

FACULTAD DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION (CLAR) PARA LA CUANTI-
FICACION DE KETOCONAZOL EN CREMA.**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROSA MARIA MAYA MONTAÑO

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1995



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.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LOS
LABORATORIOS SANOFI-WINTHROP
EN EL DEPARTAMENTO DE
DESARROLLO ANALITICO**

**AGRADESCO A TODOS Y CADA UNO
DE LOS QUE AYUDARON A LA
REALIZACION DE ESTA TESIS.**

JURADO

PRESIDENTE: Q.F.B.ESPERANZA HERNANDEZ KOELIG

VOCAL: Q.F.B. SANTIAGO SALAZAR LOPEZ

SECRETARIO: M EN C VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ

SUPLENTE: ALMA MIRIAM NOVELO TORRES

SUPLENETE: RAUL DIAZ TAGLE

DEDICATORIAS.

Dedicó esta tesis a mis padres
quienes siempre me han brindado su apoyo
para realizar todas mis aspiraciones

*MARIA ANGELA MONTAÑO
& FELIPE MALLA MEDINA*

| GRACIAS. |

A MIS HERMANOS

quienes siempre me han apoyado en todo momento

*LEONARDO
RODRIGO
LUIS FELIPE.*

Así como también a mi abuelita :

FLAVIA.

AGRADECIMIENTOS:

Agradesco a cada una de las personas que me ayudaron para la realización de este trabajo, de antemano muchas gracias.

Q.F.B. ESPERANZA HERNANDEZ Catedrática de la Universidad Femenina de México, gracias por su apoyo y comprensión.

Q-F-B- SANTIAGO SALAZAR, Catedrático de la Universidad Femenina de México.

M. en C. VERONICA RODRÍGUEZ LÓPEZ, Directora de la Carrera de Q.F.B. de la Universidad Femenina de México, muchas gracias.

ING. INDUSTRIAL. RAUL JUAREZ DURAN, Gracias por el apoyo que me brindó en la realización de este trabajo así como su comprensión.

INDICE

INTRODUCCION	1
CAPITULO I.	
GENERALIDADES	1
A. MICOSIS.	
1. Micosis Superficiales	2
2. Micosis Subcutáneas	2
3. Micosis Profundas	3
4. Micosis Oportunistas	5
B. KETOCONAZOL.	6
1. Antecedentes del Ketoconazol	6
2. Nomenclatura y formula desarrollada	8
3. Propiedades fisicoquímicas	9
4. Indicaciones Terapéuticas	13
5. Absorción	13
6. Contraindicaciones	13
7. Reacciones Secundarias y Adversas	13
8. Dosis y vía de Administración	14
9. Mecanismo de Acción	14

C. CROMATOGRAFIA	16
1. Teoría de la Cromatografía	17
2. Técnicas Cromatográficas	17
a. Cromatografía en capa delgada	18
b. Cromatografía en papel	18
c. Cromatografía de gases	19
D. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.	
1. Desarrollo Histórico	19
a. Cromatografía de Líquidos clásica	20
b. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	21
2. Definiciones	22
a. Tiempo de retención	22
b. Tiempo muerto	22
c. Número de platos teóricos	22
d. Anchura de la base del pico	22
e. Altura equivalente	23
f. Velocidad promedio de la fase móvil	23
g. Coeficiente de distribución	23
h. Relación de Fases	24
i. Factor de Capacidad	24
j. Resolución	24
k. Selectividad	24

3. Mecanismo de Separación	25
a. Adsorción	25
b. Partición	26
c. Intercambio Iónico	28
d. Exclusión de tamaño	29
e. Afinidad	30
4. PARTES DE LAS QUE CONSTA UN CROMATOGRÁFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	31
5. Instrumental	32
a. Reservorio	32
b. Bomba	33
c. Columna acondicionadora de solventes	34
d. Inyectores	34
e. Columna	35
f. Detectores	36
1. Detector de índice de refracción	37
2. Detector de Luz Ultravioleta	37
3. Detectro de Fluorescencia	37
g. Análisis Cualitativo	38

h. Análisis Cualitativo	38
1. Altura del pico	39
2. Altura por el ancho de la mitad del pico	39
D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.	40
1. Definiciones	40
a. Linealidad	40
b. Rango	40
c. Exactitud	40
d. Precisión	40
1 Repetibilidad	40
2. Reproducibilidad	41
e. Limite de Detección	41
f. Limite de Cuantificación	41
g. Especificidad	41
h. Tolerancia	41
i Estabilidad de la muestra	41
2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA CADA UNO DE LOS PARAMETROS	42
a. Linealidad del Sistema	42
b. Precisión del Sistema	43

c. Linealidad del Método	43
d. Exactitud del Método	44
e. Precisión del Método	45
f. Limite de Cuantificación	46
g. Especificidad	47
1. Método de Control de Calidad	47
2. Método Indicativo de Estabilidad	48
CAPITULO II	
OBJETIVOS	50
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL	52
A. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA	
ANALITICA POR HPLC	52
B. METODOLOGIA	54
1. Material	54
2. Equipo	54
3. Reactivos	55
4. Método	55

C. VALIDACION DEL METODO	57
a: Evaluación del Sistema	57
1. Linealidad del Sistema	57
2. Precisión del Sistema	58
b. Evaluación del Método	58
1. Linealidad del Método	58
2. Exactitud del Método	59
3. Estabilidad de la Muestra	59
4. Especificidad para Control de Calidad	59
5. Especificidad contra productos de degradación	60
6. Tolerancia	60
7. Precisión	60

CAPITULO IV

RESULTADOS.	62
1. Linealidad del Sistema	62
2. Precisión del Sistema	64
3. Linealidad del Método	65
4. Exactitud del Método	69
5. Reproducibilidad	72
6. Estabilidad de la muestra	76
7. Tolerancia	78

8. Especificidad	80
CAPITULO V.	
DISCUSION DE RESULTADOS	82
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFIA	86
ANEXOS	88

INTRODUCCION.

Los medicamentos modernos que están constituidos por uno o más activos y varios excipientes requieren de métodos analíticos capaces de determinar y cuantificar a cada uno de los activos que lo constituyen. Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país, la validación es ahora un requisito cuya finalidad es tener un medicamento seguro, en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación además de ser eficaz en cuanto a su acción terapéutica.

Ante estas circunstancias se requiere desarrollar un método de análisis el cual sea más práctico, eficiente, confiable, versátil.

El método propuesto es la cromatografía de líquidos de alta resolución por sus cualidades analíticas, que aparte de cumplir con estas características, es un análisis reproducible, exacto, y preciso.

El ketoconazol es un antifúngico de amplio espectro, con una amplia actividad en micosis sistémicas ya que es un activo de amplia importancia, se decidió desarrollar una metodología analítica, rápida y confiable, y cuya técnica sea específica para control de calidad así como para indicativo de estabilidad. Una vez establecido el método analítico, se realizó la validación de dicho método evaluando los parámetros de linealidad y precisión del sistema, linealidad y exactitud del método, reproducibilidad y especificidad del método, así como estabilidad de la muestra y tolerancia del método.

Los resultados de la validación demuestran que el método es lineal, preciso exacto, específico, y la muestra es estable por un periodo de 48 horas, por lo que el método puede ser utilizado en la determinación de Ketoconazol en crema (granel y producto terminado), con la seguridad de que los resultados obtenidos son confiables.

Por último cabe mencionar que el método puede ser empleado para Control de calidad así como para indicativo de estabilidad ya que los resultados obtenidos no interfieren con los productos de degradación.

CAPITULO 1
GENERALIDADES

GENERALIDADES

A. MICOSIS.

Muchos hongos provocan enfermedades en las plantas, pero solo 100 de los miles de especies conocidas de levaduras y mohos provocan enfermedades en los humanos. (16). Las infecciones micóticas en los humanos pueden agruparse en : **MICOSIS SUPERFICIALES, MICOSIS SUBCUTANEAS Y MICOSIS PROFUNDAS (generalizadas).**

1. MICOSIS SUPERFICIALES.

Hongos que invaden sólo tejido superficial queratinizado (piel, cabello, pelo, uñas,).

Los más importantes son los DERMATOFITOS, que se clasifican en tres géneros:

1. Epidermophyton, E. floccosum: invade la piel y las uñas, nunca el cabello, Pie de atleta.
2. Microsporum : Infeccion habitualmente la piel y el cabello pero rara vez las uñas.
3. Trichophyton, Pie de atleta.

