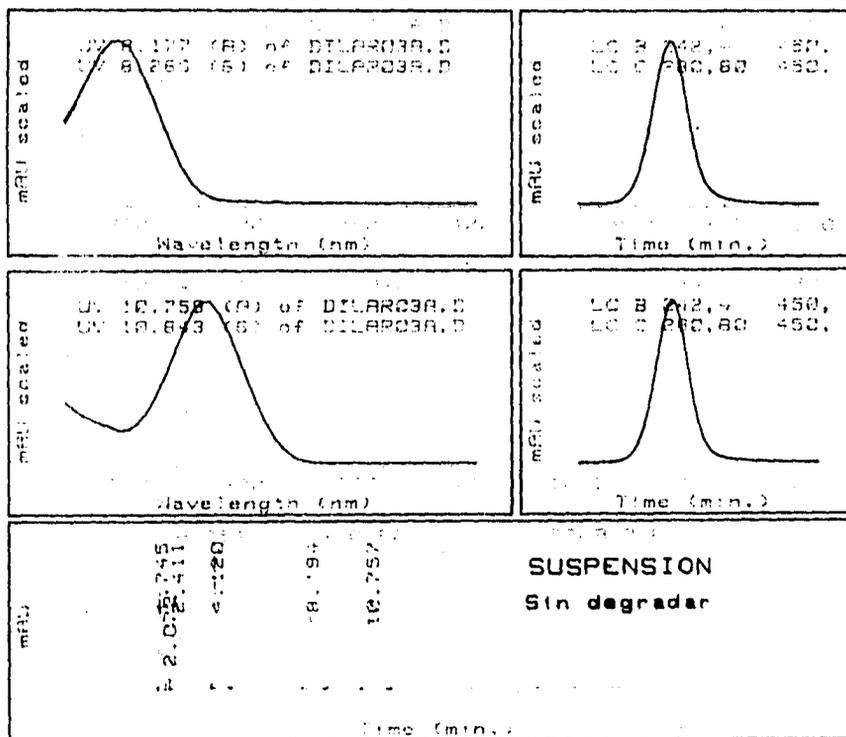
FALLA DE ORIGEN

Figura 16

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Pureza cromatográfica de las señales de interés determinada por detector de arreglo de diodos.

FORMULACION DE SUSPENSION.

a) Muestra sin degradar

Colorante, tr = 1.745 min

EDTA, tr = 2.072

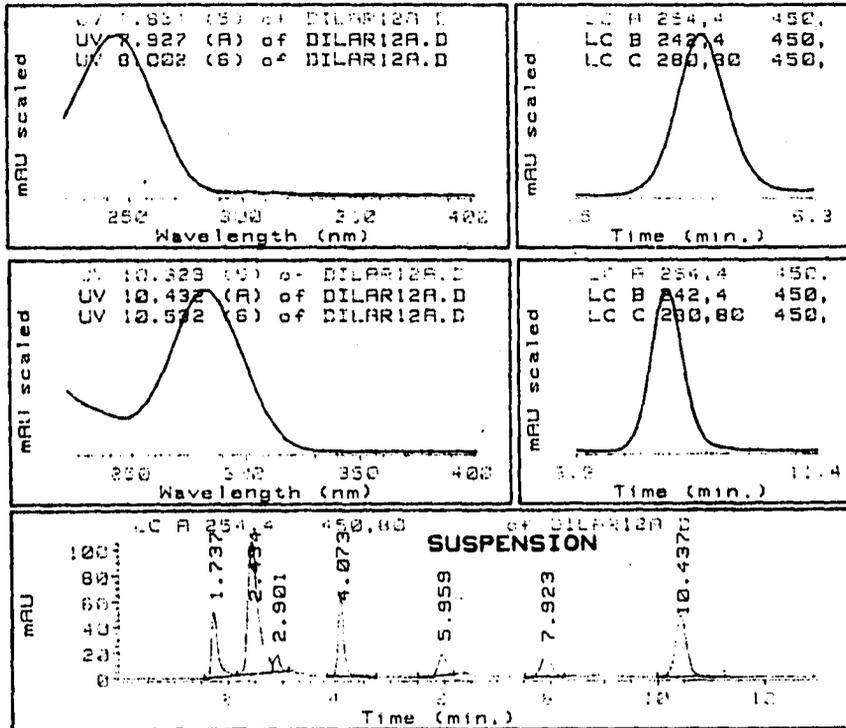
Acido cítrico, tr = 2.411 min

Benzoato de sodio, tr = 4.120 min

Acetato de Parametasona, tr = 8.194 min

Difenilamina, tr = 10.757 min

FALLA DE ORIGEN

b) Hidrólisis básica / 80 °C

Colorante, $t_r = 1.737$ min Benzoato de sodio, $t_r = 4.073$ min

Acetato de Parametasona, $t_r = 7.923$ min

Acido cítrico, $t_r = 2.454$ min

Difenilamina = 10.437 min

Producto de degradación, $t_r = 2.901$ min

Producto de degradación, $t_r = 5.959$ min

Los productos de degradación formados no interfieren en la cuantificación de Acetato de Parametasona y Difenilamina.

FALLA DE ORIGEN

8. TOLERANCIA

A. Modificaciones del sistema de separación: fase móvil y columna.

A.1 Efecto de la composición de la fase móvil.

a. Efecto de la composición de la fase móvil.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la determinación del efecto de la proporción metanol-agua sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

Los cromatogramas obtenidos en las dos proporciones evaluadas se muestran en la figura 17, mientras que los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos se muestran en la tabla 24.

