



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA
LA CUANTIFICACION DE KETOCONAZOL EN
TABLETAS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA PRESION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA LUISA PEREZ DURAN



MEXICO. D. F.

FEBRERO 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. INTRODUCCION.....	4
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	5
2.1 Validación.....	5
2.1.1 Definición.....	5
2.1.2 Linealidad.....	5
2.1.2.1 Linealidad del sistema.....	6
2.1.2.2 Linealidad del método.....	6
2.1.3 Precisión	7
2.1.3.1 Precisión del sistema.....	8
2.1.3.2 Precisión del método.....	8
2.1.4 Especificidad frente a excipientes.....	9
2.1.4.1 Métodos de control de calidad.....	10
2.1.4.2 Métodos indicativos de estabilidad.....	10
2.1.5 Exactitud.....	11
2.1.6 Estabilidad de la muestra.....	12
2.2 Cromatografía.....	13
2.1.2 Definición.....	13
2.2.2 Clasificación.....	13
2.2.3 Terminología empleada en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.....	18
2.2.3.1 Tiempo de retención, tiempo muerto, tiempo de retención ajustado, número de platos teóricos.....	18
2.2.3.2 Ancho de la base del pico, altura equivalente a plato teórico, velocidad lineal, coeficiente de distribución....	18
2.2.3.3 Relación de fases, factor de capacidad, resolución, selectividad.....	20
2.2.3.4 Eficiencia de la columna.....	21
2.2.3.5 Ecuación de resolución.....	22
2.2.4 Componentes de un cromatografo de líquidos...	23
2.2.5 Análisis cualitativo y cuantitativo.....	25
2.2.6 Ventajas y limitaciones del método.....	27

2.3 Ketoconazol.....	28
2.3.1 Nombre químico.....	28
2.3.2 Fórmula.....	28
2.3.3 Propiedades fisicoquímicas.....	29
2.3.4 Farmacología del ketoconazol.....	29
2.3.4.1 Absorción, distribución y bio- transformación del ketoconazol.....	29
2.3.4.2 Toxicidad.....	30
2.3.4.3 Dosis, vías de administración y presentaciones.....	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
5. HIPOTESIS.....	33
6. METODOLOGIA.....	34
6.1 Método general.....	34
6.1.1 Materiales.....	34
6.1.2 Reactivos.....	34
6.1.3 Equipo.....	34
6.1.4 Método.....	34
6.1.4.1 Condiciones cromatográficas.....	34
6.1.4.2 Preparación del estándar.....	35
6.1.4.3 Preparación de la muestra.....	35
6.1.4.4 Procedimiento.....	35
6.2 Evaluación del sistema.....	36
6.2.1 Linealidad del sistema.....	36
6.2.2 Precisión del sistema (Repetibilidad).....	36
6.3 Evaluación del método.....	36
6.3.1 Linealidad del método.....	36
6.3.2 Exactitud al cien por ciento.....	37
6.3.3 Estabilidad de la muestra.....	37
6.3.4 Especificidad.....	37
6.3.5 Precisión (Reproducibilidad).....	39

7. RESULTADOS.....	30
7.1 Linealidad del sistema.....	30
7.1.1 Evaluación de la ordenada al origen.....	44
7.1.2 Evaluación de la pendiente.....	45
7.1.3 Análisis de varianza.....	46
7.2 Precisión del sistema.....	48
7.2.1 Repetibilidad.....	48
7.3 Precisión del método.....	49
7.3.1 Reproducibilidad.....	49
7.4 Especificidad frente a excipientes.....	51
7.5 Linealidad del método.....	52
7.5.1 Evaluación de la ordenada al origen.....	54
7.5.2 Evaluación de la pendiente.....	55
7.5.3 Análisis de varianza.....	56
7.6 Exactitud del método.....	58
7.7 Estabilidad de la muestra.....	59
8. DISCUSION DE RESULTADOS.....	61
9. CONCLUSIONES.....	62
10. LISTA DE REFERENCIAS.....	66
11. BIBLIOGRAFIA.....	68

1. INTRODUCCION

Gracias a los avances tecnológicos, hoy día la industria farmacéutica así como otras industrias afines tienen como objetivo principal el asegurar un adecuado control de calidad tanto de materia prima, producto en proceso y producto terminado. Por lo cual la validación retrospectiva y prospectiva han tomado gran importancia en estas áreas.

El proceso de validación comprende una serie de pruebas sistemáticas mediante las cuales queda establecido de manera clara y objetiva, que el método estudiado reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal forma que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos de cuantificación.

La validación de los métodos analíticos, permite evaluar parámetros estadísticos como son la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad entre otros, con dichos parámetros podemos obtener información sobre la confiabilidad del método analítico. Por otra parte los parámetros que se deben cumplir para la validación de los métodos analíticos son establecidos por la Secretaría de Salud del país [México], y F.D.A. [Food and Drug Administration], por parte de organismos internacionales, los cuales han publicado una serie de normas y especificaciones legales que respaldan al método analítico, tomando esto como referencia, cada laboratorio lleva a cabo la validación del método analítico de acuerdo a sus necesidades.

El método analítico se considera validado únicamente para la formulación específica y dentro del intervalo de concentración estudiado.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 Validación

2.1.1 Definición

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se comprueba y certifica la aceptabilidad de dicha metodología para dar resultados analíticos confiables y reproducibles.

El proceso de validación para métodos analíticos nos indica el uso de estándares de referencia y placebos cargados para determinar la exactitud de los ensayos, donde el placebo cargado es el principio activo en cantidad exacta más la mezcla de excipientes en la cantidad correspondiente en la formulación. ^{4,7}

Los parámetros que se deben cumplir para la validación de un método analítico para un producto terminado son los siguientes: ^{8,p}

Linealidad

Linealidad del sistema

Linealidad del método

Precisión

Repetibilidad

Reproducibilidad

Especificidad frente a excipientes

Métodos de Control de Calidad

Métodos indicativos de estabilidad

Exactitud

Estabilidad de la muestra

2.1.2 Linealidad

La linealidad de un sistema o de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado, estos pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida. ¹

2.1.2.1 Linealidad del sistema. La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución estándar utilizando cuando menos cinco niveles y haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos, el nivel central debe de corresponder al 100% de la concentración esperada.

Se deberá elaborar una curva con los resultados obtenidos, con estos datos se calcularán los siguientes parámetros:

Media	\bar{X}
Desviación estándar	s
Coefficiente de variación	CV
Pendiente	B
Ordenada al origen	A
Coefficiente de correlación lineal	R
Error estándar de correlación	R _z

Criterio de aceptación:

CV	< 1.5 %
R	≥ 0.99
R _z	≥ 0.98
A	≈ 0.00
B	≈ 1.00

2.1.2.2 Linealidad del método. Se determina con placebos adicionados al principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente; se realiza con cinco niveles de concentración que corresponde generalmente a 80, 90, 100, 110 y 120 %, del valor esperado, haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos.

Para métodos donde no se ha establecido el valor esperado, el rango debera ser más extenso (50 a 150 %), la amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad y/o indicativo de estabilidad).

Deberá de llevarse a cabo por un mismo analista bajo las mismas condiciones de operación y utilizando el mismo equipo.

Con los datos obtenidos calcular:

Media
Desviación estándar
Coeficiente de variación
Pendiente
Ordenada al origen
Coeficiente de correlación lineal
Error experimental de regresión

También debe de construirse la curva y calcular la ecuación de la recta que indique un modelo lineal.

Criterio de aceptación:

Ordenada al origen	(A) \approx	0.0
Pendiente	(B) \approx	1.0
Coeficiente de correlación lineal	(R) \geq	0.999

El coeficiente de variación [CV], dependerá del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo en la muestra, como se observa en la tabla I.

Método	% C V
Cromatográfico	2.0
Químicos	3.0
Espectrofotométricos	3.0
Microbiológicos	3.0 a 5.0

Tabla I. Valores de Coeficiente de variación a considerar para la linealidad del método.

2.1.3 Precisión.

La precisión del método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación.

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

2.1.3.1 Precisión del sistema (Repetibilidad). Se determina por el análisis mínimo de seis muestras obtenidas de una misma solución estándar correspondiente al 100% de la concentración esperada, establecida en la linealidad del método.

Con los datos obtenidos se calcula:

Medía

Desviación estándar

Coefficiente de variación

Criterio de aceptación:

C.V. \leq 2%

2.1.3.2 Precisión del Método (Reproducibilidad). Es importante evaluar la influencia de la variación debida al método, cuando se analicen cantidades conocidas adicionadas del principio activo a un placebo y relacionarlas con el análisis del producto [forma farmacéutica], ya que la adición del ingrediente incluye un error experimental distinto a la variación existente entre el producto a ensayar.

Esta variación puede evaluarse conjuntamente con la reproducibilidad del método, por lo que se deberá preparar el placebo de acuerdo al procedimiento de manufactura normal con cantidades perfectamente conocidas y deben ser evaluadas por diferentes analistas para un estudio interanalista, bajo las mismas condiciones de operación, en diferentes días.

La evaluación de la reproducibilidad se hace con respecto a la tabla de análisis de varianza [ANADEVVA], la cual nos indica la fuente de variación que influye en la obtención de los resultados.

Se debe realizar por lo menos con dos analistas, los cuales deben llevar a cabo en un día el análisis por triplicado al 100% de la concentración y en otro día repetir el análisis de la muestra por triplicado, bajo las mismas condiciones del primer día. Deben de trabajar de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto a una concentración teórica del 100%.

Con los resultados obtenidos calcular:

Media
Coeficiente de variación
Desviación estándar
F de cálculo

Criterio de aceptación:

Los valores para el coeficiente de variación para los diferentes métodos se muestran en la tabla II:

Método	% C. V.
Microbiológicos	3 a 5 máx.
Titrimétricos	3 máx.
Espectrofotométricos	3 máx.
Cromatográficos	2 máx.