Otras micosis superficiales son: Tiña negra, pitiriasis versicolor en donde el agente etiológico es Pityrosporum ovale. Habita saprófito de piel normal, predomina en regiones tropicales y subtropicales.

2 MICOSIS SUBCUTANEAS.

En general las lesiones se diseminan lentamente desde la zona de implantación.

ESPOROTRICOSIS. Es una infección granulomatosa crónica el agente es Sporothrix schenckii, causa nódulos ulceraciones y abscesos en la piel (micetoma) y mucosas, afecta también a los ganglios linfáticos, articulaciones y al pulmón es común en los floristas, la mayor prevalencia es en los estados de Morelos, Guanajuato, Michoacán y Distrito federal.

b CROMOMICOSIS Infección granulomatosa progresivamente lenta de la piel provocada por diversas especies de mohos negros. Con cierta frecuencia se ha aislado:

Phialophora verrucosa.

Fonsecaea pedrosoi

Cladosporium carrionii.

Los hongos son introducidos mediante trauma al interior de la piel, a menudo de las piernas o de los pies.

c MICETOMA. Las causas más comunes del micetoma antimicótico son: *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*. Se caracteriza por lesiones supurativas o con secreción abundante, puede localizarse en piel y es una causa de micetoma. Es frecuente en los Estados de Morelos, Guanajuato, Michoacán Veracruz y el Distrito Federal. Es más frecuente en el sexo masculino entre los campesinos (debido a que andan descalzos).

3 MICOSIS PROFUNDAS.

La infección se adquiere por inhalación y la mayoría de las lesiones son asintomáticas, se caracterizan por ser poco frecuentes, con zonas endémicas más o menos definidas, algunas de ellas no contagiosas, de difícil curación y de pronóstico grave para la vida.

a BLASTOMICOSIS. Existen dos formas de ésta:

1 Blastomicosis sudamericana, producida por el *Blastomyces brasiliensis*.

2 Blastomicosis norteamericana, causada por el *Blastomyces dermatitis*.

Es una afección grave, del tipo granulomatosa, que afecta a la piel, mucosa bucal, pulmón, ganglios linfáticos y vísceras abdominales pudiendo conducir a la muerte.

b COCCIDIOIDOMICOSIS. Esta es causada por Coccidioides immitis, que se inicia con un cuadro de infección respiratoria, bronquitis o neumonía, para luego generalizarse, afectando huesos vísceras abdominales y a veces el cerebro.

La Coccidioidomycosis es una enfermedad del Continente Americano fundamentalmente del Norte de la República Mexicana, (7) el área endémica más extensa comprende principalmente a los Estados de: Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Nayarit y Durango Además existen las zonas endémicas del centro y la del litoral del pacífico.

En estas zonas las condiciones ecológicas de semiaridez favorecen la presencia de Coccidioides immitis.

c HISTOPLASMOSIS.

Es causada por Histoplasma capsulatum, es una micosis intracelular del sistema retículo endotelial. La infección con Histoplasma capsulatum ocurre a través del sistema respiratorio.

El sistema retículoendotelial se encuentra afectado en particular con linfadenopatía, bazo crecido y hepatomegalia, fiebre alta, anemia. Pueden ocurrir úlceras de la nariz, boca lengua e intestino.

La transmisión es por inhalación de esporas del hongo el cual se reproduce en excremento de murciélagos, aves, en sótano de casas abandonadas, granjas, gallineros, cavernas y palomares

Se han encontrado casos de esta enfermedad en los estados de la República ubicados en diversas regiones y latitudes (Colima, Yucatán, Durango, Guerrero.) y la mayoría de las veces han tomado el carácter de epidemias. (12).

4 MICOSIS OPORTUNISTAS.

A CANDIDIASIS.

Es una enfermedad causada por *Candida albicans* y otras especies del género *Candida*.

Es una levadura oval gemante que produce un pseudomicelio en cultivo, en los tejidos y en los exudados. Su distribución geográfica es cosmopolita, puede afectar a todos los grupos de edad y sexo. La transmisión puede ser por contacto directo o por vía aérea.

Las manifestaciones clínicas van a depender de la localización de las lesiones y de sus características, ya que afecta a mucosa bucal, piel, intestino, vagina, bronquios y pulmones pudiendo invadir el torrente circulatorio para generalizarse y afectar el endocardio o las meninges.

Se presenta particularmente en diabéticos, durante el embarazo y en pacientes inmuno suprimidos (SIDA) tuberculosis, o en aquellos que reciben dosis masivas de antibióticos. También es considerada como una micosis oportunista.

b CRIPTOCOCOSIS. Llamada también torulosis, es una infección crónica producida por *Cryptococcus neoformans*, se halla en las heces de pichones, es una levadura que se caracteriza por una amplia cápsula de carbohidratos en cultivo y en los líquidos de los tejidos.

La enfermedad en el humano es oportunista ocurre a través del sistema respiratorio y es asintomática o está asociado con signos pulmonares no específicos y con síntomas vagos.

La infección pulmonar puede diseminarse en forma general estableciéndose en el SNC produciendo meningitis y encefalitis frecuentemente es mortal y generalmente se presenta como un oportunista en pacientes inmunosuprimidos (SIDA) y desnutridos, etc.

C ASPERGILLOSIS. Es causada por el género *Aspergillus* y las especies que destacan son las *fumigatus*, *niger*, *flavus*, son hongos considerados como causantes de otomicosis, generalmente se localizan en pulmón causando nódulos que pueden confundirse con una neoplasia (cáncer).

Clinicamente existen procesos bronquiales o tos crónica acompañada de expectoración abundante.

B.KETOCONAZOL.

1. ANTECEDENTES DEL KETOCONAZOL.

Por lo expuesto existe la necesidad de contar con un agente antifúngico de amplio espectro que sea capaz de curar a los pacientes que tienen micosis en nuestro país.

En 1976 se sintetizó un derivado imidazólico denominado **KETOCONAZOL** considerado como nuevo agente antimicótico, activo por vía oral y fácilmente soluble en el pH gástrico, poco después en 1985, estudios realizados comprueban que el efecto farmacológico en animales y humanos, ha tenido cambios significativos e incrementado en importancia a la llegada de los activos antifúngicos por vía tópica, obviamente la confirmación de la actividad antifúngica es todavía requerida, pero en adición la farmacología humana también ahora contribuyen significativamente a grados bondadosos de las moléculas en términos de afinidad de tejido y a un fino tono de selectividad y toxicidad.(5)

Se realizaron varios estudios en humanos donde se trabajó con un grupo de personas, en este caso niños, este estudio preliminar indica que el ketoconazol en crema al 2%, ha dado buenos resultados en 3/4 partes de los pacientes a los a los diez días de su aplicación, a lo largo de la superficie inflamada en la piel se encontró que los niveles de plasma están alrededor del 1-2 % de estos seguimientos sistemáticos de administración terapéutica, los riesgos de toxicidad debida a absorción percutánea son probablemente negligentes, ya que debido a las concentraciones encontradas en plasma que son tan bajas comparadas con la absorción por vía oral. Pocos datos son disponibles para absorción percutánea en tópicos imidazólicos en niños, especialmente aquellos con una gran inflamación en la piel. ver tabla no. 1.

La siguiente tabla muestra las concentraciones encontradas de ketoconazol en plasma con una aplicación de 4.5 g. al 2% de ketoconazol en crema.(20).

KETOCONAZOL EN PLASMA (NG/ ML).

	DIA1	DIA 5/6	DIA 10
PACIENTE 1 (5 meses)			
1 hora.	37	51	60
3 horas	54	43	36
6 horas.	18	33	44
12 horas	13	-	-

	DIA1	DIA 5/6	DIA 10
PACIENTE 2 (1 mes)			
1 hora	40	125	-
3 horas	103	35	-
6 horas	32	-	-
12 horas	12	369	-

	DIA1	DIA 5/6	DIA 10
PACIENTE3.(2 Meses)			
1 hora.	20	14	18
3 horas	37	79	21
6 horas	182	4	-
12 horas	14	11	-

Tabla No. 1.

2. NOMENCLATURA Y FORMULA DESARROLLADA.

El Ketoconazol es un producto de origen sintético.

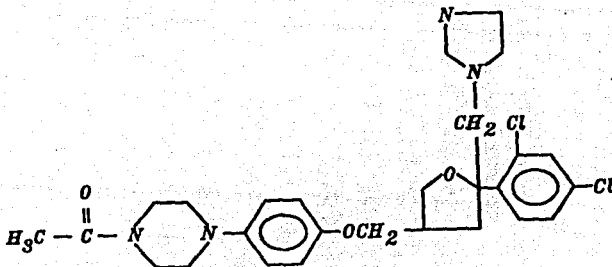
Nombre químico.