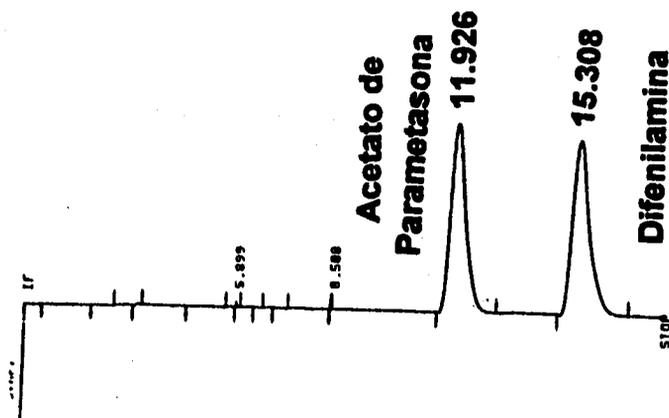
Figura 17

TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto de las proporciones de metanol - agua sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

Cromatogramas estándar 100%.

a) Fase móvil: metanol - agua, 62:38, pH = 3.8



b) Fase móvil: metanol - agua, 70:30, pH = 3.8

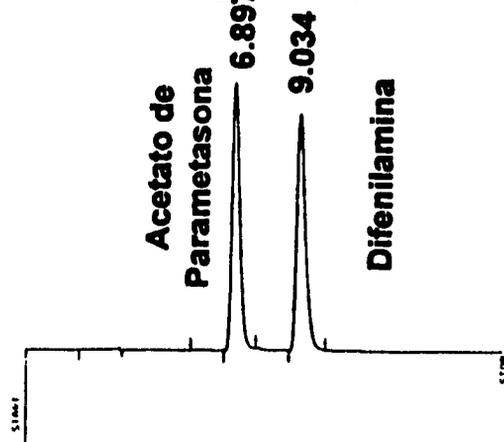


TABLA 24

TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto de las proporciones de metanol - agua sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

SEÑAL	Fase móvil		tr (min)	N	T	k'	R
	MeOH	H ₂ O					
Acetato de Parametasona	62	38	11.93	3556	1.18	2.76	3.93
Difenilamina			15.31	4430	1.28	3.82	
Acetato de Parametasona	66	34	8.47	3185	1.10	1.66	3.89
Difenilamina			11.27	3341	1.10	2.50	
Acetato de Parametasona	70	30	6.89	3296	1.20	1.15	4.03
Difenilamina			9.02	3872	1.14	1.82	

* Las líneas sombreadas indican los resultados obtenidos bajo las condiciones establecidas en el método analítico.

De manera general se observa lo siguiente, con respecto a los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos con la fase móvil del método:

- La fase móvil compuesta de metanol - agua en proporciones de 62:38 respectivamente y pH = 3.8 ± 0.05 , aumenta de manera importante el número de platos teóricos (N), el factor capacidad (k') y la resolución (R) de las señales de interés, sin embargo,

aumenta también el factor de coleo (T) de las mismas, especialmente de la señal de Difenilamina.

- La fase móvil compuesta de metanol - agua en proporciones de 70:30 y $\text{pH} = 3.8 \pm 0.05$, aumenta ligeramente el número de platos teóricos (N) y la resolución (R) de las señales de interés, sin embargo, aumenta también el factor de coleo (T) y disminuye además, el factor capacidad (k') de las mismas.

De acuerdo con los resultados obtenidos se propone tentativamente, que la fase móvil puede ser ajustada entre 65% - 68% de MeOH y 35% - 32% de agua con el fin de obtener mayor resolución (R), aumento de platos teóricos (N) y un factor de coleo (T) menor a 1.2 para las señales cromatográficas de interés.

El efecto de la proporción metanol - agua sobre el factor capacidad (k') fue evaluado gráficamente. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 25 y en la figura 18. De acuerdo con ellos, no existe inversión de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina en el intervalo de proporción evaluado y el factor capacidad (k') disminuye al aumentar el % de metanol en la fase móvil.

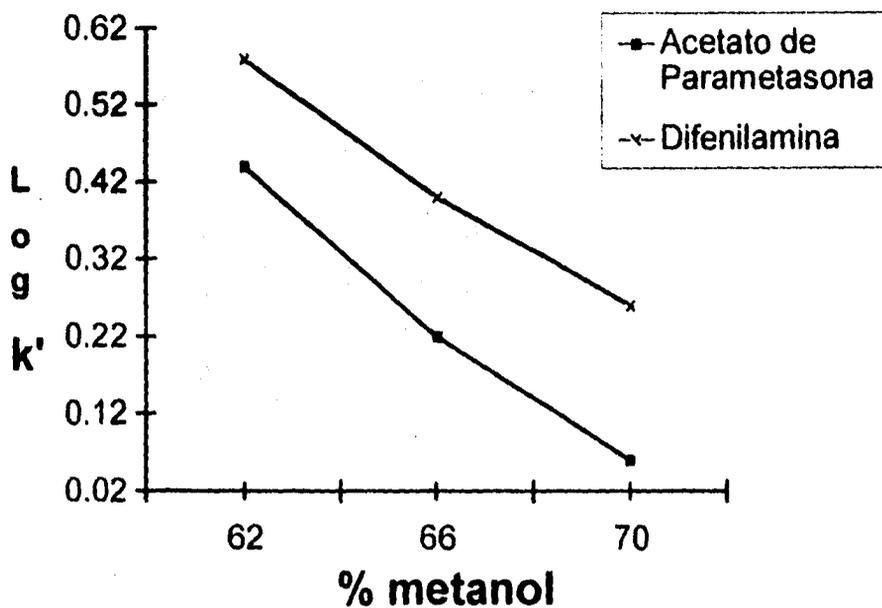
TABLA 25. TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto de la proporción de MeOH sobre el factor capacidad (k').

Señal	Log k'		
	62 % MeOH	66 % MeOH	68 % MeOH
Acetato de Parametasona	0.44	0.22	0.06
Difenilamina	0.58	0.40	0.26

Figura 18

Representación gráfica del efecto de la proporción MeOH sobre el factor de capacidad (k').



b. Efecto del pH.