Tabla II. Valores de C.V. para evaluar la reproducibilidad

Criterio de aceptación:

$$F_{\text{analista}} (F_a) < F_{\text{tablas}} (F_{\text{tab.}})$$

$$F_{\text{día}} (F_d) < F_{\text{tablas}} (F_{\text{tab.}})$$

Este modelo es para un análisis de varianza con dos variables (analista, día), empleando un sistema completamente al azar con factores anidados para el análisis de varianza.

2.1.4. Especificidad frente a excipientes. Es la medida del grado de interferencia o ausencia de mezclas complejas en un análisis. Es la habilidad de un método analítico para evaluar una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés sin la interferencia de los componentes de la mezcla.

El parámetro de especificidad se realiza dependiendo de el tipo de método [control de calidad o indicativo de estabilidad].

2.1.4.1 Métodos de control de calidad. Se realiza de la siguiente manera:

- Analizar placebos del producto con el método propuesto.
- Identificar las respuestas del [los] activo[s], en caso de tenerla, y de otras sustancias auxiliares.
- En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebos "añadidos" de éstos y la sustancia de interés se analizan con el método propuesto.

Criterio de aceptación:

- Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.
- De no ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

2.1.4.2 Métodos indicativos de estabilidad. Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia, el analista que realice el estudio deberá de seleccionar aquel que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado u otro si así lo considera pertinente. La degradación debe de ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida de un 10 a un 50% con respecto al original.

- Colocar la sustancia de interés, el placebo y el placebo cargado en un horno a 70°C, 120°C ó a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días [2 a 4 semanas].
- Exponer la sustancia de interés, el placebo y el placebo cargado, a luz UV o a luz fluorescente y/o humedad.
- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de 2 a 4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis preparando soluciones de la[s] sustancia[s] de interés ajustando el pH de 1 a 2 y de 10 a 12 colocando las muestras a 60° o en un rango de 60°C a 80°C durante dos a cuatro semanas.

-Verificar la aparición de sustancias relacionadas [productos de degradación], utilizando por lo menos dos de cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: [Cromatografía de Líquidos de Alta Presión, Cromatografía de Gases, Cromatografía de Capa Delgada].

Criterio de aceptación:

- Verificar que cada producto de degradación pueda ser separado de la sustancia de interés y las sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.
- Ajustar la secuencia de operación para obtener la máxima resolución.
- De no ser así, optimizar el método ó desarrollar otro.

2.1.5. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de principio activo.

Se determina por el análisis de cuando menos seis placebos adicionados con el 100% del principio activo, de manera independiente por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Este modelo es para determinar la exactitud al 100% de la concentración de la cantidad calculada.

Otro diseño experimental es por medio de la determinación de placebos cargados, evaluando cinco niveles, esto se puede hacer directamente con los resultados de la linealidad del método cuando se hace un análisis por quintuplicado por cada nivel.

Con los resultados obtenidos calcular:

Media
Desviación estándar
Coeficiente de variación
Intervalo de confianza

Criterio de aceptación.

El coeficiente de variación expresa la desviación que existe entre una y otra muestra expresado en por ciento. En la tabla No III se muestran los valores de coeficiente de variación para la evaluación de la exactitud, dependiendo del método de cuantificación.

Método	% C. V.
Cromatografía de líquidos de alta presión.	2 máx.
Espectrofotométricos	2 máx.
Titrimétricos	3 a 5 máx.

Tabla III. Valores de Coeficiente de variación a considerar,
para evaluar la exactitud.

2.1.6 Estabilidad de la muestra

Son los requerimientos o condiciones a determinar a fin de que la muestra preparada mantenga constante su propiedad cuantificable, dentro de un cierto intervalo de tiempo establecido.

Al evaluar las muestras para su estabilidad, éstas son sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento, las muestras deben ser analizadas antes y después de almacenarse a un tiempo determinado, dependiendo de las condiciones que se fijen para su operación.

2.2 Cromatografía.

2.2.1 Definición

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria.¹⁰

La separación se lleva a efecto en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida. También se puede efectuar usando como fase estacionaria papel filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre una placa de vidrio. Estos tres tipos de cromatografía se basan en los mismos principios fundamentales, y se conocen respectivamente como cromatografía en columna, en papel y de capa fina.¹⁰ Para fines del presente trabajo solo se considerará la cromatografía en columna.

2.2.2 Clasificación

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, y según el caso se denominan respectivamente "Cromatografía Líquida" y "Cromatografía de Gases". Esta fase móvil fluye a través del relleno de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla, que son selectivamente retenidos por la fase estacionaria. El flujo de la fase móvil se mantiene constante a través de todo el proceso y de esta manera se logra que cada componente de la mezcla sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil. A esta técnica se le llama "cromatografía de elución".¹⁰ De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía, tal como se indica en el Figura 1

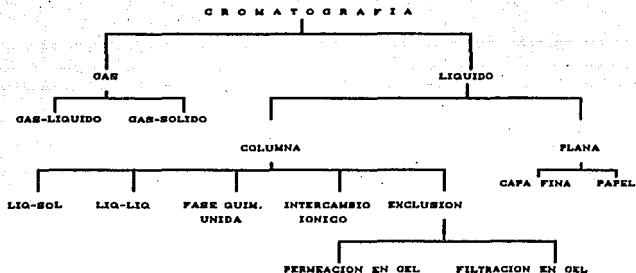


Figura 1 Clasificación general de la cromatografía

La cromatografía líquida en sus inicios consistió básicamente en una columna de vidrio, cuyo diámetro varía entre 2 y 10 cm, rellena de algún material, como sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a 200 μm . se introduce la fase disuelta en la fase móvil o disolvente por medio de un cuentagotas o de una pipeta, y después se agrega el disolvente, con el cual se eluye la muestra a través de la columna. Los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 g. o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se colecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido, que puede ser de horas o de días, otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra usualmente se adsorbe en forma irreversible.¹⁰

El problema principal de este tipo de cromatografía líquida es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna

disueltos en la fase móvil. Por lo general se usa alguna técnica auxiliar, como por ejemplo espectrofotometría, análisis químico, o simplemente un registro gravimétrico, para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas.¹⁰

La cromatografía de líquidos de alta presión utiliza columnas de diámetro muy reducido, aproximadamente 2 mm, rellenas de materiales especiales cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μm . y con frecuencia hasta de 5 ó 10 μm ., ya que estas columnas ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil es necesario emplear equipos de bombeo de alta presión. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que es necesario que el tamaño de la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10 mg. La muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa y válvulas de inyección.

El detector colocado a la salida de la columna registra la composición del líquido eluido obteniendo un cromatograma que se utiliza para la identificación y cuantificación de la muestra.

Un punto de gran importancia es que en la cromatografía de líquidos de alta presión es necesario que la muestra sea soluble en la fase móvil.

Hay cinco métodos de cromatografía de líquidos de alta presión basados en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra. Mediante el cambio de columnas es posible utilizar cada uno de los siguientes métodos dependiendo de las necesidades del análisis.¹⁰

a. Cromatografía Líquido - Líquido. Esta basado en la diferencia de solubilidad que presenta la muestra en cada una de las fases. Por lo que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella en tanto que los menos solubles son transportados más rápidamente por la fase móvil.

Esta técnica se utiliza para compuestos moderadamente polares. El mayor inconveniente de esta técnica es la solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil y el deterioro de la columna. Una manera de resolverlo es saturando la fase móvil con la fase estacionaria por medio de una precolumna que contenga un alto porcentaje de la fase estacionaria. Otra forma es utilizando materiales que contengan la fase estacionaria químicamente unida a un soporte, a modo de material de relleno de la

columna; esto evita la pérdida de la fase estacionaria y hace innecesario el uso de precolumnas para saturar la fase móvil. ¹⁰

Debido a lo anterior la cromatografía líquido-líquido, en la cual la fase estacionaria es sostenida físicamente sobre la superficie de un soporte, dentro de la columna, no suele ser muy empleada.

Por otra parte, la cromatografía líquido-líquido requiere un cuidadoso control del flujo y de la temperatura para poder lograr la identificación de un determinado compuesto en función del tiempo de elución que es característico, en las soluciones de flujo y temperatura utilizadas, del compuesto determinado. ¹⁰

b. Cromatografía de Fase Químicamente Unida. La fase estacionaria de esta técnica está químicamente unida a la superficie del soporte por lo que la fase móvil difícilmente produce deterioro en la columna.

Si se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria es posible obtener diferentes tipos de selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino ($-NH_2$) y el grupo nitrilo ($-CN$) en el caso de cromatografía de fase normal, o bien no polar como el grupo octilo ($-C_8H_{17}$), octadecilo ($-C_{18}H_{37}$), fenilo ($-C_6H_5$), etc. en el caso de la cromatografía de fase inversa.

La cantidad de fase estacionaria que es posible unir al soporte [generalmente partículas de sílice] es limitada y como consecuencia los tamaños de muestra separados en estas columnas son necesariamente reducidos, generalmente menores a 1 mg.

El mecanismo de separación de esta técnica no ha sido completamente claro hasta la fecha, es un mecanismo complejo, cuyas características son similares a la cromatografía líquido - sólido.

A medida que el número de sustancias a estudiar por medio de esta técnica ha ido en aumento, su popularidad ha crecido y hoy en día es quizás la más utilizada. ¹⁰

c. Cromatografía Líquido-Sólido. El mecanismo de separación de esta técnica se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y la fase móvil por ocupar los sitios activos de la superficie del sólido. Algunos de los sólidos utilizados son alúmina y gel de sílice.

Esta cromatografía es muy útil y se aplica a moléculas de baja o

mediana polaridad, de peso molecular no mayor a 1000 unidades. Las columnas usadas varían entre 15 y 25 cm de longitud y entre 2 y 3 mm de diámetro interno. La actividad de la superficie de muchos sólidos [incluyendo sílice] se ve con frecuencia afectada por la retención de ciertas moléculas de alta polaridad como alcoholes, fenoles, agua, etc. y debido a ello en ocasiones es difícil reproducir los resultados obtenidos en los análisis porque las propiedades de la superficie han sufrido cambios, en consecuencia, la superficie de la sílice empleada en cromatografía líquida de alta presión es habitualmente sometida a procesos de desactivación con el propósito de disminuir la retención de moléculas muy polares y de este modo se mantiene la superficie en condiciones uniformes, lo que contribuye a mejorar en forma notable la reproducibilidad de los análisis.