1-acetil-4-(4-(2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il-metoxi fenil)piperazina.

Fórmula molecular.

$C_{26}H_{28}Cl_2N_2O_4$.

Fórmula química.



3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

PESO MOLECULAR. 531.44

DESCRIPCION.

Polvo blanco o ligeramente amarillo, libre de materia extraña.

SOLUBILIDAD.

Cloroformo	1 mg en 10 ml.
Metanol	1 mg en 1 ml.
Acido clorhídrico diluido	1 mg en 100 ml.
Agua	1 mg en 1000 ml. (10)

IDENTIFICACION.

a. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Preparar una solución muestra de ketoconazol materia prima con una concentración de 1 mg/ ml. de esta misma forma preparar una solución de referencia de la misma concentración, en metanol grado reactivo, aplicar en una cromatoplaaca de sílica gel Hf 254 de 20 x 20 cm. y de un espesor de 0.25 mm., 100 ul de ambas soluciones.

Disolvente revelador: n-hexano, acetato de etilo, metanol, agua, ácido acético glacial (42: 40: 15: 2: 1).

La cámara cromatográfica se satura con la mezcla del solvente de elución durante un lapso de 30 minutos.

Se saca la placa se seca con aire caliente y se revela con luz U.V. a 254 nm. se observa una sola mancha en la muestra de contornos bien definidos y un Rf semejante al de la sustancia de referencia, el cual es aproximadamente de 0.40.

b ESPECTRO DE ABSORCION AL ULTRAVIOLETA (U.V.).

Se prepara una materia prima a una concentración de 1 mg. de ketoconazol por analizar en 100 ml. de una solución 0.1 N de ácido clorhídrico, y se prepara otra solución conteniendo sustancia de referencia a la misma concentración.
Concentración teórica 10 mcg/ml.(1)

La lectura de las absorbancias se efectúa en un espectro fotómetro, a la longitud de onda de 220 a 350 nm, utilizando una solución 0.1N de ácido clorhídrico como blanco de reactivo.

Los espectros de absorción son semejantes entre sí y presentar un pico máximo de absorbancia a 269 nm. más menos 2 nm.
(Espectro 1)

c ESPECTRO DE ABSORCION AL INFRARROJO. (I.R.).

La materia prima se dispersa en bromuro de potasio, presenta picos máximos de absorbancia a las mismas longitudes de onda (1640, 1580, 1500, 1360,) que una preparación similar de sustancia de referencia de ketoconazol. (Espectro 2).

RANGO DE FUSION.

La muestra presenta un rango de fusión entre 145°C - 149°C, aplicando el método del tubo capilar, subiendo la temperatura en un grado por minuto a partir de los 140°C.

PERDIDA AL SECADO.

No pierde más del 0.5% de su peso, usando las condiciones de secado al vacío y a una temperatura de 80°C.

RÓTACION ESPECIFICA.

La rotación específica se calcula con la ayuda de un polarímetro, se pesa una cantidad de 400 mg. de ketoconazol materia prima se lleva a un matraz aforado de 10 ml. se afora con metanol grado reactivo, para tener una concentración de 40 mg/ml y se obtiene un valor de -1 y $+1$ grado a una temperatura de 20°C , calculado en base seca.

Se realizará un blanco empleando un tubo seco y vacío para realizar las correcciones necesarias.

RESIDUO DE IGNICION.

Debe presentar no más de 0.1% en 2.0 gramos de muestra.

METALES PESADOS.

El método a seguir es el método II, 20 ppm. Que indica el contenido de impurezas metálicas coloreadas con sulfuro de hidrógeno y no debe ser mayor al límite de 20 ppm. de plomo.

Procedimiento.

Solución A. En un tubo de Nessler de 50 ml se coloca un volumen medido con pipeta de una solución tipo de plomo que contenga la cantidad de plomo correspondiente al límite de metales pesados, especificados para la muestra por ensayar, diluir con agua a 25 ml, se agrega solución reactivo hidróxido de amonio hasta obtener un pH entre 3 y 4 usando papel indicador; se diluye nuevamente con agua hasta un volumen de 40 ml y se mezcla.

Solución B. Pesar 1 gramo de ketoconazol materia prima, se coloca en un crisol, se agrega suficiente ácido sulfúrico para humedecerla y con cuidado se incinera a baja temperatura hasta que se carboniza totalmente, durante la carbonización el crisol puede cubrirse parcialmente, dejar enfriar y agregar: 2 ml. de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico.

Calentar cuidadosamente hasta liberación de humos blancos, incinerar de preferencia en una mufla entre 500 - 600°C, hasta que el carbón este quemado, dejar enfriar a temperatura ambiente agregar: 4 ml de solución de ácido clorhídrico diluido (1:2), tapar con un vidrio de reloj y ponerlo en un baño María a 37°C durante 15 minutos quitar la tapa y dejar que se evapore hasta sequedad , agregar:

1 gota de ácido clorhídrico, 10 ml de agua caliente y digerir durante 2 minutos.

Adicionar gota a gota solución reactivo de amoniaco, hasta que la solución vire el papel tornasol a pH alcalino, diluir con agua a 25 ml y ajustar el pH 3-4 con solución diluida de ácido acético; lavar el crisol y el filtrado con 10 ml de agua reuniéndolos en un tubo de Nessler de 50 ml y diluir con agua hasta 40 ml y mezclar. A cada uno de los tubos que contiene la solución A y B agregarles 10 ml de solución reactivo de sulfuro de hidrógeno, mezclar con un agitador de vidrio que contenga un doblez en el extremo inferior y dejar reposando durante 5 minutos, al cabo de este tiempo hacer la comparación observando los dos tubos de arriba hacia abajo sobre un fondo blanco.

El color de la solución B no es más oscuro que el de la solución A.

VALORACION.

Muestra. Pesar aproximadamente 200 mg. de ketoconazol y pasarlos a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, agregar 50 ml de ácido acético glacial para disolver la muestra, titular con solución 0.1N de ácido perclórico en ácido acético y adicionar solución indicadora de cristal violeta hasta punto final.

Cada mililitro de ácido perclórico equivale a 26.57 mg de Ketoconazol.(2)

4. INDICACIONES TERAPEUTICAS.

El ketoconazol está indicado para la aplicación por vía tópica al 2% para el tratamiento de las infecciones por dermatófilos en la piel como tiña corporal y tiña crural, causada por *trichophyton floccosum*, así como, para el tratamiento de la tiña pityriasis versicolor, causada por *Malassezia furfur* (*Pityrosporum orbiculare*). (6)

5. ABSORCION.

Las presentaciones locales de ketoconazol tienen la característica de absorberse en forma mínima a través de la piel intacta o escoriada, ya que de acuerdo a estudios en voluntarios sanos, en 140 de ellos, se encontraron tasas por arriba de 5 mcg/ml en sangre, después de un período de 72 horas. Aplicado por vía local presenta un espectro de acción amplia.

El ketoconazol por vía tópica actúa rápidamente contra el prurito el cual es comúnmente visto en las infecciones por dermatófilos y levaduras así como las condiciones de la piel relacionadas con la presencia del *Pityrosporon sp.* (17)

6. CONTRAINDICACIONES.

Está contraindicado en pacientes con reconocida hipersensibilidad al ketoconazol o a los excipientes de las formulaciones. (21)

7. REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS.

Presencia de ardor, aumento de eritema y aparición de vesículas, así como irritación en algunos casos. (14)

8. DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION.

Crema al 2 % se recomienda aplicar 1 vez al día cubriendo la zona afectada y área circundante en pacientes con tiña corporal y crural, así como en Pityriasis Versicolor.

9. MECANISMO DE ACCION.

El mecanismo de acción de derivados azólicos en este caso el ketoconazol ha sido investigado sobre todo en cultivos como la levadura *C. albicans* (13).

En concentraciones bajas de imidazoles de (10-100 miligramos por mililitro) se producen cambios peculiares en la pared celular que es un polímero de N-acetilglucosamida formándose un éster en posiciones 1-4, las cuales se hidrolizan con ácidos o bases y en la membrana plasmática que es una barrera semipermeable que existe entre el medio interno y el externo de la célula, que está constituida por una doble capa de lípidos, los cuales se unen a las proteínas por enlaces hidrofílicos o hidrofóbicos.