A continuación, en la figura 19 se presentan los cromatogramas obtenidos para los dos valores de pH evaluados y en la tabla 26, se muestran los valores de los parámetros cromatográficos de las señales de interés en función del pH.

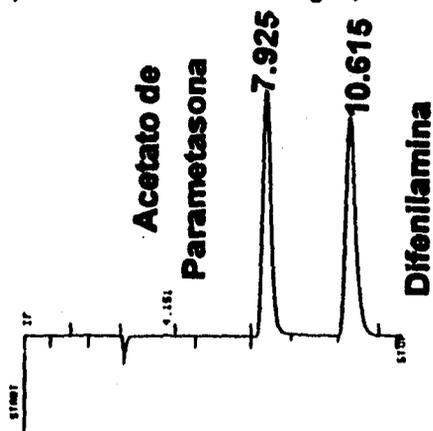
Figura 19

TOLERANCIA DEL METODO

Efecto del pH sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

Cromatogramas de estándar 100%.

a) Fase móvil: metanol - agua, 66:34, pH = 3.3



b) Fase móvil: metanol - agua, 66:34, pH = 4.2

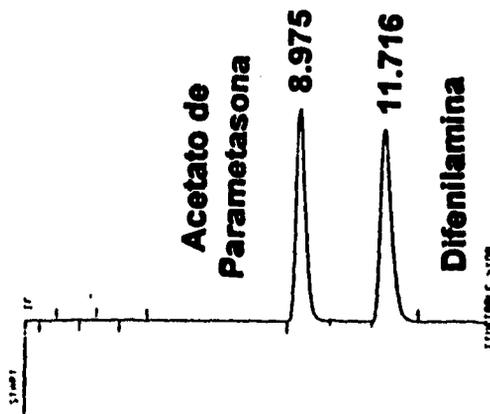


TABLA 26. TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto del pH sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

SEÑAL	pH de la fase móvil	tr (min)	N	T	k'	R
Acetato de Parametasona	3.3	7.92	3200	1.16	1.61	4.56
Difenilamina		10.62	4686	1.28	2.50	
Acetato de Parametasona	3.8	8.47	3185	1.10	1.66	3.89
Difenilamina		11.27	3341	1.10	2.50	
Acetato de Parametasona	4.2	8.98	3147	1.06	1.82	2.03
Difenilamina		11.72	4357	1.17	2.68	

* Las líneas sombreadas indican los resultados obtenidos bajo las condiciones establecidas en el método analítico.

De manera general se observa lo siguiente, con respecto a los valores de los parámetros cromatográficos obtenidos con el pH de la fase móvil del método:

- Una disminución de 0.5 unidades en el pH de la fase móvil produce incremento en la resolución (R) de las señales cromatográficas, sin embargo, aumenta también el factor de coeico (T) de las mismas.
- Un incremento de 0.4 unidades en el pH de la fase móvil disminuye el factor de coeico (T) de las señales

de interés, sin embargo, disminuye significativamente la resolución (T) entre las mismas.

- El número de platos teóricos (N) para Acetato de Parametasona no se modifica en el intervalo de pH evaluado, mientras que el de Difenilamina aumenta, especialmente a pH = 3.3

De acuerdo con los resultados obtenidos se propone tentativamente que el pH de la fase móvil sea ajustado entre $\text{pH} = 3.8 \pm 0.2$ para aumentar la resolución entre las señales de interés, sin que se vean afectados de manera importante los parámetros cromatográficos adicionales de las mismas.

El efecto del pH de la fase móvil sobre el factor capacidad (k') de las señales de interés fue evaluado gráficamente. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 27 y gráficamente en la figura 20. En ellos, se observa que no existe inversión de las señales de interés en el intervalo de pH evaluado y que el factor capacidad, (k'), aumenta al aumentar el pH de la fase móvil.

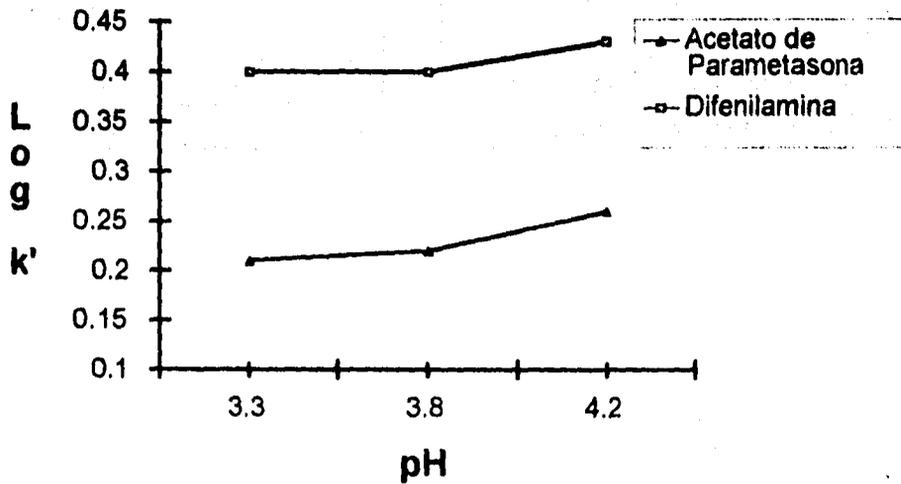
TABLA 27. TOLERANCIA DEL METODO

Efecto del pH sobre el factor capacidad (k').

SEÑAL	Log k'		
	pH = 3.3	pH = 3.8	pH = 4.2
Acetato de Parametasona	0.21	0.22	0.26
Difenilamina	0.40	0.40	0.43

Figura 19

Representación gráfica del efecto del pH sobre el factor de capacidad (k').



A.2 Efecto de modificaciones de la columna.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la determinación del efecto de la columna sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

En la tabla 28 se muestran las características de las columnas evaluadas y en la figura 21, se presentan los cromatogramas obtenidos para cada una de ellas. Los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos se encuentran en la tabla 29.