En muchas ocasiones, debido a una fuerte absorción o retención de los componentes de la muestra en el sólido activo es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme, con lo cual se logra un incremento de la solubilidad de los componentes de la muestra en la fase móvil. A esta variante se le denomina elución por gradiente ó programación de la fase móvil. A menos que se utilicen rellenos de columna que contengan la fase estacionaria químicamente unida a un soporte sólido es muy difícil en cromatografía líquido-líquido efectuar una programación de la fase móvil por el problema de solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil. 10

d. Cromatografía Líquida por Exclusión. Este tipo de cromatografía, conocido también como cromatografía de permeación o cromatografía de filtración, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de moléculas.

La columna se rellena de un gel, cuyos poros son de un tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros en tanto que las grandes no. El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar por cromatografía de exclusión varía desde aproximadamente 500 unidades e inclusive menos, hasta varios millones. Las columnas empleadas son muy largas [varios metros] y esto es especialmente cierto cuando se desea separar muestras cuyos pesos moleculares están distribuidos en intervalos muy amplios. Las dos variantes que existen en cromatografía de exclusión: cromatografía de permeación y cromatografía de filtración, no implican mecanismos de

separación diferentes y su división se debe a motivos puramente históricos. La cromatografía de filtración emplea materiales blandos, incapaces de resistir presiones mayores de 4 atmósferas y es muy aplicada en el estudio de los biopolímeros. En contraste, la cromatografía de permeación emplea materiales de relleno semirrígidos o rígidos, que pueden resistir presiones muy elevadas. ¹⁰

Aunque existen excepciones, la eficiencia de las columnas de cromatografía por exclusión es por lo general relativamente baja, por lo cual no es común en esta técnica obtener la separación de compuestos individuales, sino más bien fracciones de un cierto intervalo de pesos moleculares. El mecanismo de separación es tal que el tiempo de elución o retención es inversamente proporcional al peso molecular; las moléculas más pequeñas son las que son objetos de una mayor retención en la columna.

e. Cromatografía por Intercambio Iónico. La separación por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los grupos activos de la resina intercambiadora de iones.

Este tipo de separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio, ejemplos característicos de éstos son los péptidos y aminoácidos.

Las columnas varían entre 25 y 50 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro interno; el porqué estas columnas son más largas que las empleadas en otros tipos de cromatografía radica en la baja eficiencia de los materiales intercambiadores de iones. ¹⁰

2.2.3 Terminología empleada en cromatografía de líquidos de alta presión.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental, a continuación se mencionan los más utilizados, indicando en los casos pertinentes su importancia operacional y la forma en que son evaluados.

2.2.3.1 Tiempo de retención, tiempo muerto, tiempo de retención ajustado, número de platos teóricos.

a. Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en unidades de tiempo.

b. Tiempo muerto (t_0). Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

c. Tiempo de retención ajustado (t_r'). Es la diferencia entre t_r y t_0 , es decir de la medida de tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna.

d. Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es el equilibrio de la distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. N se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = \left(t_r' / W_b \right)^2$$

Donde W_b es el ancho de la base del pico. El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna.

2.2.3.2 Ancho de la base del pico, altura equivalente, velocidad lineal promedio, coeficiente de distribución.

a. Ancho de la base del pico (W_b). Es la porción de la línea basal interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de un pico, asumiendo que la forma del pico es gaussiana, esta anchura es

aproximadamente igual a cuatro veces el valor de la desviación estándar de una distribución gaussiana.

b. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT).

$$AEPT = L / N$$

Donde, L es la longitud de la columna, expresada en mm. Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce a un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud.

c. Velocidad lineal promedio de la fase móvil (u). Se expresa como:

$$u = L / t_0$$

Este parámetro de operación se usa cuando, se presenta esquemáticamente AEPT en función de u [gráficas de Van Deemter].

d. Coeficiente de distribución de reparto (K).

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra / ml de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra / ml de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura.

2.2.3.3 Relación de fases, factor de capacidad, resolución, selectividad.

a. Relación de fases (β). Se representa por:

$$\beta = \text{ml de fase móvil} / \text{ml de fase estacionaria}$$

Si este término se expresa de otra forma, se puede decir que, por cada sección de la columna, equivale a la porción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

b. Factor de capacidad (K'). Se expresa así:

$$K' = t_a / t_o$$

c. Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos, y se expresa así:

$$R = t_{r2} - t_{r1} / \left[1/2 (W_a + W_b) \right] = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / W_a + W_b$$

Todas las partes de esta ecuación deben ser expresadas en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa una separación completa, por lo tanto valores por debajo de este indicarían una mala separación de los solutos.

d. Selectividad (α). Valores elevados de alfa significan mejores separaciones, se expresa de la siguiente manera:

$$\alpha = t_{a2} / t_{a1}$$

En forma práctica se puede decir que alfa es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

2.2.3.4 Eficiencia de la columna. Al introducir una muestra en la columna ésta se presenta como un estrecho perfil de concentración a medida que la muestra se reparte entre la fase estacionaria y la fase móvil y es arrastrada por la última a través de la columna, se extiende en una concentración de perfil gaussiano o normal. Mientras más tiempo permanezca el pico en la columna más se ensancha, volviéndose más corto y más ancho pero sin perder su forma gaussiana. A la capacidad de la columna de proporcionar picos altos y delgados se le llama alta eficiencia de la columna y se mide calculando el número de platos teóricos.

2.2.3.6 Ecuación de resolución. La resolución es una medida de la capacidad que tiene la columna para separar dos picos y es definida como la distancia que hay entre el centro de los picos dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos como se observa en la Figura N. 2.

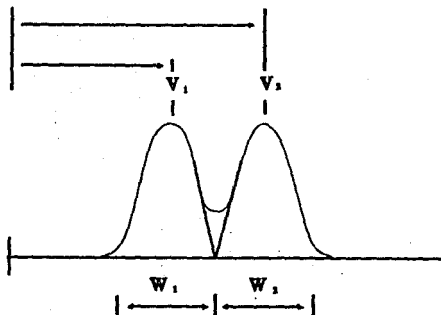


Figura 2 Gráfica típica de resolución o separación de dos componentes por una columna cromatográfica

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)}$$

Para el cálculo de la resolución se utilizan los picos más juntos, y si estos se pueden separar con éxito, todos los demás que estén contenidos en la muestra lo harán.

La resolución está relacionada con la eficiencia ya que al utilizar la fórmula como denominador el promedio de las anchuras de pico se maneja la velocidad de ensanchamiento de la banda en la columna y puede

medirse como el número de platos teóricos.

Una resolución igual a 1 se considera como una separación completa aunque en realidad es 98%. Cuando al $R = 1.5$ la resolución es completa y hay sólo una sobreposición de 0.3%. Una forma de explicar la resolución es observar que $R = 1.0$ es el número de picos que pueden acomodarse entre los picos de interés.

Tanto selectividad, como la eficiencia N y el factor de capacidad K están estrechamente ligadas a la resolución al utilizar la siguiente fórmula.

$$R = 1/4 \left[\alpha - 1 / \alpha \right] \left[N \right] \left[k' / 1+k' \right]$$

SELECTIVIDAD EFICIENCIA CAPACIDAD

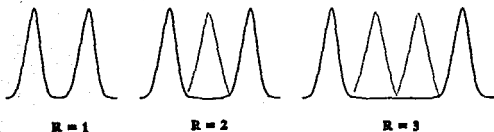


Figura 3 Los picos muestran como al aumentar numericamente la resolución la separación de los componentes es mayor.

2.2.4 Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

Los componentes esenciales encontrados en un instrumento para cromatografía de líquidos de alta presión incluye: una bomba, inyector columna, detector y registrador.

La columna está considerada como el corazón del sistema, la cual se encuentra rellena de fase estacionaria la cual está compuesta por partículas del tamaño de micras ($10^{-6} \mu$), y para lo cual es necesario una bomba de alta presión para transportar la fase móvil a través de la columna. El proceso cromatográfico empieza por la inyección del soluto en la columna. La separación ocurre al bombear la fase móvil y el soluto a

través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna es detectado ya sea por un detector universal o selectivo, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir.

La respuesta del detector para cada componente se manifiesta en una carta graficadora como un cromatograma. Para coleccionar, guardar y analizar los datos cromatográficos, estan siendo usados en conjunción con los graficadores, computadoras, integradores y otros equipos, para el procesamiento de datos. La señal producida se manifestará en forma de picos [Gaussianos] representando la concentración de los componentes eluidos. La calidad de la separación cromatográfica puede ser determinada matematicamente obteniendo los valores de la eficiencia, selectividad y resolución de los resultados cromatográficos.

A continuación se presenta un esquema funcional de un equipo de cromatografía de líquidos Figura 4 :

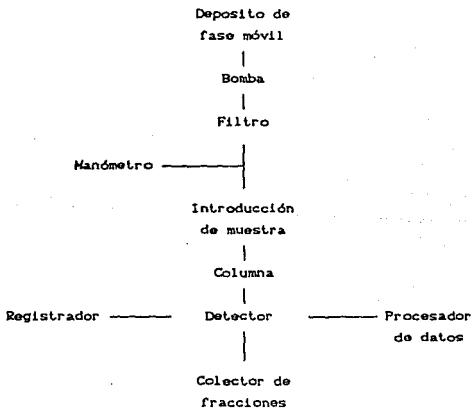


Figura 4. Esquema funcional de un cromatógrafo de líquidos

2.2.5 Análisis cualitativo y cuantitativo

La cromatografía de líquidos es en esencia una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, en general siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado.¹⁰

La forma de efectuar la identificación es comparando los tiempos de retención de las sustancias por identificar con los tiempos de retención de las sustancias patrones, aunque como se mencionó anteriormente, esto no basta para una identificación certera. La única manera de identificar una sustancia con un cien por ciento de seguridad es utilizando alguna técnica auxiliar, como por ejemplo espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.