El ketoconazol actúa sobre las células afectadas y lo manifiesta con la salida de iones potasio y compuestos fosforados, ya que se provoca una interposición de los imidazoles con la biosíntesis de lípidos en la célula fúngica, especialmente con la síntesis de esteroides (11).

Los esteroides son compuestos de múltiples membranas biológicas una alteración en la composición y cantidad de esteroides afectan la estructura y función celular, principalmente el ergosterol.

Van den Bossche y colaboradores mencionan que ha concentraciones bajas el ketoconazol, (11), inhibe la incorporación del acetato (14 C), del ergosterol en *C. albicans*. Esta inhibición coincide con el acumulo del metil esterol (14 C), originando cambios de la permeabilidad e inhibición de crecimiento fúngico, así como también influye en la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos, los fosfoglicéridos como por ejemplo la fosfatidilcolina son los constituyentes principales de los sistemas de las membranas celulares provocando cambios en las actividades de peroxidasas y oxidasas. De forma simultánea, aumenta la actividad catalasa.

Este aumento es interpretado como una reacción defensiva para mantener niveles normales de peroxidasas intracelular

Desde el punto de vista morfológico, se presentan alteraciones en las células fúngicas como en la membrana, el volumen y defectos en la división celular, con deformaciones de los organelos (mitocondrias, aparato de golgi, ribosomas, lisosomas y centriolos).

Estas alteraciones ocurren después de exponerlos a concentraciones mayores de 50 mcg/ml de ketoconazol, ya que la vacuola central llega a dilatarse presentándose en forma angular debido a una alteración de la presión osmótica la vacuola se llena con material citoplasmático degradable y permeable que el ketoconazol evitando que el ketoconazol penetre e interfiera con el ácido ribonucleico (RNA) y deteriore el metabolismo celular (aumento de peroxidasa bloqueando la actividad del citocromo -C- peroxidasa de las membranas mitocondriales de C. albicans) y la degeneración liposa del citoplasma llevando consigo a la necrosis celular. (13).

CROMATOGRAFIA

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es el lecho fijo de gran área superficial mientras que la otra puede ser líquida o gaseosa, y se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. La afinidad relativa de los solutos para cada una de las fases debe ser reversible para asegurar que hay transferencia de masa durante la separación cromatográfica.

La fase fija se llama fase estacionaria y la otra se llama fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finalmente dividido, o un líquido que ha sido puesto en capa delgada sobre un material de soporte inerte. Es necesario que la fase estacionaria posea partículas que sean tan pequeñas como sea posible para que exista una superficie grande de modo que la adsorción y desorción de los solutos se verifique frecuentemente. La fase móvil puede ser un líquido puro o una mezcla de líquidos puros, o en su defecto una mezcla de soluciones (por ejemplo: soluciones amortiguadoras), o puede ser un gas (puro, o una mezcla homogénea).

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo con la naturaleza y de la fase estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama Cromatografía de adsorción, mientras que si la fase estacionaria es un líquido se llama Cromatografía de partición. En la Cromatografía de adsorción la fase móvil que contiene al soluto disuelto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y sus siguiente separación depende de la capacidad de los átomos que hay en la superficie para extraer los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas. Si la fase móvil es un líquido el proceso se llama cromatografía líquido-sólido (CLS), pero cuando la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-sólido (CGS).(19).

En la cromatografía de partición, un material sólido inerte tal como el gel de sílice o bien tierra de diatomeas, sirve para apoyar una capa delgada de líquido que es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil, que contiene al soluto, pasa muy cerca de esta líquida, hay retención y separación debido a la solubilidad relativa de los componentes analizados en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido este tipo de cromatografía de partición se le llama Cromatografía líquido-líquido(CLL), y si la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-líquido.(18).

1. TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA.

Se han desarrollado dos enfoques teóricos para describir los procesos implicados en el pasaje de los solutos a través de un sistema cromatográfico. El primero de éstos, la teoría de los platos basada en el trabajo de A.P. Martín y R.L.M. Syngé, considera el sistema cromatográfico como una serie de capas discretas de platos teóricos, en donde existe en cada uno de ellos un equilibrio del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. El movimiento del soluto se considera como una serie de transferencias paso a paso entre plato y plato. La segunda teoría o de la velocidad, considera la dinámica de la partícula del soluto a medida que ésta pasa a través de los espacios ubicados en la fase estacionaria del sistema, al igual que en la cinética de estas partículas a medida que son transferidas hacia la fase estacionaria y desde ella.

2. TECNICAS CROMATOGRAFICAS.

Las cuatro formas básicas de cromatografía (partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión de tamaño) pueden aplicarse al análisis de sistemas farmacéuticos a través del uso

de una serie de técnicas que difieren la una de la otra de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil, y del aparato para realizar dicha cromatografía. La elección de una técnica en particular depende de una serie de factores, incluyendo la complejidad de la muestra, las propiedades físicas y químicas de los compuestos a separar la resolución requerida la facilidad y rapidez de la técnica.

Si los materiales son volátiles y estables en la fase gaseosa la cromatografía de gases puede ser la técnica de elección dado que es simple de realizar, rápida y de alta resolución. Si es preciso aislar compuestos en cantidad entonces una elección más ventajosa, puede ser la cromatografía líquida o la cromatografía en capa delgada. Las columnas de cromatografía gaseosa no pueden manejar gran cantidad de material y resulta difícil recuperar los eluyentes de los gases calientes que fluyen. Si las sustancias son de alto peso molecular tal como proteínas o glicéridos o polímeros para lograr una separación es necesario emplear la cromatografía líquida usando el modo de exclusión por tamaño. Para los compuestos ionizados en solución como los amoníacos el modo de intercambio iónico de la cromatografía de líquidos es muy útil.

Los compuestos altamente polares o hidrofílicos de peso molecular intermedio tales como los azúcares pueden ser separados por técnicas de partición que implica la cromatografía en papel o en columna. Las sustancias que no son ionizables hidrofóbicas o no polares, pueden ser separadas mediante métodos de adsorción líquida.

a. CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Es un método de análisis el cual la fase estacionaria, es un sólido finamente dividido, se esparce sobre una capa rígida de soporte en forma de capa delgada y la fase móvil un líquido que migra a través de la superficie de la placa, la separación se realiza sobre una superficie plana y la fase móvil pasa a través de la placa por capilaridad.

El primer trabajo definitivo realizado en este campo, hecho en 1938 por Izmailov y Schraiber ² implicó el análisis de material de plantas para buscar alcaloides. A pesar del éxito de este trabajo y de los que siguieron la aceptación generalizada de esta técnica no se logró hasta el fin de la década de los 50, cuando Sthal ³, quien había estado trabajando en estos temas durante varios años hizo público el método. Los solventes usados como fase móvil en cromatografía de placa son idénticos a los utilizados en cromatografía de líquidos.

b. CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

En este tipo de cromatografía consta de una ordinaria hoja de papel filtro de textura y espesor controlados. Dado que el papel esta hecho de celulosa, un polisacárido altamente hidroxilado, posee una gran afinidad por el agua y otros solvente polares, El agua fuertemente unida es la verdadera fase estacionaria, y a medida que la fase móvil pasa sobre la superficie del papel, los solutos se distribuyen entre la capa unida de agua y el solvente de la fase móvil. por lo tanto el mecanismo que predomina es el de partición.

c. CROMATOGRAFIA DE GASES.

La metodología de la cromatografía de gases se divide en dos clases de acuerdo sólo con la naturaleza de la fase estacionaria, dado que la fase estacionaria es siempre un gas. Estas clases son: Cromatografía gas-sólido (CGS), el cual la fase estacionaria es un material absorbente de tipo sólido y las partículas del soluto son extraídas de la fase móvil mediante fuerzas electrostáticas, y la cromatografía de gas-líquido (CGL), en la cual la fase estacionaria es una capa delgada de líquido usualmente uno que recubre la superficie de una partícula inerte. En este método las moléculas del soluto son retenidas en la fase líquida basadas en su coeficiente de partición entre ella y la fase móvil gaseosa.

d. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

1. DESARROLLO HISTORICO.

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales. en una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; a continuación agregó más éter de petróleo y observó que a medida que el éter pasaba a través de la columna se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantinas. Aunque Michael Tswett publicó en 1906 su trabajo completo sobre cromatografía de líquidos, en el cual explicó completamente la naturaleza de los procesos y la apreciación de su potencial, no se adoptó esta técnica ampliamente hasta muchos años después de publicada. En 1941, Martin y Synge quienes no habían tenido éxito al usar la extracción por contra corrientes para la separación de aminoácidos en muestras de lana, desarrollaron un proceso de cromatografía líquida en la cual usaron una columna que contenía gel de sílice saturado en agua y una fase móvil de butanol cloroformo, perfeccionaron estas técnicas experimentales y explicaron los aspectos teóricos del procedimiento tan profundamente que se les otorgó por ello el premio Nobel en 1952. Desde entonces, la cromatografía de líquidos se ha convertido en una de las técnicas más versátiles de las que dispone el analista debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución (9).