TABLA 28. Características de las columnas evaluadas.

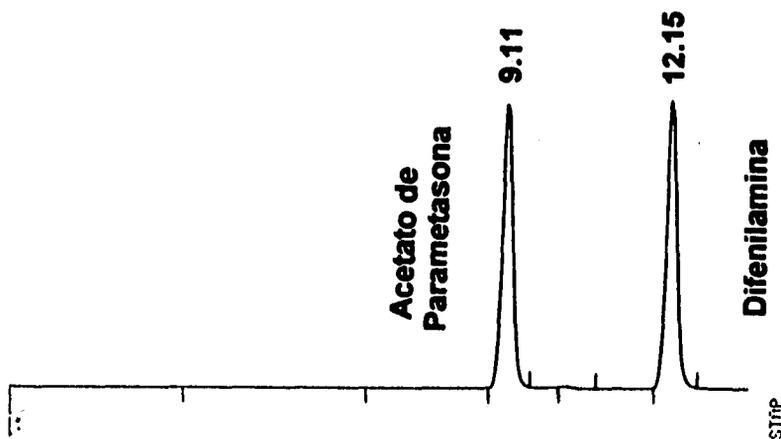
Material de empaque	Forma y tamaño de partícula	Area superficial (mL/g)	% C (m ² /g)	% cubierto con fase enlazada
Hypersil ODS	esférica, 5 μ	170	10	2.84
Adsorbosphere C ₁₈	esférica, 5 μ	200	12	2.99
Spherisorb ODS-1	esférica, 5 μ	220	7	1.47
μ Bondapak C ₁₈	irregular, 10 μ	330	10	1.46
Lichrosphere RP-8	esférica, 5 μ	350	--	--

Figura 21

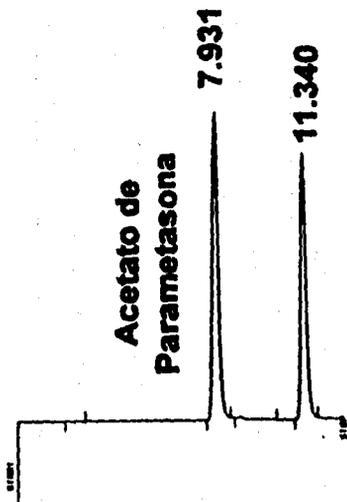
TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto de modificaciones de la columna.

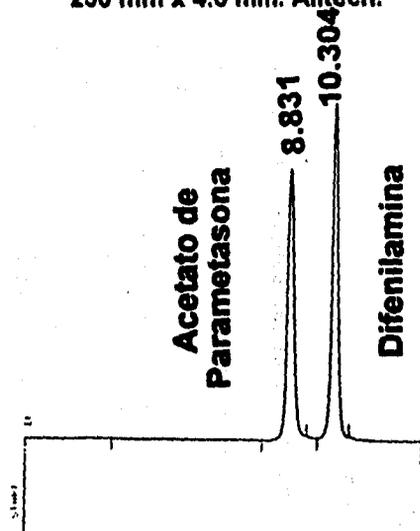
Cromatogramas estándar 100%.

A) Hypersil ODS, 5 μ , 250 mm x 4.6 mm. Alltech.

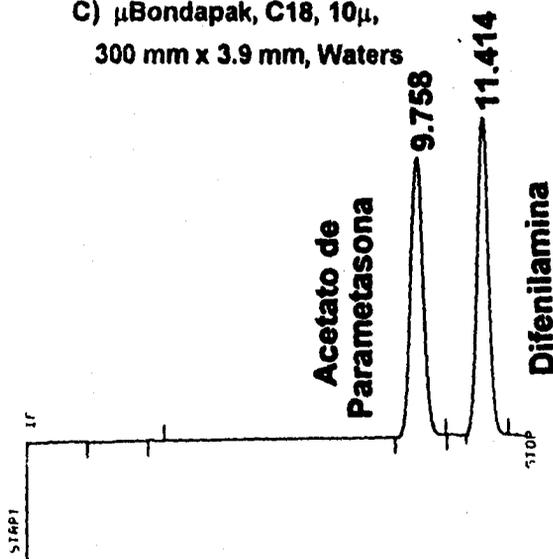
B) Adsorbosphere, C18, 5 μ ,
250 mm x 4.6 mm. Alltech



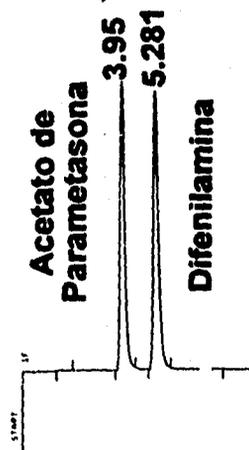
C) Shperisorb ODS-1, 5 μ ,
250 mm x 4.6 mm. Alltech.



C) μ Bondapak, C18, 10 μ ,
300 mm x 3.9 mm, Waters



D) LiChrosphere, RP-8, 5 μ ,
150 mm, Merck.



La columna Adsorbosphere proporciona señales finas y excelentes valores para cada uno de los parámetros cromatográficos evaluados.

TABLA 29

TOLERANCIA DEL METODO.

Efecto de la columna sobre los parámetros cromatográficos de las señales de interés.