En lo que respecta al análisis cuantitativo de mezclas o sustancias siempre ha sido fácil de efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos. En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de cromatografía de líquidos de alta presión es tan confiable o aún más que los resultados obtenidos por cromatografía de gases.

A continuación se describen cada una de la técnicas manuales e instrumentales que se conocen para integrar las áreas de los picos.

Altura del pico. Aunque el área es una medida más precisa, la altura es más empleada por la mayor facilidad con que se obtiene, aunque es mucho más sensible a variaciones instrumentales. Si los picos están completamente distorsionados o asimétricos, o la cantidad de muestra está fuera del intervalo lineal del detector, no debe utilizarse esta técnica. Si hay desviación de la línea base, la altura del pico se obtiene interpolando la línea base entre el principio y el fin de cada uno de los picos.

Altura por el ancho de la mitad del pico. Si los picos son simétricos tienen aproximadamente la forma de un triángulo, y es por esto que el área se obtiene multiplicando la altura del pico por el ancho medio a la mitad de la altura. No es conveniente emplear el ancho medio en la base del pico, ya que por lo general los picos tienen cierta tendencia a colear.

Triangulación. El método consiste en trazar tangentes a ambos lados del pico hasta obtener un triángulo con la línea base y luego aplicar la fórmula de la base multiplicada por la mitad de la altura del pico. Este método es menos preciso que el anterior y está sujeto a errores al trazar las tangentes.

Cortar y pesar. Este método es laborioso y lento, pero bastante preciso. Básicamente lo que hace es determinar el peso por unidad de área del papel utilizado en el registrador, recortando después los picos trazados y pesándolos, y de esta forma se determina su área. La precisión de este método en general es buena pero depende de varios factores, que son el cuidado que hay que tener al recortar los picos, la homogeneidad del papel, etc.

Planímetro Utilizar planímetros para medir áreas no ofrece ventaja alguna apreciable sobre los métodos anteriores. El proceso es lento, depende mucho de la habilidad personal y su precisión excede a la del método de triangulación. Con picos asimétricos se aprecia una ligera ventaja sobre otros métodos manuales.

Integración de disco. Este es quizá el método más conveniente para medir áreas, el integrador transforma la señal que recibe el registrador en una serie de trazos en el papel que se puede relacionar con las áreas de los picos, la precisión es muy buena y sólo ofrece cierta dificultad en casos de picos no resueltos por completo o que presentan una desviación de la línea base.

Integradores electrónicos. Los métodos de integración electrónica proporcionan datos de una precisión en muchas ocasiones superior a la del mismo cromatógrafo, la señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y concentración.

También se emplean sistemas de computación, muchos de estos instrumentos son capaces de presentar directamente resultados y datos completos de análisis, tales como tiempo de retención, áreas, concentración porcentaje de composición, etc.

2.2.6 Ventajas y limitaciones del método.

La cromatografía de líquidos de alta presión puede ser considerada como complementaria a la cromatografía de gases. En muchos casos ambas técnicas pueden ser usadas para efectos de la misma separación. Para aquellos materiales que son termolábiles o no volátiles, cromatografía de líquidos de alta presión es la selección lógica, pero esto no significa que reemplace la cromatografía de gases pero sí jugará un gran papel en los laboratorios de análisis.

La cromatografía de líquidos de alta presión ofrece amplias ventajas sobre la tradicional cromatografía de líquidos:

Rapidez, resolución, sensibilidad, columnas reutilizables, ideal para moléculas grandes y especies iónicas, muestras fáciles de recuperar.

Las limitaciones para este método son las siguientes:

a. Instrumentación costosa, difícil análisis cualitativo, no existe detector netamente universal y sensible, elevado costo de operación, experiencia indispensable.

b. En la cromatografía de líquidos la fase móvil debe cumplir ciertas características:

- Ser pura sin ningún contaminante
- No reaccionar con el empaque
- Ser compatible con el detector
- Disolver la muestra para poder ser transportada a través de la columna
- Tener baja viscosidad
- Fácil recuperación de la muestra
- Estar comercialmente disponible a bajo precio
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener la polaridad adecuada para permitir la retención conveniente de la muestra en la columna
- Valores de K' entre 2 y 10

Los solventes más comúnmente usados en la cromatografía de líquidos de alta resolución son hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua.

En muchas ocasiones en especial con fases polares existe una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido, si estos

gases se desgasifican dentro del instrumento y forman burbujas, pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna por lo que es necesario remover estos gases disueltos, mediante un baño de ultrasonido. Durante un análisis de una mezcla de dos o más sustancias podemos usar una mezcla de solventes como fase móvil ajustando adecuadamente las características de la fase, también es posible cambiar la composición de la fase móvil durante el análisis. El primer método es llamado operación isocrática y el segundo elución por gradiente. La elución por gradiente se utiliza con muestras cuyos componentes poseen polaridades muy distintas. Por lo general se empieza con un solvente único y aumenta con el tiempo la concentración del otro componente.

La selección de los solventes usados como fase móvil depende de varios parámetros. En la cromatografía de adsorción y de partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad pero también lo son la viscosidad y otras características. En la cromatografía de intercambio iónico son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión la característica primordial es la solubilidad de la muestra en la fase móvil.¹⁰

2.3 Ketoconazol

2.3.1 Nombre químico

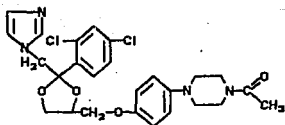
cis-1-Acetyl-4- [4- [[2-(2,4-dichloropheny)-2-(1H-imidazol-1-ylmethy)
-1,3-dioxolan-4-yl] -methoxy] phenyl] Piperazine.

2.3.2 Fórmula

a. Mínima



b. Estructural



2.3.3 Propiedades Fisicoquímicas

Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo, punto de fusión 146°, cristalizado de 4-methyl-2-pentanona, rotación específica a 20°C de -1° a +1°, soluble en metanol y soluciones ácidas diluidas.⁴⁴

2.3.4 Farmacología del ketoconazol

2.3.4.1 Absorción, distribución y biotransformación del ketoconazol.

La mayoría de los hongos son completamente resistentes a la acción de los medicamentos antibacterianos. Sólo unas cuantas sustancias se ha descubierto que ejercen un efecto inhibitor sobre los hongos patógenos para el humano y casi todas ellas son relativamente tóxicas. Existe una gran necesidad por mejorar los medicamentos antimicóticos, sobre todo a causa de la frecuencia cada vez mayor de infecciones micóticas de diseminación general en pacientes inmunosuprimidos.^{42,43}

El ketoconazol es una estructura imidazólica sintética que se presenta en forma de polvo blanco, altamente soluble en agua y en alcohol. Su espectro antibacteriano es muy amplio incluye Candida, Coccidioides immitis (agente de la coccidioidomicosis), Histoplasma capsulatum (agent de la histoplasmosis), hongos superficiales (Trichophyton, Microsporium,

etc.] y blastomicosis. No es efectivo contra Torulosis, Mucor, y Aspergillus sp. No se ha reportado resistencia durante el tratamiento.

Los antimicóticos imidazoles sintéticos inhiben el desarrollo de los hongos al bloquear la biosíntesis de los lípidos micóticos, en especial al ergosterol en las membranas celulares y tal vez por medio de otros mecanismos.^{14,15}

Se ha publicado que el ketoconazol en forma eficaz suprime las manifestaciones clínicas de la paracoccidioidomicosis generalizada, la blastomicosis y en ocasiones lesiones del pulmón, hueso o piel de histoplasmosis y coccidioidomicosis, pero no meningitis debida a estos hongos. Este antimicótico oral ha dado resultados alentadores en casos moderados graves y su administración no ha originado problemas importantes.

El ketoconazol es el primer antimicótico eficaz en el tratamiento de las micosis sistémicas que puede administrarse por vía oral. Se toma una sola dosis al día de 200-400 mg junto con los alimentos. Este agente es bien absorbido y distribuido, sin embargo, sus concentraciones en el sistema nervioso central son bastante bajas de las altas dosis dadas [hasta 800 mg/día]. La dosificación diaria suprime las infecciones por Candida de la boca o de la vagina en 1-2 semanas y la dermatofitosis en 3-8 semanas. Los niños inmunodeficientes con candidiasis, mucocutánea mejoran siguiendo el tratamiento 4-10 meses. El fármaco se detecta en orina hasta después de las 24 horas de su ingestión, la mayor parte del fármaco se biotransforma en el hígado y se elimina en la bilis en forma de metabolitos inactivos, sólo un pequeño porcentaje aparece en la orina sin cambios metabólicos.¹⁶

2.3.4.2 Toxicidad

No se han reportado casos de contraindicación a este fármaco, excepto en casos de hipersensibilidad. No se tiene información sobre sus efectos teratogénicos y embriotóxicos en el hombre, tales efectos se presentan sobre estudios en ratas por lo que se aconseja no administrarlo durante el primer trimestre del embarazo. Cabe mencionar que el fármaco es posiblemente eliminado a través de leche materna.¹²

Los principales efectos tóxicos afectan al aparato digestivo, aunque se ha observado cierta toxicidad hepática con dosis elevadas. El ketoconazol bloquea la síntesis de esteroides suprarrenales y puede producir ginecomastia. Aún no se ha presentado resistencia al medicamento.

2.3.4.3 Dosis, vía de administración y presentaciones

No se ha establecido con certeza la dosis y la duración del tratamiento. Se recomienda la dosis diaria oral de 200 a 400 mg, administrada en dos tomas y junto con los alimentos. Se considera que son necesarias dosis del orden de 600 a 800 mg/día para el tratamiento de algunas infecciones. Las presentaciones conocidas a la fecha son en forma de tabletas de 200 mg y shampoo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La cuantificación de ketoconazol puede realizarse conforme a los métodos de farmacopeas, por cromatografía de líquidos de alta presión, por titulaciones no acuosas, o directamente al espectrofotómetro.^{17,18}

Actualmente los métodos reportados para la cuantificación de ketoconazol en tabletas son por cromatografía de líquidos de alta presión.^{19,20}

Se llevará a cabo la adaptación del método debido a que en el laboratorio donde se realizará la parte experimental de este proyecto no se logró reproducir el que se presenta en las farmacopeas y norma oficial del Seguro Social (ya que no se ha logrado adaptar al equipo con que cuenta el laboratorio).