Se pueden desarrollar separaciones basadas en características tan diversas como la polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, su peso molecular, su capacidad de partición o su capacidad para formar complejos de afinidad.

El término cromatografía líquida se usa hoy día para referirse a aquellos métodos en los cuales la separación tiene lugar en una columna empacada, El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido con una fase líquida.

Se usa una fase móvil líquida como eluyente.

El proceso de la cromatografía de líquidos puede ser realizado usando uno de los dos métodos que son los siguientes

a. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS CLASICA.

Durante muchos años se practicó la cromatografía de líquidos en una forma llamada clásica y que consiste básicamente en lo siguiente una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre 2 a 10 cm rellena de algún material como gel de sílice, alúmina, azúcar, etc. cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a las 200 micras, se introduce la muestra disuelta en la fase móvil o disolvente por medio de un cuentagotas o de una pipeta, luego se agrega el disolvente, con el cual se eluye la muestra a través de la columna, los tamaños de las muestras varían entre 0.1 y 1.0 g o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta 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 muchas veces puede ser de horas e incluso 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 absorbe en forma irreversible.

El problema principal de este tipo de cromatografía es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil. En general se usa una 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.

b. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. (CLAR).

En esta técnica se utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. En este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido por ejemplo 2 mm. rellenas de materiales especiales pulverizados cuyas partículas tiene un tamaño no mayor de 30 a 40 micras y con frecuencia hasta de 3 a 10 micras, generalmente con una distribución de tamaños no mayor de 2 micras. este tipo de columnas es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil o sea una gran caída de presión por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de la fase estacionaria dentro de la columna es pequeña pero se requiere que la muestra también sea pequeña entre 0.1 y 10 mg.

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (100 atm o menos), la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión, a presiones más elevadas se utilizan las válvulas de inyección.

Debido a la eficiencia demasiado alta se obtienen unos 50000 platos por metro, en este método de cromatografía las presiones que se alcanzan oscilan entre 1000 y 35000 psi.

Al igual que toda técnica analítica la cromatografía de líquidos de alta presión tiene algunas limitaciones las cuales se muestran a continuación.

VENTAJAS.

- Velocidad de análisis
- Alta resolución.
- Resultados cuantitativos
- Buena sensibilidad y automatización
- Amplio espectro y aplicaciones

LIMITACIONES.

- Instrumentación costosa.
- Difícil análisis cualitativo
- No existe detector universal.
- Elevado costo de operación.
- Experiencia indispensable.

Con esta técnica es usual obtener separaciones en término de minutos e inclusive en algunos segundos.

2. DEFINICIONES. 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.

a. Tiempo de retención. (t_r). Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento 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 unidades de tiempo. (segundos).

b. Tiempo muerto (t_0 ó t_m). 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. 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:

$$N = 16 (t_r / W_b)^2$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna.

d. Anchura 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 sea gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de la desviación estándar de una distribución gaussiana.

e. **Altura equivalente a un plato teórico. (AEPT = L/ N).**

$$AEPT = L/ N$$

Donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente 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 en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud.

f. **Velocidad lineal promedio de la fase móvil (u).** Se expresa por:

$$u = L / t_0$$

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

g. **Coefficiente de distribución o de reparto. (k).**

Se representa por:

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

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

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

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

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

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

$$K' = t_R / t_0$$

Si se combinan las definiciones anteriores también se pueden expresar por:

$$k = k' \times \beta$$

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

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(1/2)(W_a + W_b)} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_a + W_b}$$

Todos los miembros de esta ecuación deben de ser expresados 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.

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

$$\alpha = t_{R2} / t_{R1}$$

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

3. MECANISMO DE SEPARACION.

Hay cinco métodos o formas de realizar la cromatografía de líquidos de alta presión, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra mediante un cambio de columnas es posible utilizar cada uno de ellos. El modo de separación depende primariamente de la naturaleza de la fase estacionaria, los métodos son los siguientes:

a. Adsorción. En esta forma o método de cromatografía líquida como en la cromatografía de gas-sólido, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellas temporalmente, a nivel de la superficie activa. Las fuerzas implicadas suelen ser relativamente débiles y son eficaces sólo sobre distancias cortas. Estas incluyen fuerzas de London y Van der Waals, interacciones dipolo y dipolo inducido con grupos polares ubicados sobre la superficie activa, fuerzas de transferencia de carga y uniones hidrógeno. Con este tipo de unión, llamada adsorción física, la energía necesaria para romper las uniones es pequeña y la fase móvil, a través de su capacidad para disolver y desplazar los solutos, puede contrarrestar eficazmente estas fuerzas atractivas. Por lo tanto un proceso cromatográfico eficiente puede estar basado en la competencia existente entre la disolución del soluto de la fase móvil y la fijación a la superficie de la fase estacionaria. Sin embargo cuando se forman uniones químicas más fuertes entre los solutos y el absorbente, como ocurre en el proceso de la quimioadsorción, la fase móvil no se puede proveer de energía suficiente como para desadsorber los solutos. En este caso no se llega al equilibrio entre ambas fases, y los solutos irreversiblemente absorbidos o dan picos de elución no satisfactorios o con colas.

Algunas de las sustancias que se usan más frecuentemente son sacarosa, almidón, alumina, talco, carbonato de calcio, fosfato de calcio, magnesita, gel de sílice, silicato de magnesio, alúmina, carbón. Además de la adsorptividad, poseen una función muy importante la superficie, el tamaño de la partícula y la actividad superficial para determinar la actividad de un absorbente potencial. Es necesaria una gran superficie para aumentar el área de contacto entre las dos fases y asegurar el intercambio frecuente del soluto. Es importante el tamaño de las partículas, no sólo como indicador de la superficie sino también porque determina la resistencia de la columna empacada al flujo del solvente.

Mientras que partículas muy pequeñas puedan dar una mayor superficie para que haya más interacciones con los solutos, puede empacarse tan fuertemente que no se alcance una velocidad de flujo razonable sin que sea necesario recurrir a la técnica de CLAP, con una pérdida consecuente de la cantidad de la muestra. Con el fin de dar una superficie reproducible, es de práctica común activar un absorbente mediante el calentamiento para expeler la mayor parte del agua y entonces desactivarla hasta un nivel deseado mediante la exposición a un clima de humedad conocida retornando una cantidad conocida de agua al absorbente.

Entre los absorbentes comúnmente usados, el gel de sílice y la alúmina poseen superficies ricas en grupos hidróxilo y en átomos de oxígeno que interactúan fuertemente con los solutos polares. El carbón activado a 1000°C para hacerlo no reactivo hacia los compuestos polares poseen una superficie muy porosa que reduce el proceso de adsorción y desorción y lo hace más susceptible de quimioadsorción. Las separaciones sobre carbón se basan principalmente en el peso molecular siendo los compuestos más grandes los que se retienen más fuertemente. El silicato de magnesio posee una superficie ácida característica de los silicatos insolubles y es similar a la alúmina en cuanto a sus propiedades adsorptivas.

Este mecanismo de separación también llamado cromatografía líquido-sólido (CLS), se basa en la competencia que existe entre las moléculas del soluto con la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos de la superficie de la fase estacionaria. En muchas ocasiones debido a una fuerte adsorción de compuestos de la muestra en el sólido activo es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme con el cual se logra un incremento en la solubilidad de los solutos en la muestra en la fase móvil. A esta variable se le denomina elución por gradiente o por programación de la fase móvil.

b. Partición.

En esta forma de cromatografía líquida la mezcla de los solutos se separa de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para unirse ya sea a la fase móvil o a la fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre la superficie del soporte sólido. El líquido está presente como una capa extremadamente delgada, de modo que el equilibrio entre las fases se puede lograr rápidamente mediante la reducción de la difusión de los solutos dentro de la fase estacionaria. la superficie del soporte sólido se trata a menudo, por ejemplo mediante sililación, con el fin de eliminar los efectos adsorptivos.