SEÑAL	COLUMNA	tr (min)	N	T	k'	R
Acetato de Parametasona Difenilamina	Hypersil ODS, 5 μ , 25 cm. Alltech.	8.47	3185	1.10	1.66	3.89
		11.13	3341	1.10	2.50	
Acetato de Parametasona Difenilamina	Adsorbosphere, C ₁₈ 5 μ , 25cm, Alltech.	7.93	5198	1.00	1.89	7.93
		11.34	11664	1.07	3.14	
Acetato de Parametasona Difenilamina	Spherisorb, ODS-1 5 μ , 25 cm Alltech.	8.83	4791	1.02	1.97	4.67
		10.29	10078	0.98	2.46	
Acetato de Parametasona Difenilamina	μ Bondapak, C ₁₈ 10 μ , 30 cm Waters.	9.71	3928	1.07	2.14	2.73
		11.37	5940	1.00	2.68	
Acetato de Parametasona Difenilamina	LiChrospher, RP-8 5 μ . Merck.	3.96	1645	1.19	1.60	3.32
		5.28	2655	1.14	2.47	

De manera general se observa que todas las columnas evaluadas presentan parámetros cromatográficos satisfactorios para las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina, conservándose el orden de elución establecido en el método.

B. Estabilidad de soluciones analíticas.

b.1 Soluciones estándar de calibración.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 30 y 31, para temperatura ambiente y 5 °C, respectivamente. El valor de DER en ambos casos es menor de 1.5%, lo cual indica que las soluciones estándar de calibración pueden ser utilizadas por lo menos durante 72 horas después de su preparación, siendo mantenidas a temperatura ambiente ó a 5 °C sin comprometer la exactitud del método.

TABLA 30. TOLERANCIA DEL METODO.

Estabilidad de soluciones analíticas.

% Acetato de Parametasona en soluciones estándar de calibración. Temperatura ambiente.

Solución estándar de calibración (%)	Tiempo			
	Análisis inicial	24 horas	48 horas	72 horas
80	100.20	99.40	98.00	97.90
100	99.52	101.52	99.92	98.32
120	99.60	98.73	98.13	96.67

media = 98.99%

DE = 1.29

DER = 1.30%

n = 12

TABLA 31. TOLERANCIA DEL METODO.

**Estabilidad de soluciones analíticas.
% Acetato de Parametasona en soluciones
estándar de calibración. 5 °C.**

Solución estándar de calibración (%)	Tiempo			
	Análisis inicial	24 horas	48 horas	72 horas
80	99.42	99.14	99.90	97.32
100	99.11	100.08	98.79	97.26
120	98.74	98.80	100.60	98.27

media = 99.04%

DE = 1.04

DER = 1.05%

n = 12

b.2 Soluciones muestra.

En la tabla 32 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la estabilidad de soluciones muestra de tabletas y de suspensión, a temperatura ambiente y a 5 °C. Los valores de DER obtenidos son menores de 1.5% .

TABLA 32. TOLERANCIA DEL METODO.

Estabilidad de soluciones analíticas.

% Acetato de Parametasona en soluciones muestra. T.A y 5 °C.

TIEMPO (horas)	TABLETAS 1 mg		SUSPENSION 0.2 mg/mL	
	T.A.	5 °C.	T.A.	5 °C.
0	97.57 98.45 97.32	97.86 98.73 98.43	95.79 96.26 95.16	95.90 96.92 95.72
24	96.93 97.17 97.30	94.77 96.58 96.74	97.56 97.70 96.66	98.34 99.05 97.80
48	97.73 98.55 98.61	99.00 98.26 98.34	96.81 97.58 95.94	97.99 97.46 98.59
72	97.26 98.29 98.08	98.91 97.44 97.18	96.25 97.07 95.44	97.93 98.30 97.41
Parámetros estadísticos	media = 97.77% DE = 0.59 DER = 0.60%	media = 97.69% DE = 1.23 DER = 1.26%	media = 96.25% DE = 0.85 DER = 0.88%	media = 97.62% DE = 1.02 DER = 1.04%

140

VI. DISCUSION DE RESULTADOS.

Las propiedades fisicoquímicas del Acetato de Parametasona, especialmente la absorbancia a $\lambda = 254$ nm y la solubilidad y estabilidad en metanol, permitieron el desarrollo de un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta presión para cuantificar este principio activo en tabletas y en suspensión. La metodología establecida es sencilla, rápida y de fácil implementación, en el estudio de estabilidad de Acetato de Parametasona.

La confiabilidad de la metodología propuesta fue evaluada estadísticamente en función de los parámetros de linealidad, exactitud y precisión del método:

- **Linealidad.**

La linealidad del sistema se determinó a través del coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración de Acetato de Parametasona en el intervalo de 70 a 120%. El valor obtenido de r indica que el detector y en general las condiciones de trabajo, generan una correlación lineal entre la concentración y el factor de respuesta de Acetato de Parametasona en el intervalo de concentraciones analizadas.

La linealidad del método se determinó a través de los parámetros de pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación de la gráfica de % de Acetato de Parametasona recuperado en función del % adicionado.

Los valores obtenidos para la pendiente son cercanos a 1 y el intervalo de confianza al 95% incluye el valor de 1.00. Por otra parte, el valor del intercepto de la recta de regresión es menor de cero en el caso de las tabletas y mayor de -1 para la suspensión, sin embargo, en ambos casos, el intervalo de confianza al 95% incluye el valor de cero. Los valores del intercepto pueden ser atribuibles al efecto del placebo de la formulación, debido a que el obtenido en la linealidad del sistema es cercano a cero. Los valores de coeficiente de correlación de las gráficas de la linealidad del método son mayores a 0.999.

En base a lo anterior, el método analítico tiene la capacidad de generar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de Acetato de Parametasona en el intervalo de concentraciones analizadas, siendo así un método lineal.

- **Exactitud.**

La exactitud del método se evaluó a través de la media de recobro obtenida en los placebos adicionados. Los valores obtenidos son cercanos a 100% y los intervalos de confianza al 95% se encuentran en un intervalo de 99.5% - 100.5%. Por lo tanto, los resultados obtenidos a través de la aplicación del método son exactos.