Por lo anterior se llevará a cabo la adaptación de un método analítico para la cuantificación y posterior validación del método de control de calidad para tabletas de ketoconazol.

4. OBJETIVOS.

- a. Adaptación de un método analítico para la cuantificación de ketoconazol en tabletas como producto terminado.
- b. Validación del método analítico mediante un estudio estadístico cubriendo los siguientes parámetros:

Especificidad
Precisión
Exactitud
Linealidad
Estabilidad

5. HIPOTESIS.

El ketoconazol, principio activo presente en la forma farmacéutica de tabletas, es cuantificado gracias a los diferentes tiempos de retención que presentan los componentes de la formulación al ser analizados por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

Si al realizar la separación de ketoconazol de los otros componentes de la formulación indican la no interferencia por parte de estos, podemos decir que el método adaptado es un método cuantitativo y podrá ser validado con el estudio estadístico correspondiente, además de ser utilizado como método de ensayo rutinario en control de calidad para la cuantificación de ketoconazol en tabletas.

6. METODOLOGIA

6.1 Método general

6.1.1 Materiales

Matraces volumétricos de 50 ml.
Matraces volumétricos de 100 ml.
Pipetas volumétricas de 5 ml.
Tubos para centrifuga
Vasos de precipitados de 50 ml.
Vasos de precipitados de 100 ml.
Viales para Cromatógrafo de Líquidos

6.1.2 Reactivos

Ketoconazol Estándar de Referencia USP
Ketoconazol Materia Prima Lote 910037 ABISA.
Metanol G. R.
Metanol HPLC J. T. Backer
Fosfato de amonio monobásico G. R. J. T. Backer

6.1.3 Equipo

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión Beckman 506 A
Balanza Analítica Mettler A.M. 100
Baño de ultrasonido Sigma No. 11
Centrifuga Solvat No. 3359

6.1.4 Método

6.1.4.1 Condiciones cromatográficas

Columna: Nova-Pack C_{18} de 3.9 mm. x 150 mm.
Tamaño de partícula: 4 micras
Flujo: 0.75 ml/min
Fase móvil: Metanol-Fosfato de amonio
monobásico 0.05M pH 6.8 [75:25]
Longitud de onda: 230 nm.
Inyección: 10 μ l

6.1.4.2 Preparación del estándar

Pesar con exactitud alrededor de 50 mg de ketoconazol estándar de referencia previamente secado al vacío a 80° C por 4 horas antes de su uso, colocar el estándar pesado en un matraz aforado de 50 ml, adicionar metanol, agitar hasta disolución completa y aforar con el mismo solvente, tomar una alícuota de 10 ml, llevarla a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con metanol y mezclar.

6.1.4.3 Preparación de la muestra

Moler 20 tabletas hasta obtener un polvo homogéneo, pesar el equivalente a 200 mg de ketoconazol, colocar en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de metanol y colocar por 15 minutos en un baño de ultrasonido, aforar con metanol, mezclar y centrifugar una porción de la solución. Tomar una alícuota de 5 ml, y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con metanol y mezclar.

6.1.4.4 Procedimiento

Inyectar por quintuplicado volúmenes iguales [10 µl] de la solución estándar, registrar las áreas de los picos correspondientes.

El coeficiente de variación no debe ser mayor de 2%.

Inyectar por separado 10 µl de la muestra registrando el correspondiente cromatograma, obtener las áreas y realizar los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\text{Ketoconazol mg./tab.} = \frac{A_m \times W_s \times P_s}{A_s \times W_m} \times \frac{10}{100} \times \frac{100}{50} \times \frac{100}{5} \times P.P.$$

donde:

A_m = Área del pico de la muestra

A_s = Área del pico del estándar

P_s = Potencia del estándar

W_s = Peso del estándar en mg.

W_m = Peso de la muestra en mg.

PP = Peso promedio

6.2 Evaluación del sistema

6.2.1 Linealidad del sistema

Para evaluar este parámetro se preparó una solución patrón partiendo de 200 mg de ketoconazol y diluyendo a 100 ml esta solución sera denominada como A y se realizan diluciones con metanol como disolvente como se muestra en la tabla IV hasta obtener la concentración adecuada para cada nivel el cual fue analizado por triplicado.

Nivel	Alícuota de solución A	Aforo	Concentración final
80 %	4.0 ml	100 ml	80 mcg/ml
90 %	4.5 ml	100 ml	90 mcg/ml
100 %	5.0 ml	100 ml	100 mcg/ml
110 %	5.5 ml	100 ml	110 mcg/ml
120%	6.0 ml	100 ml	120 mcg/ml

Tabla IV. Cantidad de ketoconazol en cinco diferentes niveles para determinar la linealidad del sistema.

6.2.2 Precisión del sistema (Repetibilidad)

Para evaluar este parámetro se prepararon diez muestras como se hizo para el nivel del 100% de la linealidad del sistema.

6.3 Evaluación del método

6.3.1 Linealidad del método.

Para la linealidad del método se prepararon placebos cargados a cinco niveles de concentración y por triplicado para cada nivel, adicionando una cantidad exacta de ketoconazol para cada uno de los placebos. Las muestras se prepararon pesando las cantidades de acuerdo a la tabla V.

Nivel	Principio activo(mg)	Excipiente(mg)
1	180	240
2	180	220
3	200	200
4	220	180
5	240	180

Tabla V. Cantidad de ketoconazol en cinco diferentes niveles para determinar la linealidad del método.

6.3.2 Exactitud al cien por ciento

Para evaluar la exactitud del método se prepararon diez muestras adicionando la cantidad de placebo y principio activo que se utilizó para el nivel número tres de la linealidad del método, tratando las muestras como se indica en el procedimiento de la preparación de la muestra (6.1.4.3)

6.3.3 Estabilidad de la muestra

Para determinar la estabilidad de la muestra se prepararon tres placebos cargados a una concentración del 100%, estas muestras se prepararon de la misma manera que para la exactitud.

Una vez que se prepararon las muestras se realizó el análisis de las mismas registrándose los datos obtenidos, después se expusieron a la luz normal, oscuridad y refrigeración ambiente por un período de 12, 24 y 72 horas, las muestras estaban contenidas en los mismos viales transparentes que se utilizaron en el análisis inicial.

6.3.4 Especificidad

Para la determinación de la especificidad del método se comparó un placebo contra un placebo cargado y un estándar, observándose resultados satisfactorios como puede observarse en el Anexo I.

6.3.5 Precisión (Reproducibilidad)

Para la determinación de la reproducibilidad del método se realizó con dos analistas en dos días diferentes de la siguiente manera:

El primer día cada analista preparó tres placebos cargados a una misma concentración del cien por ciento, y se analizaron con el método propuesto, en el segundo día los analistas anteriores por separado prepararon tres placebos cargados y se analizaron de la misma manera que el día anterior.

7. RESULTADOS

7.1 Linealidad del sistema

Cantidad adicionada [mcg/ml]	Propiedad medida [Areas]
80	248.27510
80	240.53038
80	247.76190
90	280.15780
90	279.90693
90	280.18474
100	312.40193
100	311.19993
100	312.04793
110	340.30417
110	343.02997
110	340.58894
120	373.31981
120	372.52836
120	372.13019

Número de diluciones (t) = 5
Número de réplicas (n) = 3
Número de datos (N) = 15
 $\Sigma X = 4500.0000$
 $\Sigma Y = 4663.4637$
 $\Sigma X^2 = 459000.0000$
 $\Sigma Y^2 = 1478620.0000$
 $\Sigma XY = 475593.2707$

Cálculos finales para la pendiente (B):

$$B = \frac{N (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$B = 0.0353$$

Cálculos finales para la ordenada al origen (A):

$$A = \frac{(\Sigma Y) (\Sigma X^2) - (\Sigma X) (\Sigma XY)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$A = -0.0134$$

Cálculos finales para el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r²):

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)]^2}{[nt (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] [nt (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r = 1.2009$$

$$r^2 = \frac{[nt (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)]^2}{[nt (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] [nt (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]}$$

$$r^2 = 1.4422$$

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación (CV):

Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{conc. de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

F ₁	=	3.1034
F ₂	=	3.1181
F ₃	=	3.0970
F ₄	=	3.1128
F ₅	=	3.1100
F ₆	=	3.1131
F ₇	=	3.1240
F ₈	=	3.1119
F ₉	=	3.1204
F ₁₀	=	3.0936
F ₁₁	=	3.1184
F ₁₂	=	3.0982
F ₁₃	=	3.1109
F ₁₄	=	3.1052
F ₁₅	=	3.1010

$$\begin{aligned}\Sigma F &= 43.6370 \\ \bar{F} &= 3.1091 \\ \Sigma F^2 &= 145.0011\end{aligned}$$

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

$$C. V. = \frac{D. E.}{\bar{F}} \times 100$$

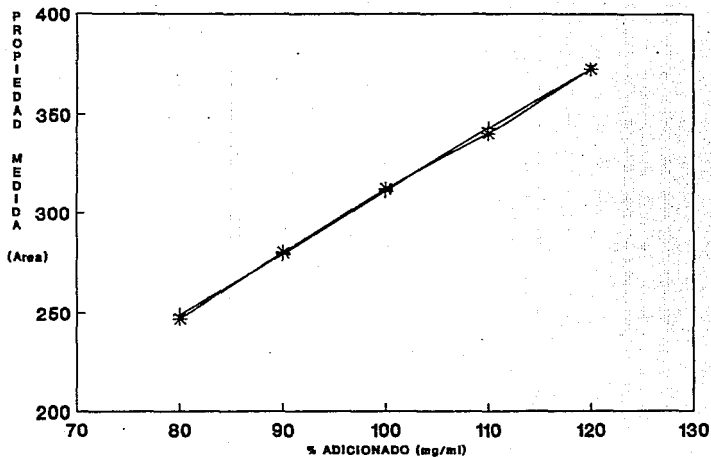
$$\begin{aligned}D. E. &= 5.6004 \times 10^{-3} \\ C. V. &= 0.1830\end{aligned}$$

Criterio de aceptación

$$\begin{aligned}CV &\leq 1.50 \% \\ r &\geq 0.99 \\ r^2 &\geq 0.98 \\ A &\approx 0.00 \\ B &\approx 1.00\end{aligned}$$

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$, $CV \leq 1.5 \%$, $A \approx 0$ y $B \approx 1$ se cumple con los criterios de linealidad del sistema.