Aunque este tipo de cromatografía ha sido empleada para muchos análisis exitosos, fue hasta hace poco un método inconveniente para ser usado en procesos experimentales. La fase líquida debía de ser colocada sobre el soporte sólido mediante la evaporación de una solución o mediante la inyección de ésta sobre la columna con la fase móvil fluyendo. En cualquiera de los casos se hacía difícil obtener fases estacionarias que fueran reproducibles y estables. Además la elección de la fase móvil estaba necesariamente restringida a aquella en las cuales la cobertura líquida tenía solubilidad limitada. Por ejemplo si se debía de usar un polietilenglicol para dar una fase estacionaria muy polar, debía de usarse una fase móvil de hexano u otro hidrocarburo de baja polaridad, incluso la fase estacionaria debería de ser lenta pero continuamente despegada de la columna, cambiando de esta manera las características de la separación con el fin de prevenir el despegado, se satura la fase móvil con el material de la fase líquida o se insertaba una precolumna con una alta concentración de la fase líquida colocada sobre un soporte sólido, dentro del sistema antes dentro de la columna analítica. En cada caso se cambiaba la naturaleza de la fase móvil y los coeficientes de partición se hacían menos favorables.

Estos problemas han sido resueltos mediante el desarrollo de la cromatografía de fase unida, en la cual la fase líquida se halla siempre unida químicamente a la superficie del sólido. El gel de sílice con su alta población de grupos hidróxilo en la superficie provee un medio excelente sobre el cual se pueden unir varias sustancias usando agentes similares sustituidos adecuadamente por ejemplo. El cloruro de octadecildimetilsililo reacciona con un gel de sílice para formar una fase estacionaria estable no polar llamada octadecilsililo y octadecililano (ODS).

La cromatografía de partición puede realizarse de dos maneras, en fase normal o en fase reversa. En la fase normal la fase estacionaria es una sustancia polar tal como el polietilenglicol, y la fase móvil es no polar, Por ejemplo hexano. Bajo estas condiciones los compuestos polares se retardan de modo preferencial y las sustancias no polares eluyen más rápidamente. En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar, por ejemplo ODS, y la fase móvil es polar, usualmente una mezcla de agua, metanol, acetonitrilo. Los compuestos no polares se retienen más frecuentemente por este sistema, mientras que los solutos polares eluyen primero. Las separaciones de la fase reversa son los métodos más frecuentemente usados en cromatografía de líquidos de alta presión.

Debido a la eficiencia y disponibilidad de los materiales de la fase reversa, especialmente el ODS, o el tipo de C8, se han realizado intentos de usuarios para realizar mezclas de compuestos iónicos, como aminoácidos.

Normalmente estos compuestos no serían retenidos en un empaquetamiento de fase reversa, dado que son demasiado polares para separarse apreciablemente sobre la fase estacionaria. Se han desarrollado varias técnicas, todas las cuales implican alterar la fase móvil para permitir la cromatografía adecuada de compuestos iónicos, usando estas fases estacionarias. Estos métodos se llaman cromatografía de supresión iónica, cromatografía de par iónico o cromatografía de jabón.

c. Intercambio Iónico.

Aunque la técnica de par iónico o apareamiento iónico ha resultado ser útil en muchos casos para separar mezclas de sustancias iónicas, el método habitual para analizar estos compuestos es la cromatografía de intercambio iónico. Este método posee un mayor grado de selectividad debido al mayor número de combinaciones de fases móviles y estacionarias que pueden usarse. Es especialmente útil para cationes inorgánicas aminoácidos y grupos similares de compuestos estrechamente relacionados.

Los materiales de la fase estacionaria que se emplean para efectuar estas separaciones se llaman intercambiadores iónicos y comprenden un grupo de polímeros naturales o sintéticos orgánicos e inorgánicos que son capaces de extraer iones de modo reversible de una solución, mientras que al mismo tiempo los reemplaza con iones de carga equivalente. En todo momento, durante el proceso de intercambio, debe obedecerse el principio de electroneutralidad tanto en el intercambiador iónico como en la solución. Un intercambiador iónico contiene iones fijos que se incorporan permanentemente dentro de su esqueleto insoluble, y contraiones débilmente unidos que poseen carga opuesta a la de los iones fijos y son capaces de intercambiar cuando se absorben especies cargadas de la solución. Si los contraiones poseen carga positiva, el material se llama intercambiador de cationes; si poseen carga negativa, se llama intercambiador de aniones.

Los materiales de intercambio iónico más frecuentemente usados son los copolímeros orgánicos hechos de etileno (vinil-benceno) y divinilbenceno (DVB). El estireno se polimeriza para dar cadenas largas y retorcidas de átomos de carbono con un anillo bencénico. Se agrega el divinilbenceno para entrecruzar estas cadenas y dar una estructura tridimensional tipo cuentas. Las resinas de intercambio iónico comerciales se identifican de acuerdo con su porcentaje de entrecruzamiento correspondiendo al porcentaje inicial de divinilbenceno en la mezcla de reacción.

Los cromatogramas de intercambio iónico pueden desarrollarse mediante el desplazamiento o por métodos de elución. En el primer caso un ion que es retenido más fuertemente que cualquiera que los iones del soluto los desplaza de la resina y el resultado es una serie continua de bandas. En el método de elución el agente es un ion para el cual la resina posee menos selectividad que los iones del soluto. La transferencia de los iones del soluto hacia la resina y desde ella depende de su equilibrio de intercambio con el ion eluyente. El cromatograma resultante resulta de una serie de picos gaussianos separados.

Las fases móviles que se usan en cromatografía de intercambio iónico son generalmente soluciones salinas acuosas que pueden tamponarse a un pH deseado o ajustarse a una fuerza iónica constante. La elección de la fase móvil depende del conocimiento que se posea sobre la selectividad de la resina para los iones del soluto y de la influencia de los equilibrios de la solución debido al pH o a complejaciones. Los solventes mixtos acuosos-orgánicos o los solventes orgánicos pueden usarse si la fase estacionaria no se altera. La elución por gradiente se usa para las separaciones difíciles.

d. Exclusión de tamaño.

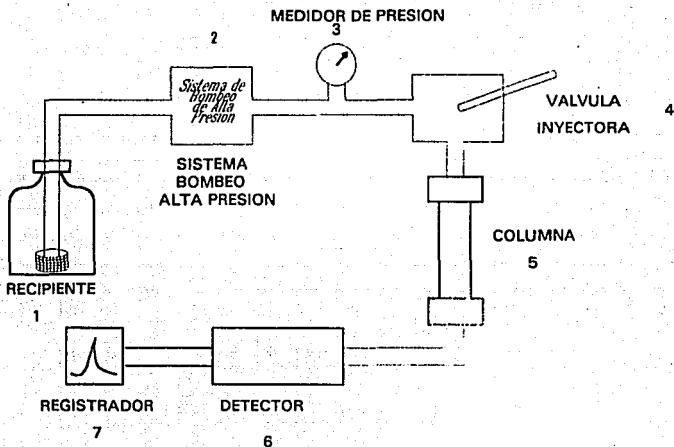
La cromatografía por exclusión de tamaño, también llamada cromatografía en gel, es una técnica relativamente nueva utilizada para separar grupos de solutos basada en su tamaño efectivo de solución. Las fases estacionarias para lograr estas separaciones son polímeros que han sido entrecruzados para dar una red abierta con, numerosos poros de tamaño uniforme. El grado de entrecruzamiento se controla cuidadosamente para tener una serie de geles que poseen diferentes tamaños de poro o de intervalos de fraccionamiento. Cuando una fase móvil que contiene una mezcla de solutos de varios tamaños se hace pasar por una columna de estos materiales, las moléculas que son demasiado grandes como para entrar dentro de los poros son excluidas y permanecen completamente en la fase móvil. Por lo tanto son eluidas rápidamente cerca del volumen de elución. Las moléculas de menor tamaño son libres de difundir dentro y fuera de los poros de modo que en efecto, su trayecto a través de la columna es más largo y eluirán más tarde. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas incluidas respecto del tamaño de los poros.

De este modo las moléculas más pequeñas penetran a todos los poros mientras que las moléculas de tamaño intermedio debido a la velocidad de la fase móvil no tendrán tiempo suficiente para difundir dentro de todos los poros en los cuales penetrarían normalmente, y por lo tanto serán retenidas con menor eficacia. El resultado es un cromatograma que consta de un pico inicial que contiene todas las sustancias totalmente excluidas seguidas de un grupo de picos que representan todas las sustancias que han sido retenidas de modo parcial y separadas, y finalmente otro pico causado por todos los solutos que son incluidos totalmente.

e Afinidad.