La comparación de la cuantificación del método por áreas y alturas fue realizada estadísticamente. Los resultados indican que los dos métodos de integración pueden ser utilizados para el análisis de Acetato de Parametasona en tabletas. Mientras que para la suspensión, los resultados obtenidos indican que el Acetato de

Parametasona debe ser cuantificado únicamente por áreas. La diferencia en estos resultados puede ser debida a que la integración de alturas es más susceptible a las variaciones instrumentales.

- **Precisión.**

La precisión del método fue determinada como repetibilidad y reproducibilidad. Debido a que este parámetro es una medida del grado de dispersión de los resultados analíticos obtenida al aplicar repetidamente el método, la precisión fue evaluada en función de la desviación estándar relativa (DER).

En la precisión del sistema se obtuvo una DER menor de 0.5%, por lo tanto, el sistema cromatográfico: bomba, inyector y detector es repetible y genera una contribución mínima al error del método.

El valor de DER obtenido para la repetibilidad del método fue menor de 1% para tabletas y suspensión, lo cual indica que el error de método es bajo y puede ser aplicado a varios muestreos obteniendo resultados repetibles.

Por otro lado, la DER obtenida en la reproducibilidad fue menor de 1.5% cumpliéndose con el criterio de aceptación establecido en el procedimiento de validación aplicado⁵⁶. Los resultados del análisis de varianza para la suspensión fueron satisfactorios indicando que la variación de analista a analista y de día a día no es significativa en el análisis, sin embargo, los resultados para las tabletas, indican que el método no es reproducible por un analista en dos días diferentes; este resultado puede ser atribuido a

errores aleatorios cometidos por el analista 1 en el día 1 de precisión, considerando que el error experimental del método es bajo y que los valores de DER obtenidos por cada analista en cada día de trabajo son menores a 1%.

Uno de los aspectos más importantes de la validación, fue la determinación de la especificidad, debido a que el método será aplicado en estudios de estabilidad. La especificidad del método fue demostrada ante excipientes, materia prima de Acetato de Parametasona y formulación de tabletas y de suspensión, sin degradar y sometidos a condiciones drásticas de degradación. Los cromatogramas obtenidos no muestran señales que interfieran en la cuantificación de Acetato de Parametasona y Difenilamina. El análisis por detector de arreglo de diodos a diferentes longitudes de onda, permitió corroborar que no se presenta coelución de productos de degradación en los tiempos de retención de las señales de interés. Por lo tanto, el método es capaz de diferenciar a la molécula intacta de Acetato de Parametasona de excipientes, de sustancias relacionadas y de productos de degradación, siendo así un método indicador de estabilidad.

Los resultados obtenidos en la determinación de tolerancia indican que el sistema cromatográfico permite ajustes de las proporciones de metanol - agua y de pH de la fase móvil, así como de la columna, lográndose en algunos casos optimizar los parámetros cromatográficos de las señales de Acetato de Parametasona y Difenilamina; sin embargo, la modificación del sistema cromatográfico establecido en el método durante estudios de estabilidad, está sujeta a la demostración de la especificidad del mismo.

Por otra parte, el método permite utilizar las soluciones estándar y las soluciones muestra preparadas, por lo menos durante un intervalo de 72 horas después de su preparación, sin comprometer la exactitud del mismo.

Finalmente, el método analítico propuesto es capaz de detectar y cuantificar cantidades pequeñas de Acetato de Parametasona, el nivel de ruido generado en el sistema cromatográfico es muy bajo, por lo tanto, puede ser utilizado como base para el desarrollo de métodos de limpieza de equipos de fabricación y para el análisis de muestras contaminadas por Acetato de Parametasona.

146

VII. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta presión para la cuantificación de Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL, cumpliéndose así los objetivos establecidos al inicio de este trabajo.

La validación estadística señala que el método propuesto es lineal, exacto, preciso, robusto (tolerancia) y altamente sensible. Es también un método indicador de estabilidad, por lo tanto, puede ser aplicado en estudios de estabilidad de Acetato de Parametasona en tabletas de 1 mg y suspensión de 0.2 mg/mL.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto la importancia de la aplicación de la cromatografía de líquidos en el desarrollo de métodos analíticos y de la validación, como herramientas fundamentales en la obtención de métodos sencillos, rápidos y confiables para la determinación cuantitativa de principios activos en preparados farmacéuticos, durante estudios de estabilidad.

148

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Fundamentos de Cromatografía de gases. Centro Educativo Analítico, Hewlett-Packard. México, 1988.
2. Mc Nair, H. A.; Esquivel, B. H. Cromatografía líquida de alta presión. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, OEA. Washington D.C., 1980.
3. Yost, R. W.; Ettre, L. S.; Conlon, R. D. Introducción a la Cromatografía líquida práctica. Perkin-Elmer Corporation. USA, 1978.
4. Curso de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia. ENEP Zaragoza. Mayo, 1992.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta edición. México, 1988.
6. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. Introduction to modern liquid chromatography. Second edition. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA, 1979.
7. Bidlingmeyer, A. Practical HPLC methodology and applications. John Wiley and Sons, Inc. USA, 1992.
8. Willard, H. H. Métodos instrumentales de análisis. Segunda edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México, 1991.
9. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Centro Educativo Analítico, Hewlett-Packard. México, 1988.

10. Ravindranath, B. Principles and practice of chromatography. Ellis Harwood Limited. Great Britain, 1989.
11. Huber, L. Good Laboratory Practice. A primer for high performance liquid chromatography, capillary, electrophoresis, and UV-Visible spectroscopy. Hewlett Packard. Germany, 1993.
12. The United States Pharmacopeia, USP XXII. USA, 1990.
13. Guerra, J. "Validation on analytical methods by FDA laboratories". *Pharmaceutical Technology*. 10 (3) 74-84, (1986).
14. Hokanson, C. "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I. The initial method validation process". *Pharmaceutical Technology* 18(9), 118-130, 1994.
15. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Secretaría de Salud. México, 1991.
16. Current concepts for the validation of analytical methods of compendial assays. *Pharmacopeial Forum*. Mar-Apr., 1986.
17. Gazdag & Szepesi. Selection of high performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis III. Method validation. *Journal of Chromatography*, 464, 265-278, 1989.
18. Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica. Asociación Farmacéutica Mexicana, AC. Mayo, 1994.