LINEALIDAD DEL SISTEMA



GRAFICA 1 Linealidad del Sistema(%Adicionado vs Prop.Medida)

7.1.1 Evaluación de la ordenada al origen.

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0 : A = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

Calculando el error típico

$$S_{y/x} = \sqrt{S_y^2 - a S_x - b S_{xy} / (n-2)}$$

Donde:

S_x y S_y = Sumatoria de X y Y respectivamente

n = Número de datos

S_x^2 y S_y^2 = Cuadrado de las sumatorias de X y Y respectivamente

a = Ordenada al origen

b = Pendiente

$$S_{y/x} = (154145.85 - 0.43088 \times 1505.72 - 0.99950 \times 153571.19 / 15 - 2)^{1/2}$$

$$= 0.4524$$

$$S (X_i - \bar{X})^2 = 3000$$

Calculando error típico de estimación modificada

$$\hat{S}_{x/y} = \sqrt{(n / n - 2)}$$

$$= [15 / 15 - 2]^{1/2}$$

$$= 1.0741$$

Calculando t de cálculo

$$t_{\text{calc}} = a - A_0 / \hat{S}_{x/y} \sqrt{\sum X^2 / n \sum (X_i - \bar{X})}$$

$$= -3.9268 \times 10^{-3}$$

Area de aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{\text{calc}} \leq t_{1-\alpha/2}$$

Donde:

$$t_{\text{tablas}} = t_{0.075} [13 \text{ g.l.}] = 2.1804$$

Por tanto:

$$-2.1804 \leq -3.9288 \times 10^{-3} \leq 2.1804$$

Por lo que el método posee una ordenada al origen cercana a cero.

Intervalo de confianza

$$a + t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{u/y} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} < A < a + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{u/y} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$
$$-2.1738 < -0.134 < 4.2521$$

7.1.2 Evaluación de la pendiente.

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

Calculando t de cálculo:

$$t_{\text{calc}} = (b - B_0) \cdot \hat{S}_{y/x} \cdot \sqrt{n-1} / S_{y/x}$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.5747$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.1804$$

Area de aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{\text{calc}} \leq t_{1-\alpha/2}$$

$$-2.1804 \leq -0.5747 \leq 2.1804$$

Por lo tanto el método posee una pendiente que se puede considerar aproximada a uno.

Intervalo de confianza

$$b \pm t_{\alpha/2} \cdot n S_{y/x} / \hat{S}_{y/x} \sqrt{n-1} < B < b \pm t_{1-\alpha/2} \cdot n S_{y/x} / \hat{S}_{y/x} \sqrt{n-1}$$

$$-0.7773 < 0.9353 < 1.9843$$

7.1.3 Análisis de varianza.

Módulo Estadístico

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \epsilon_i$$

Hipótesis planteada

$$H_0 : \beta = 0$$

$$H_a : \beta \neq 0$$

TABLA DE ANADEVIA

F. V.	g.l.	S. C.	M. C.	F. calc
Regresión	n-1	SCR	MCR	
Error de regresión	n-2	SCer	MCEr	Fr = MCR/MCEr
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	MCfa	
Error puro	t(r-1)	SCpe	MCpe	F _{fa} = MCfa/MCpe

Donde:

F.V. = Fuente de variación

g.l. = Grados de libertad

S.C. = Suma de cuadrados

M.C. = Media de cuadrados

F. calc = F de cálculo

SCR = Suma de cuadrados para la regresión

$$= b(Sxy) + a(Sy) - [(Sy)^2 / n]$$

SCer = Suma de cuadrados del error de regresión

$$= Sy^2 - b(Sxy) - a(Sy)$$

- $SCep = \text{Suma de cuadrados para el error puro}$
 $= Sy^2 - [(Sy1.^2) / r]$
 $SCfa = \text{Suma de cuadrados por falta de ajuste}$
 $= SCer - SCep$
 $MCr = \text{Medía de cuadrados para la regresión}$
 $= SCR / glr$
 $MCer = \text{Medía de cuadrados para el error de regresión}$
 $= SCer / gler$
 $MCep = \text{Medía de cuadrados del error puro}$
 $= SCep / glep$
 $MCfa = \text{Medía de cuadrados de la falta de ajuste}$
 $= MCfa / MCEp$

Sustituyendo los valores en la tabla anterior:

TABLA DE ANADEVA				
F. V.	g. l.	S. C.	M. C.	F. calc
Regresión	1	2997.04	2997.04	Fr = 3056.3328
Error de regresión	13	1.2748	0.9806	
Falta de ajuste	3	0.4753	0.1583	F _{fa} = 1.9807
Error puro	10	0.7992	0.07992	

Criterio de aceptación

Si $F_{(calc)} \geq F_{(tab)}$ se rechaza H_0

Por tanto existe una dependencia entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si $F_{(calc)} < F_{(tab)}$ se acepta H_0

Y por tanto no existe dependencia entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

$F_{(tab)} = 9.07$

$3056.3328 \geq 9.07$

Por lo anterior H_0 se rechaza y se considera que existe una relación entre la variable cantidad adicionada y la variable cantidad recuperada.

Evaluación del comportamiento del modelo

H_0 = El modelo de la regresión lineal simple describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

H_a = El modelo de regresión lineal simple no describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si $F_{(calculado)} < F_{(tabla)}$ H_0 se acepta

Por lo tanto el modelo describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la recuperada.

Si $F_{(calculado)} \geq F_{(tabla)}$ H_0 se rechaza

Por lo tanto el modelo no describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y recuperada, es decir existe una falta de ajuste del modelo para explicar la variabilidad de los datos.

$F_{(calculado)} = 3.71$

$1.0807 < 3.71$

Por lo anterior H_0 se acepta y se considera que el modelo describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

7.2 Precisión del sistema

7.2.1 Repetibilidad

<u>Cantidad Adicionada mcg/ml</u>	<u>Cantidad Recuperada mcg/ml</u>
100	99.9665
100	100.1325
100	99.9736
100	99.8647
100	99.8697
100	100.1230
100	100.2122
100	99.7809
100	99.9898
100	99.9124

$$\begin{aligned} \bar{Y} &= 99.9831 \\ s &= 0.1285 \\ \sum Y^2 &= 99966.3880 \end{aligned}$$

Calculando el coeficiente de variación

$$\begin{aligned} \text{C.V.} &= s / \bar{Y} * 100 \\ &= 0.1285 / 99.9831 * 100 \\ &= 0.2850 \end{aligned}$$

Criterio de aceptación

C. V. menor que 1.5

Por lo tanto el sistema se considera preciso.

7.3 Precisión del Método

7.3.1 Reproducibilidad

Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(t) + E_{kij}$$

Hipótesis planteada

Analista	Día
$H_0 : M_1 = M_2$	$H_0 : M_1 = M_2$
$H_a : M_1 \neq M_2$	$H_a : M_1 \neq M_2$

		<u>ANALISTA</u>	
		I	II
DÍA	I	100.5907	99.8990
		100.6816	98.8085
		<u>99.6499</u>	<u>99.9540</u>
		99.9193	99.4385
	II	99.5800	99.5158
		<u>100.4288</u>	<u>100.5197</u>

a. Tabla de totales.

		ANALISTA		
		I	II	
DIA	I	300.9222	298.5615	599.4837
	II	299.9092	299.4740	599.3822
		600.8304	598.0355	1198.8659

b. Tabla de analisis de varianza

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA				
FV	gl	SC	MC	F calc.
Analista	a-1	SCa	MCa	MCa/MC _e
Día	(d-1)a	SCd	MCD	MCD/MC _e
Error	(r-1)ad	SCe	MCE	

Donde:

a es el número de analistas

d son los días

r el número de réplicas

SCa= Suma de cuadrados de analista

$$= \sum Y_i^2 / br - \sum Y^2 \dots / bra$$

SCd= Suma de cuadrados de día

$$= \sum Y_j^2 / ar - \sum Y^2 \dots / bra$$

SCad= Suma de cuadrados de la interacción

$$= \sum Y_{ij}^2 / r - \sum Y_i^2 / br - \sum Y_j^2 / ar + \sum Y^2 / abr$$

SCe= Suma de cuadrados del error

$$= \sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij}^2 / r$$

MCa= Media de cuadrados del analista

$$= SCa / a-1$$

MCD= Media de cuadrados del día

$$= SCd / b-1$$

MCD= Media de cuadrados de la interacción

$$SCad / \{ a-1 \} \{ b-1 \}$$

MCE= Media de cuadrados del error

$$SCe / ab \{ r-1 \}$$

Sustituyendo los resultados en la tabla anterior :

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA				
FV	gl	SC	MC	F calc.
Analista	1	8×10^{-4}	8×10^{-4}	2.5372×10^{-8}
Día	1	0.0227	0.0227	1.0749
Interacción	1	0.3375	0.3375	1.0704
Error	8	2.5224	0.3153	

$$F_{\text{tabla}} = 5.32$$

Evaluación del efecto entre analistas

$$F_a < F_{\text{tab}}$$

$$2.5372 \times 10^{-8} < 5.32$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre analistas.