La cromatografía de afinidad se emplea en situaciones en las cuales se desea obtener separaciones muy específicas, es una forma altamente muy especializada de cromatografía de adsorción. Esta técnica usa un ligando específico, en el cual ha sido inmovilizado mediante la unión química a una matriz insoluble, para poder absorber reversiblemente una sola especie molecular contenida en una mezcla de solutos. Este método difiere de otros debido a que intenta separar una mezcla de solutos para realizar análisis cualitativo o cuantitativo, solo tiene que ver con la extracción de una especie única de la mezcla. lograr su mayor utilidad como una técnica altamente específica para purificación para moléculas biológicas.

PARTES DE LAS QUE CONSTA UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).



5. INSTRUMENTAL.

Debido a la exactitud de los resultados en los análisis para el manejo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, se debe de contar con un equipo experimental más elaborado que el que se emplea en la cromatografía de líquidos llamada clásica.

a. Reservorio.

Los reservorios de los solventes son de vidrio o acero inoxidable, capaces de tener hasta un litro de fase móvil la cual pueda constar de solventes orgánicos puros o de soluciones acuosas de sales o buffers. Las sustancias usadas para preparar estas mezclas deben de ser de la mayor pureza posible dado que los contaminantes se depositarán eventualmente sobre la columna e interrumpirán la cromatografía. Las fases móviles se someten a tratamiento para desgasificarlas usando vacío o sonicación (por medio de ultrasonido) para eliminar gases en la bomba o en el detector y se filtra por membrana de poro de 0.45 micras para remover partículas extrañas que puedan tapar el sistema.

1) 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; de ahí que se traten los aspectos generales y las características de la fase móvil en este capítulo. En lo que respecta a las características que deben de presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de líquidos cabe citar:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- Un valor de k' de 1 a 10.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben seleccionar con cuidado. Cuando se lleva a cabo cromatografía líquido-líquido, la fase móvil puede disolver a la fase estacionaria. Para evitarlo se satura la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad, antes de ser utilizada, o mediante el uso de una precolumna, que, por lo general consiste en una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de los utilizados en cromatografía de gases, que contenga un alto porcentaje de fase estacionaria. A través de esta precolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de fase estacionaria.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe de ser compatible con el detector empleado lo cual es particularmente en el caso de la programación de la fase móvil, puesto que el cambio de composición de ésta puede afectar el funcionamiento del detector.

La fase móvil o disolvente como también se le llama, debe de ser de alta pureza usualmente grado cromatográfico, o en el último de los casos grado espectro; esto es importante cuando se desea realizar análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta o el de fluorescencia. Los disolventes empleados en cromatografía de líquidos son los mismos que se emplean en cromatografía de capa fina y que se muestran con respecto a su valor eluotrópico.

b. Bomba.

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían demasiado lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación.
- Intervalo de volúmenes obtenidos.
- Reproducibilidad y constancia de flujo.
- Características de flujo (continuo o pausado)

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

c. Columna acondicionadora de solvente.

Se usa sólo bajo circunstancias especiales. La mayoría de los materiales que se utiliza para reempacar columnas en cromatografía de líquidos se preparan de gel de sílice que se disolverá lentamente en solventes cuyos valores de pH estén por debajo de 2 o por encima de 7. Esto dará por resultado un achicamiento del material de empaque originando espacios muertos en los cuales los solutos separados se remezclan o se diluyen provocando, por lo tanto una pérdida de resolución. Por ello con el fin de reducir y proteger los materiales de tipo sílice que se usan para reempacar y que son muy caros, se inserta una pequeña columna de 2 a 5 cm empacada con gel de sílice grado HPLC dentro de la corriente líquida que está después de la bomba, estas columnas son también llamadas precolumnas. El material de esta columna no se disuelve, saturando la fase móvil y preservando la columna analítica.

d Inyector.

Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño, puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño, y sus cavidades deben de ser bien barridas por la fase móvil. Los hay de inyección manual e inyección automática.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la introducción de la muestra se efectuaba de forma muy similar o como se realiza en los cromatográficos de gases, o sea mediante una jeringa de muy pequeña capacidad con la cual se inyecta la muestra dentro de una pequeña cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

El instrumental moderno emplea por lo general válvulas inyectoras, aquí la muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción de tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 100 microlitros). la muestra se inyecta en la columna acondicionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y de salida se invierte.

Existiendo también inyectores automáticos, en los cuales se pone la muestra dentro de unos pequeños tubos de 1 ml llamados viales se colocan en el carrusel del automuestreador automático se programa el equipo con el número de inyecciones deseadas y listo.

e. Columna.

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o en fase gaseosa, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla en estudio. Básicamente la 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 acero inoxidable es el más usado. En algunos casos también se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones.

La longitud de las columnas es por lo general, entre 10 y 50 cm, aunque en ocasiones puede ser más pequeña o bastante más largas. La capacidad de las columnas depende de la longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 mm.) y efectúan análisis muy rápidos, su capacidad es muy limitada y la muestra debe de ser entonces de tamaño muy reducido, lo que exige un detector muy sensible.

Respecto a la forma geométrica de la columna, por regla general, se prefieren las rectas a las de cualquier otra forma, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas. Las columnas en forma de 8 son empleadas por lo general cuando se requiere control de temperatura.

En la actualidad las columnas empleadas en CLAR han alcanzado un grado de desarrollo sorprendente, siendo común obtener eficiencias del orden de 50 000 platos teóricos por metro de columna, lo cual es en general superior a los obtenidos en cromatografía de gases.

Los avances en la tecnología de columnas pueden resumirse como sigue:

- Elaboración de partículas de tamaño muy reducido (3 micras)
- Uniformidad de tamaño de partícula.
- Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
- Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

f. Detectores.

Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vio obstaculizado por la falta de detectores adecuados, el detector ideal sería aquél que satisficiera los siguientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal. Aún hoy día no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular. El problema de diseñar y construir detectores para cromatografía líquida no ha sido tarea fácil y ha requerido de una tecnología avanzada.

El problema del detector de cromatografía de líquidos se entiende mejor si se piensa en el proceso que se debe de llevar a efecto. ahora hace falta un cierto dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna, por desgracia la mayoría de las propiedades de la muestra que pudieran medirse son muy similares en magnitud y características a las del disolvente (fase móvil), y esto dificulta el proceso de detección. Para resolver este problema se sugieren dos caminos que consisten: Uno en eliminar el disolvente con anterioridad al proceso de detección y el otro, en medir alguna propiedad de la solución que contiene la muestra y de alguna manera compensar o sustraer de la propiedad medida aquella fracción que sólo corresponde al disolvente.

supuesto que esto no es fácil de hacer, porque para lograr una alta sensibilidad se deben de controlar además de parámetros de operación susceptibles de influenciar dichas propiedades de la solución y del disolvente. Por lo general este segundo método requiere de un control cuidadoso de flujo y de la temperatura.

1) Detector de índice de refracción.

Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna, de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.

2) Detector de luz ultravioleta.

Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. es lógico suponer que la respuesta de este detector será selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta: el de longitud de onda variable, que no sólo es de aplicación más variada y sensible sino que también más costoso, en el llamado fotómetro de luz ultravioleta que funciona a una sola longitud de onda; este último es sencillo, económico y más que suficiente para obtener buenos resultados. Existiendo también el detector más moderno que es el de arreglo de diodos .

3) Detectores de fluorescencia.

En la actualidad el detector más sensible de que se dispone es el de fluorescencia. En condiciones óptimas es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos, lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia los llamados fluorómetros de filtro, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Ambos diseños rinden buenos resultados y no parece haber muchas más ventajas en los espectrofluorómetros que compensen su alto costo.

los detectores de fluorescencia y los de luz ultravioleta pueden proporcionar espectros de absorción o emisión de las muestras retenidas momentáneamente en sus celdas, en lo que permite utilizarlos para realizar análisis cuantitativos.

g. Análisis cualitativo.

La cromatografía de líquidos es en esencia un 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.

la forma de efectuar una identificación es comparando los tiempos de retención de las sustancias por identificar con los tiempos de retención de sustancias patrones, aunque se mencionó anteriormente, esto no basta para una identificación certera. la única manera de identificar una sustancia con un 100% de seguridad es utilizando alguna técnica auxiliar, como por ejemplo, la espectrofotometría de masas, la resonancia magnética, nuclear, etc.

h. Análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo de mezclas de sustancias siempre ha sido fácil de efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos. En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de CLAR es tan confiable o aun más que los resultados obtenidos por cromatografía de gases.