19. Guidelines for the analytical validation of HPLC methods. Pharmacopeial Forum, 1982.
20. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico: el error sistemático constante. Segunda parte. *Pharma News*, 173, 24-25, 1993.
21. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology. 1993.
22. Cairns, T; Rogers, W. M. Acceptable analytical data for trace analysis. *Analytical Chemistry*. 55(1), 54A-57A, 1983.
23. Hokanson, C. "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II: Changes and the need for additional validation". *Pharmaceutical Technology*, 18(10), 92-100, 1994.
24. Inman, L.; Frischman, J. K.; et al. "General method validation guidelines for pharmaceutical samples". *Journal of Chromatography Sciences* 25, 252-256, 1987.
25. Manzanares García, M. E. Comparación de dos métodos cromatográficos específicos para la cuantificación de Acetato de Parametasona en dos presentaciones farmacéuticas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México, 1982.

26. Goodman, G; Rall, T. W., et al. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava edición. Editorial Médica Panamericana. México, 1991.
27. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 18th Edition. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania. USA, 1990.
28. Walters, M. J.; Dunbar, W. E. "High performance liquid chromatographic analysis of hydrocortisone drug substance, tablets and enema". *J. Pharm Sci.*, 1982, 71(4), 446-451.
29. Williams, P. A.; Biehl, E. R. "High pressure liquid chromatographic determination of corticosteroids in topical pharmaceuticals". *J. Pharm Sci.*, 1981, 70(5), 530-534.
30. Graham, R. E.; Kenner, C. T. "Absorbance-pH relationship in the steroid tetrazolium reaction". *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62(1) 103-107.
31. Oteiza, R. M.; Wooten, R. S.; Kenner, C. T.; Graham, R. E.; Biehl, E. R. "Kinetics and mechanism of blue tetrazolium reaction with corticosteroids". *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66(10), 1385-1387.
32. Graham, R. E.; Biehl, E. R.; Kenner, C. T. "Rapid blue tetrazolium procedure for analysis of corticosteroids in pharmaceutical preparations". *J. Pharm. Sci* 1978, 67(6), 792-795.
33. Kleeman, W. P.; Bailey, L. C. "Simplex optimization of the blue tetrazolium assay procedure for α -ketol steroids". *J. Pharm. Sci.*, 1985, 74(6), 655-9.

34. Kiyoshi Tsuji. GLC and HPLC determination of therapeutic agents. Part 2. Marcel Dekker Inc. USA, 1978.
35. Landgraf, W. C.; Jennings, E. C. "Steroid determination from complex mixtures by high pressure chromatographic techniques". *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62(2), 276-281.
36. Van Dame, H. C. "Quantitative determination of steroid acetates in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1980, 63(6), 1184-1188.
37. C. A. 1986, 105:49172h. Shibata, K.; Kumakawa, Y.; Sekizuka, M.; Yoshitsugu, M. "Determination of corticoids in commercial preparations by micro high performance liquid chromatography". *Byoin Yakugaku* 1986, 12(1), 14-20.
38. Ng, Linda L. "Reverse liquid chromatographic determination of dexamethasone acetate and cortisone acetate in bulk drug substances and dosage forms: method development. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987, 70 (5), 829-833.
39. C. A. 1991, 115:142433k. Shalaby, A.; Shahjahan, M. "Improved high performance liquid chromatographic method for the determination of some corticosteroids". *J. Liquid Chromatogr.* 1991, 14(7), 1267-1274.
40. C. A. 1992, 116:262618s. Su Hwei Chen, Shou Mei Wu, Hsin Lung Wu. "Stereochemical analysis of betamethasone and dexamethasone by derivatization and high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* 1992, 595(1-2), 203-208.

41. Choulis, N. H. "Separation and Quantitative Determination of prednisone, fluocinolone acetonide and paramethasone acetato using thin-layer chromatography". *Can. J. Pharm.Sci.* 1968, 3(3), 76.
42. C.A. 87:172942w. Marcos, J. M.; Moreno, J.; Pla Delfina, J. M. "In situ" chromatographic determination of antiinflammatory corticosteroids. *Cienc. Ind. Farm.* 1977, 9(4), 92-96.
43. C.A. 1990, 112:1014979y. Rohdewald, P.; Muller, Hans Dieter. "Identification of glucocorticoids in pharmacy laboratories". *Pz Wiss* 1989, 2(4), 199-205.
44. C. A. 1990, 113:640k. Lamparczyk, H.; Ochocka, R. J.; Zarzycki, P.; Zielinski, J. P. "Separation of steroids by reversed-phase HPTLC using various binary mobile phases". *J. Planar Cromatogr.--Mod. TLC* 1990, 3(1-2), 34-37.
45. C.A. 1993, 118:160199e. Szepesi, G. "The role of thin layer chromatography in steroids analysis". *J. Planar Chromatogr.--Mod. TLC.* 1992, 5(6), 396-407.
46. Fritz, S.; Schenk, G. H. *Química Analítica Cuantitativa. Tercera edición.* Editorial Limusa. México, 1989.
47. De Boer, H. S.; Lansaat, P. H.; Van Cort, W. J. "Polarographic analysis for corticosteroids. Part 2. Determination of corticosteroids in single component solution, suspensions, ointments and creams". *Anal. Chim. Acta.* 1979, 108, 389-93.
48. De Boer, H. S.; Lansaat, P. H.; Kooistra, K. R.; Van Oort, W. J. "Polarographic analysis for corticosteroids, Part 3. Determination of