Evaluación del efecto entre los días de análisis

$$F_d < F_{\text{tab}}$$

$$1.0749 < 5.32$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre los días de análisis.

Por los resultados anteriores podemos decir que el método es reproducible.

7.4 Especificidad frente a excipientes

Los resultados obtenidos para la especificidad demuestran que no hay interferencia para la determinación de ketoconazol en tabletas [ver cromatogramas del anexo I].

7.5 Linealidad del método

<u>% Adicionado</u>	<u>% Recuperado</u>
80	79.5160
80	81.0604
80	80.3500
90	91.2270
90	91.6000
90	91.7270
100	100.3826
100	100.7203
100	101.0324
110	110.2687
110	110.3841
110	110.6321
120	120.8139
120	121.1318
120	120.5213

Ecuación de la recta

$$Y = 0.9993 X + 0.8204$$

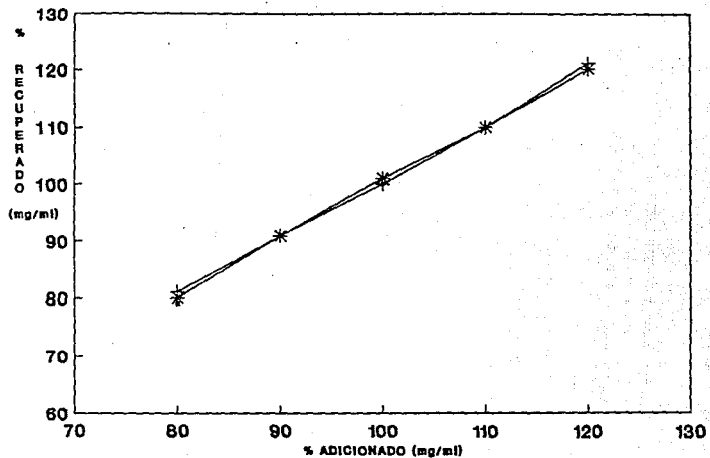
$$a = 0.8204$$

$$b = 0.9993$$

$$r = 0.9992$$

$$r^2 = 0.9985$$

LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA 2 Linealidad del Método (%Adicionado vs %Recuperado)

7.5.1 Evaluación de la ordenada al origen.
Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0 : A = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

Calculando el error típico

$$S_{y/x} = (S_y^2 - a S_x - b S_{xy} / n - 2)^{1/2}$$

Donde:

S_x y S_y = Sumatoria de X y Y respectivamente

n = Número de datos

S_x^2 y S_y^2 = Cuadrado de las sumatorias de X y Y respectivamente

a = Ordenada al origen

b = Pendiente

$$S_{y/x} = 377.0860$$

$$S(X_i - \bar{X})^2 = 2.0884 \times 10^{-6}$$

Calculando el error típico de estimación modificada

$$S_{y/x}^A = 1.0741$$

Calculando t de cálculo :

$$t_{\text{calc.}} = a - A_0 / \frac{S_{y/x}}{S_{x/y}} (\sum X^2 / n \sum (X_i - \bar{X})^2)^{1/2}$$

$$t_{\text{calc.}} = 2.0884 \times 10^{-6}$$

Area de aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{\text{calc}} \leq t_{1-\alpha/2}$$

Donde:

$$t_{\text{tablas}} = t_{0.075} [13 \text{ g.l.}] = 2.1804$$

Por tanto:

$$- 2.1604 \leq 2.0684 \times 10^{-6} \leq 2.1604$$

Por lo que podemos considerar que el método posee una ordenada al origen cercano a cero, con el siguiente intervalo de confianza:

$$a + t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{x/y} \left[\sum X^2 / n \sum (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2} < A < a + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{x/y} \left[\sum X^2 / n \sum (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2}$$

$$0.8204 + [-2.1604] \cdot 1.9805 < 0.8204 < 0.8204 + 2.1604 \cdot 1.9805 \\ -3.4582 < 0.43088 < 5.0999$$

7.5.2 Evaluación de la pendiente.

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0 : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

Calculando t de cálculo:

$$t_{\text{calc.}} = (b - B_0) \cdot \hat{S}_{y/x} (n-1)^{1/2} / S_{y/x}$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.37 \times 10^{-8}$$

$$t_{\text{tabla}} = 2.1604$$

Criterio

$$-0.37 \times 10^{-8} < 2.1604$$

Area de aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{\text{calc}} \leq t_{1-\alpha/2}$$

$$-2.1604 \leq -0.37 \times 10^{-8} \leq 2.1604$$

Por lo tanto el método posee una pendiente que se puede considerar igual a uno.

Intervalo de confianza

$$B + t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} / S_{y/x} (n-1)^{1/2} < B < B + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} / S_{y/x} (n-1)^{1/2}$$

$$-8.8385 \times 10^{-8} < 0.99935 < 1.0010$$

7.5.3 Análisis de varianza.

Módulo Estadístico

$$Y_i = \beta + \beta_1 + \epsilon_i$$

Hipótesis planteada

$$H_0 : \beta = 0$$

$$H_a : \beta \neq 0$$

TABLA DE ANADEV A

F. V.	g.l.	S. C.	M. C.	F calc
Regresión	n-1	SCr	M Cr	
Error de regresión	n-2	SCer	M Cer	Fr = MCr/M Cer
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	M Cfa	
Error puro	t(r-1)	SCpe	M Cpe	F _{fa} = M Cfa/M Cpe

Utilizando las fórmulas que aparecen en el punto 7.1.3 Analisis de varianza para la linealidad del sistema obtenemos los datos de la siguiente tabla:

TABLA DE ANADEV A

F. V.	g.l.	S. C.	M. C.	F calc
Regresión	1	2084.8850	2084.8850	
Error de regresión	13	15.4909	1.1916	Fr = 2504.93
Falta de ajuste	3	13.6940	4.5646	
Error puro	10	1.7969	0.1796	F _{fa} = 26.4153

Criterio de aceptación

Si $F_{(calc)} \geq F_{(tab)}$ se rechaza H_0

Por tanto existe una dependencia entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si $F_{(calc)} < F_{(tab)}$ se acepta H_0

Y por tanto no existe dependencia entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

$$F_{(tab)} = 0.07$$

$$2504.93 \geq 0.07$$

Por lo anterior H_0 se rechaza y se considera que existe una relación entre la variable cantidad adicionada y la variable cantidad recuperada.

Evaluación del comportamiento del modelo:

H_0 = El modelo de la regresión lineal simple describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

H_a = El modelo de regresión lineal simple no describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

a. Si $F_{(calcul)} < F_{(tab)}$ H_0 se acepta

Por lo tanto el modelo describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la recuperada.

b. Si $F_{(calcul)} \geq F_{(tab)}$ H_0 se rechaza

Por lo tanto el modelo no describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y recuperada, es decir existe una falta de ajuste del modelo para explicar la variabilidad de los datos.

$$F_{(tab)} = 3.71$$

$$25.4153 \geq 3.71$$

Por lo anterior H_0 se rechaza y por lo tanto el modelo no describe adecuadamente la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, es decir existe una falta de ajuste del modelo para explicar la variabilidad de los datos.

Sin embargo basados en el criterio establecido por la Secretaría de Salud, que indica que el resultado obtenido de la prueba del coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual que 0.98 y dado que el valor de $r^2 = 0.9995$ para este caso en particular se considera que no hay falta de ajuste en base a dicho criterio.

7.6 Exactitud del método.

% Adicionado	% Recuperado
100	99.8584
100	100.1810
100	99.5890
100	99.6713
100	99.7014
100	100.2418
100	99.9812
100	99.8538
100	99.5328
100	99.3465

a). Coeficiente de variación

$$\begin{aligned} \text{C.V.} &= S / \bar{X} \times 100 \\ &= 0.2885 \end{aligned}$$

Criterio de aceptación

$$\text{C.V.} \leq 1.5$$

$$0.2885 \leq 1.5$$

b). t de student

$$\begin{aligned} t_{\text{calc}} &= \bar{X} - \mu / S (n)^{1/2} \\ &= 0.2485 \end{aligned}$$

Criterio de aceptación

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

$$0.2485 < 2.571$$

Por lo tanto el método es exacto.

7.7. Estabilidad de la muestra.

Tiempo - Condición

		Condición		
		Luz	Oscuridad	Refrigeración
T i e m p o	12 horas	100.42	100.31	99.91
		99.84	99.86	99.56
		100.52	99.46	100.26
	24 horas	99.27	100.32	100.21
		98.53	99.98	99.87
		99.34	98.45	99.89
	72 horas	100.24	99.78	98.99
		99.45	99.78	99.36
		99.09	99.56	99.47

Calculando los valores de t de Dunnet:

$$SCe = \sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij}^2 / k$$

$$= 4.2138$$

$$MSe = SCe / t(r-1)$$

$$= 0.7023$$

$$t_D = \bar{x} - 100 / [MSe (2/r)]^{1/2}$$

		Condición		
		Luz	Oscuridad	Refrigeración
T i e m p o	12 horas	0.3800	-0.0160	-0.1315
	24 horas	-1.3933	-0.6089	-0.0194
	72 horas	-0.5992	-0.4287	-1.0620

Resultados de t_D para los diferentes tiempos de determinación de la muestra.

Evaluación de la estabilidad de la muestra:

H_0 : Hay estabilidad

H_a : No hay estabilidad

Regla de decisión:

Si $t_{D(calc)} < t_{D(tablas)}$ la muestra es estable.
Si $t_{D(calc)} > t_{D(tablas)}$ la muestra no es estable.

$$t_{D(tablas)} = 2.54$$

Como los valores obtenidos para t_D en la tabla anterior son menores a 2.54, se considera que la muestra es estable a las condiciones sometidas hasta antes de 72 horas de haber sido preparadas.

8. DISCUSION DE RESULTADOS.

La validación del método analítico para la determinación de ketoconazol se realizó tomando en cuenta los parámetros mínimos establecidos por el laboratorio : linealidad y precisión del sistema, linealidad, reproducibilidad, exactitud, especificidad del método así como estabilidad de la muestra.

En la evaluación de la linealidad del sistema como se puede observar en los resultados obtenidos, se encontró que el sistema es lineal ya que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada que ocasiona la respuesta del equipo, dando como resultado una ordenada al origen y una pendiente satisfactorias para un modelo lineal simple.

Para la precisión del sistema, tomando en cuenta los resultados obtenidos experimentalmente, se encontró que el sistema es preciso ya que el coeficiente de variación es menor de 1.5 [0.2850], bajo las condiciones de operación a las que fue sometido.

En el caso de la reproducibilidad del método, como lo demuestran los resultados obtenidos experimentalmente no existe una diferencia significativa entre analistas y tampoco entre los días de análisis, por lo tanto puede ser realizado por cualquier analista y en cualquier día.

Para la linealidad del método, tomando en cuenta los resultados obtenidos experimentalmente, demuestran que existe una relación lineal, entre la cantidad adicionada [X] y la cantidad recuperada [Y], siguiendo un modelo de regresión lineal simple.

Para la exactitud del método, como se aprecia en los resultados obtenidos, el método es exacto por lo que puede ser empleado para la cuantificación de ketoconazol en tabletas.

Para la especificidad del método como se aprecia en los cromatogramas anexos no existe interferencia con los productos de degradación, ni con los excipientes de la formulación de la tableta por lo que puede ser utilizado en pruebas de rutina y posiblemente como indicativo de estabilidad.

Los resultados de estabilidad de la muestra demuestran que esta es estable hasta antes 72 horas de haber sido preparadas, observandose que los resultados obtenidos en el por ciento de recobro son homogéneos.

9. CONCLUSIONES.

Al término del presente trabajo, podemos decir que se cumplieron los objetivos descritos originalmente porque, el método analítico empleado para la cuantificación de ketoconazol en tabletas como producto terminado fue satisfactorio en todos los parámetros evaluados para la validación.

- La adaptación del método fue satisfactoria para los fines de validación que se requirieron ya que cumple con los parámetros necesarios como se especifica a continuación.

- La respuesta obtenida por el sistema indica que es lineal y preciso.

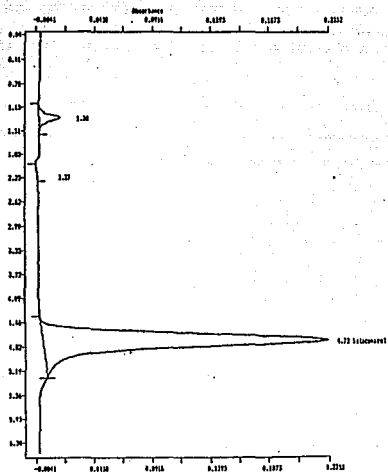
- El método es lineal, exacto, preciso y reproducible, bajo las condiciones de operación normal.

- El método propuesto es específico para pruebas de rutina [control de calidad] y posiblemente como indicativo de estabilidad ya que no existe interferencia con los productos de degradación.

- Las muestras son estables por lo menos 72 horas.

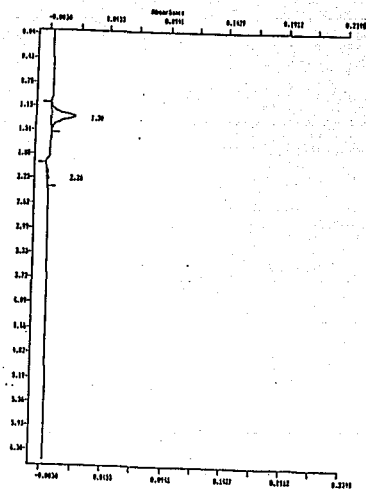
- El método propuesto es válido para ser utilizado en la determinación de uniformidad de contenido de ketoconazol en tabletas.

Por lo anteriormente expuesto, se concluye que el método analítico cumple con la función establecida y por lo tanto puede ser usado como uso de rutina en la cuantificación de ketoconazol para la presentación de tabletas.

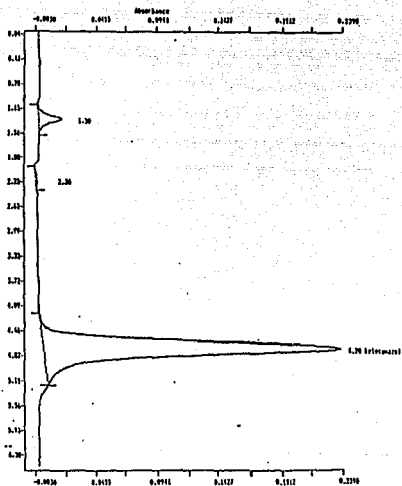


Anexo I.

Cromatograma N. 1 Nos muestra la respuesta de un placebo cargado donde podemos observar el pico correspondiente al ketoconazol.



Cromatograma N. 2 Nos muestra la respuesta de un placebo observado que no aparece otro pico que pueda sumarse al del activo en estudio.



Cromatograma N. 3 Nos muestra la respuesta de un estándar de referencia el cual se presenta en mismo tiempo de retención que el del placebo cargado.

10. Lista de Referencias

10. Lista de Referencias

1. Adrianus J.V. Hardwidge E. A., "Guidelines for Assay Validation", Pharm. Tech., 5 [3], 1982.
2. A.F.M. "Taller de Validación A.F.M." 1987.
3. Guideline for Submission of Supportive Analytical Data for Methods Validation in New Drug Applications. Dept. of Health and Human Services. F. D. A. April 1984.
4. Guerra J. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". Pharm. Tech. 10 [3]. 1986. p.74.
5. Cemeli, J. "Validación, Filosofía y Sistema". C.I.F. 4. (8). 1985. p. 220-226.
6. Taylor J. "Validation of analytical methods". Anal. Chem. 55 (6). 1983. p 600 A.
7. Pharmaceutical Manufacturers Association. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays". Pharmaceutical Forum. 1986 p. 1241.
8. Taylor, J. "Quality Assurance". Anal. Chem., 53 [14] 1981. p.1588A.
9. Puve University. "Validation Concepts Proceedings of Management Conference for Pharmaceutical Industry". West Lafye Indiana. USA. 1987.
10. Harold M. Mcnair y Benjamin Esquivel, "Cromatografía de Líquidos de Alta Presión", 2 ed., Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos de Washington D.C., 1980. p. 1 - 50.
11. The Merck Index. 10 th. ed. USA. 1983.

12. Rodríguez C Rodolfo, Vademécum Académico de Medicamentos, Tomo II, Primera edición, Universidad Autónoma de México, 1984 p. 487 - 488.
13. Goth Andrés. Farmacología Médica, Undécima edición, Edición Española, Ediciones Dogma, S. A., p.573 - 577, 1984.
14. Lewis's, " Pharmacology ". James rossland, quinta edición. Editorial Churchill Livingstone. New York, 1980. p 907-911.
15. Wiley John, and Sons Inc. "Ama Drug Evaluations" cuarta edición. New York. N.Y. 1980. p. 1353-1368.
16. Goodman L.S., Gilman A., "The Pharmacological Basis of Therapeutics " quinta edición, Ed. Copyright, Macmillan Publishing, Co. 1975. p. 1435-1442.
17. The United States Pharmacopeia, 20th. ed. USA, 1985.
18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 5a ed. 1988.
19. Swezey Sarah " Measurement of ketoconazole, a new antifungal agent, by high - performance liquid chromatography ". Journal of Chromatography, 227 (1982) p. 510-515.
20. Alton K. B. "Determination of the antifungal agent, ketoconazole, in human plasma by high - performance liquid chromatography". Journal of Chromatography, 221 (1980) p. 337-344.

11. Bibliografía.

- Box George E.P., Hunter William G., Hunter J. Statistic for Experimenters. An Introduction to Dosing, Data Analysis, and Model Building. John Wiley and Sons. New York. 1978
- Bernard Ostle. Estadística Aplicada. Ed. Limusa. México. 1983.
- Bowman W. C. Farmacología. Bases Bioquímicas y patológicas. Aplicaciones Clínicas. Nueva Editorial Interamericana. 1984.
- Bolton Sanford., Pharmaceutical Statistic : Practical and Clinical Applications, Second edition. Marcel Dekker, Inc. New York, 1990.
- Cavanaghi L. Statistical Evaluation Of The Results Obtained With The Analytical Methods Used For The Quality Control Medicines. Drug development and Industrial Pharmacy. 13 (14), 2571-2815, 1987.
- Clarke E. . Isolation and Identification of Drugs. Vol I. The Pharmaceutical Press, London 1978, pag. 25- 28.
- Connors, K. A. Curso de Análisis Farmacéutico. segunda edición Editorial Reverté, Barcelona España, 1981. pag. 25-28.
- Daniel. Wayne W. Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa. México 1978.
- Fontani, F., et al Criteri di Convalida del Metodi D'analisi. Boll Chin Farm. Vol. 128, num.2, Feb. 1987, pag. 66-74.
- Feigenbaun A. U. Control Total de la Calidad, Ed. CECSA. México 1984.

Florey, K. Analytical Profiles of Drug Substances . Ed. Academic Press. New York., Vol. 2, pag. 4-61. 1982.

Genaro A. R. Remington Farmacia, Vol 1, 17a. ed. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires Argentina. 1987.

Horwitz W. The Variability of Methods of Analysis Used Analytical Pharmaceutical Chemistry Journal of the Adac. 60 (6) pag. 1355-1363. 1977.

Inman, Eugene L. et al. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. J. of Chorm. Sci. Vol. 25, June 1987.

Juárez Ayala J. Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos. Pharma News, 1 (8), 16- 20, 1990.

Juárez Ayala J. Parámetros Estadísticos y Procedimientos de Validación, Criterios de Aceptación. Pharma News, 1 (8), 18-20, 1990.

Kleinbaum David. Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods. Duxbury Press. Massachusetts. 1978.

Loftus Bernard., Pharmaceutical Process Validation. Marcel Dekker Inc. New York. 1984.

Taylor , John. Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry Vol 55. N. 6, Mayo 1983.