- corticosteroids in single-component tablets". *Anal. Chim. Acta* 1979, 111(1), 275-9.
49. De Boer, H. S.; Lansaat, P. H.; Van Oort, W. J. "Polarographic analysis for corticosteroids, Part 4. Determination of corticosteroids in multicomponent and complex pharmaceutical preparations". *Anal. Chim. Acta* 1980, 116(1), 69-76.
 50. De Boer, H. S.; Van Oort, W. J.; Zuman, P. "Polarographic analysis for corticosteroids, Part 6. Mechanism of polarographic electroreduction of some Δ^4 -3- ketosteroids and $\Delta^{1,4}$ -3-ketosteroids. *Anal. Chim. Acta* 1981, 103(1), 11-32.
 51. Sbarbati de Nudelman, N. E. Estabilidad de medicamentos. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina, 1975.
 52. The Merck Index. Eleventh Edition. Published by Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., USA, 1989.
 53. Martindale. The Extra Pharmacopeia. Thirtieth Edition. Edited by James E. F. Reynolds. The Pharmaceutical Press. London, 1993.
 54. Physical Chemical Data. File number 12. Laboratorios Syntex. Palo Alto, California. USA, 1975.
 55. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. PLM. Edición 40. México, 1994.
 56. Procedimiento estándar de operación. "Validación de métodos de potencia". Laboratorio de Desarrollo Analítico, Syntex. Junio, 1994.

57. Anderson L. *Practical Statistics for Analytical Chemists*. Van Nostrand Reinhold. USA, 1987.
58. HP 1050 Series of HPLC modules installing and maintaining your variable wavelength detector. RFA, 1990.
59. Mollica, J. A.; Ahuja, S. "Stability of pharmaceuticals". *J.Pharm.Sci* 1978, 67, 442-65.
60. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Published by American Pharmaceutical Association, Washington D.C. USA, 1986.
61. Procedimiento estándar de operación. "Establecimiento de programas de estabilidad para productos nuevos". Laboratorio de Desarrollo Analítico, Syntex. Julio, 1993.
62. Hidaka, T.; et al. "Studies on betamethasone: behavior of betamethasone in acid or alkaline medium, photolysis and oxidation". *Yakugaku Zasshi*, 100(1), 72-80, 1980.

IX. ANEXOS

ANEXO A. FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DE UN METODO ANALITICO.

Intervalo de confianza al 95%

Pendiente

$$B \pm t_{\alpha/2, n-2} \frac{S_{Y \bullet X}}{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n}}$$

Ordenada al origen

$$A \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{Y \bullet X} \frac{1}{n} + \frac{X^2}{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n}}$$

Donde:

 $S_{Y \bullet X}$ = desviación estándar de Y en X.

$$S_{Y \bullet X} = \frac{n-1}{n-2} (S^2_Y - B^2 S^2_X)$$

$$S^2_X = \frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n-1}$$

$$S^2_Y = \frac{\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}}{n-1}$$

ANEXO B**FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD DE UN METODO ANALITICO****Intervalo de confianza al 95%**

$$X \pm t_{\alpha/2, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde :

- X** = media del % de recobro.
- s** = desviación estándar relativa.
- n** = número de determinaciones
- $t_{\alpha/2, n-1}$** = valor de t de tablas para una distribución de dos colas con $\alpha = 0.05$

ANEXO C

FORMULAS PARA COMPARAR LA CUANTIFICACION DE UN
METODO ANALITICO POR AREAS Y ALTURAS.**Prueba de t.**

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a : \mu_1 \neq \mu_2$$

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ calculada} = \frac{\sqrt{X_d}}{S_d}$$

Donde:

X_d = media de las diferencias de los % de recobro
por áreas y alturas.

S_d = desviación estándar de las diferencias.

Decisión estadística:

$$\text{Si } t_{\text{calc}} < t_{\alpha/2, n-1} \quad \alpha = 0.05$$

No existen diferencias significativas en los % de recobro obtenidos
por áreas y por alturas.

Prueba de F.Hipótesis a constatar:

$$H_a = S^2_1 = S^2_2$$

$$H_a = S^2_1 \neq S^2_2$$

Estadístico de contraste:

$$F \text{ calculada} = \frac{S^2_A}{S^2_H}$$

Donde:

S^2 = varianza de los % de recobro obtenidos por áreas (A) o alturas (H).

Decisión estadística:

$$\text{Si } F_{\text{calc}} < F_{\text{teórica}} \quad \alpha = 0.05$$

No existen diferencias significativas entre las varianzas de los % de recobro obtenidos por áreas y alturas.

ANEXO D

MODELO ESTADISTICO PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD DE UN METODO ANALITICO A TRAVES DE UN ANALISIS DE VARIANZA.

Para el caso particular de la determinación de la reproducibilidad efectuada por dos analistas en dos días diferentes y con tres réplicas cada uno, se realiza el análisis de varianza que se describe a continuación ¹⁵.

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la késima muestra analizada por el iésimo analista en késimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_j = efecto del analista en el ensayo (donde $j = 1 \dots a$).

$\delta_{j(i)}$ = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1 \dots d$).

$\varepsilon_{k(ij)}$ = error del método analítico (donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas (donde $a = 2$).

d = número de días (donde $d = 2$).

r = número de replicaciones (donde $r = 3$).

ANEXO D
(Continuación)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F 0.05
Analista (a)	a-1	$\frac{\sum Y_i^2}{dr} - \frac{Y^2}{adr}$	$\frac{SCa}{a-1}$	$\frac{MCa}{MCd}$	$\frac{gla}{gld}$
Día (d)	(d-1)a	$\frac{\sum \sum Y_{ij}^2}{r} - \frac{\sum Y^2}{dr}$	$\frac{SCd}{(d-1)a}$	$\frac{MCd}{MCE}$	$\frac{gld}{gle}$
Error (e)	(r-1)ad	$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y^2}{r}$	$\frac{SCe}{(r-1)ad}$	---	---