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

1) Altura del pico.

Aunque el área es una medida muy precisa, la altura se emplea mucho porque es muy fácil de obtener, aunque es mucho más sensible a variaciones instrumentales. Si los picos están completamente distorsionados o asimétricos, o la cantidad de muestra está fuera de intervalo lineal del detector, no debe utilizarse esta técnica. Si hay desviaciones de la línea base, la altura de pico se obtiene interpolando la línea base entre el principio y el fin de cada uno de los picos.

2) 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.

D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

I. DEFINICIONES.

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

b. RANGO. El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia (un nivel central, dos niveles límite), el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

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

Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la muestra.

d. PRECISION. La precisión de un 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.

1 REPETIBILIDAD. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

2 REPRODUCIBILIDAD. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

e. LIMITE DE DETECCION. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones normales de operación.

f. LIMITE DE CUANTIFICACION. Es la menor concentración de la sustancia en la muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones normales de operación establecidas por dicho método.

g. ESPECIFICIDAD. 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 y no a otros componentes de la muestra.

h. TOLERANCIA. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

i. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.(8)(4).

2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA CADA UNO DE LOS PARAMETROS.

I. SISTEMA.

II. METODO.

I. SISTEMA.

a. 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 teniendo un nivel del 100% de la concentración esperada.

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

Media (\bar{X}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), pendiente (B), ordenada al origen (A), coeficiente de correlación lineal (R) error estándar de correlación (R^2) y la sensibilidad.(3)

CRITERIO.

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$R \geq 0.99$$

$$R^2 \geq 0.98$$

b. PRECISION DEL SISTEMA.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% de la concentración esperada, establecida en la linealidad del método.

Con los datos obtenidos calcular:
media, desviación estándar, y coeficiente de variación.(3)

CRITERIO.

$$CV \leq 1.5\%$$

II. METODO.

c. LINEALIDAD DEL METODO.

Se determina construyendo placebos adicionados al principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, se realiza con cinco niveles de concentración que corresponden generalmente a 80,90,100,110,120% 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 deberá ser más extenso (50 a 150%), la amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad 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:

La media, desviación estándar, coeficiente de variación, pendiente, ordenada al origen, coeficiente de correlación lineal, error experimental de regresión y sensibilidad.

También debe de construirse la curva y calcular la ecuación de la recta que indique un modelo lineal.(3)

CRITERIO.

Ordenada al origen	(A) = 0.00
Pendiente	(B) = 1.00
Coefficiente de correlación lineal	(R) \geq 0.999

El coeficiente de variación dependerá del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo en la muestra, como se observa en la tabla 1.

Método	CV %
Cromatográfico	2.0
Químico	3.0
Espectrofotométrico	3.0
Microbiológico	5.0

tabla 1.

d. EXACTITUD DEL METODO.

Se determina por el análisis de diez 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 esperada.

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

Con los resultados obtenidos calcular:

La media, la desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza.

CRITERIO.

El coeficiente de variación expresa la desviación que existe entre una y otra muestra y esta expresado en % . En la tabla 2 se muestran los valores de coeficiente de variación para la evaluación de la exactitud, dependiendo del método de cuantificación. (3).

Método	CV %
Cromatografía de líquidos (CLAR)	2.0
Espectrofotométricos.	2.0
Titrimétricos	3 a 5.0

tabla 2

e. PRECISION DEL METODO.

REPRODUCIBILIDAD. Es importante evaluar la influencia de la variación debida en el método cuando se analicen cantidades conocidas adicionadas del principio activo a un placebo y relacionarlas con el análisis del producto (forma farmacéutica), pues la adición del ingrediente incluye un error experimental distinto a la variación existente en el producto a ensayar.

Esta variación puede evaluarse conjuntamente con la reproducibilidad del método, por lo que se deberá de preparar al placebo de acuerdo al procedimiento de manufactura normal con cantidades perfectamente conocidas y analizándolas por diferentes analistas, así como por un analista solo, bajo las mismas condiciones de operación, en días diferentes.

La evaluación de la reproducibilidad se hace con respecto a un tabla de análisis de varianza (ANADEVA), la cual nos indica la fuente de variación que se obtiene de los resultados.

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

Con los resultados obtenidos calcular:
la media, el coeficiente de variación, desviación estándar y F de cálculo.(3)

CRITERIO.

Los valores para el coeficiente de variación se muestran en la siguiente tabla.

Método	CV%
Microbiológicos	3 a 5 máximo
Titrimétricos	3 máximo
Espectrofotométricos	3 máximo
Cromatográficos.	2 máximo

Criterio para F calculada (F Calc).

$$\begin{aligned} F_{\text{analista}} (F_a) &< F_{\text{Tablas}} (F_{\text{tab}}). \\ F_{\text{día}} (F_d) &< F_{\text{Tablas}} (F_{\text{tab}}). \end{aligned}$$

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

f. LIMITE DE CUANTIFICACION.

El límite de cuantificación puede ser determinado como, la cantidad de sustancia de interés o de sustancias indeseables, las cuales proporcionan una señal.

Este parámetro generalmente se controla cuando se trata de método para cuantificar fármacos en fluidos biológicos debido que estos se encuentran en cantidades muy pequeñas y su extracción es difícil de realizarse por existir otros componentes.

Se determina adicionando cantidades exactas del fármaco correspondientes al 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, y 25% de la concentración máxima esperada.

Con los resultados obtenidos se determinan los límites de confianza de la recta de regresión tomando en cuenta los valores obtenidos de la media, desviación estándar para X y para Y, la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de correlación lineal, el error típico de estimación modificando (S_y/x) y el coeficiente de variación.

CRITERIO.

El intercepto del ruido es el límite inferior de confianza de la recta de regresión, se considera el límite inferior de la detección al 95% de confianza. El límite inferior de detección es la concentración de la muestra que tiene una señal ruido $(S/R) = 2$ por ejemplo.

g. ESPECIFICIDAD.

El parámetro de especificidad se realiza dependiendo del tipo de método (Control de Calidad, o indicativo de Estabilidad).

1 METODOS DE CONTROL DE CALIDAD.

Se realiza de la siguiente manera:

- Analizar placebos del producto con el método propuesto.
- Identificar las respuestas de los activos, excipientes en caso de tenerla, y de otras sustancias auxiliares.
- En caso de contar con los posibles productos de degradación se preparan muestras con placebos "adicionados" de estos a la sustancia de interés y se analizan con el método propuesto.

-Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

-De no ser así, optimizar el método desarrollado ó desarrollar otro.

2 METODOS 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 sus 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 este disminuida de un 10 a un 50% con respecto a la original.

-Colocar la sustancia de interés, el placebo y el placebo cargado, en un horno a 70°C, 120°C o 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 la luz UV o a la luz fluorescente y/o humedad.

-Si es necesario hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH de 1 a 2 y de 10 a 12 y colocarlas a 60°C durante 2 semanas. 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 (pH 1 a 2 y 10 a 12), colocando las muestras a 60°C durante 2 semanas.

-Checar la aparición de las sustancias relacionadas (productos de degradación), utilizando por lo menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: Cromatografía de Líquidos, Cromatografía de Gases, y Cromatografía de placa.

CRITERIO.

-Verificar que cada producto de degradación pueda ser separado de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado (interferencia no mayor de 2%).

-Optimizar el método o desarrollar otro.

CAPITULO II.

OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

-Desarrollar un método analítico para la cuantificación de Ketoconazol por medio de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución.

OBJETIVOS PARTICULARES.

-Verificar el método de la forma farmacéutica en estudio. Ya que en la Farmacopea Nacional sólo está indicado para Tabletas.

-Adaptar el método en caso de ser necesario.

-Validar el método Desarrollado.

CAPITULO III.
PARTE EXPERIMENTAL.

PARTE EXPERIMENTAL.

A. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA ANALITICA POR CROMATOGRAFIAD E LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

De acuerdo a que no existe una metodología analítica para cuantificar Ketoconazol en crema se vio la necesidad de desarrollar una metodología por Cromatografía de Líquidos de alta Resolución. La cual sea práctica, eficiente y confiable, y que pueda ser empleada como método de rutina, así como Indicativo de Estabilidad.

De acuerdo a las propiedades de la molécula que presenta un grupo carboxílico unido al grupo de las piperazinas, presenta un pka de 5.2, lo cual nos dice que nuestra molécula es casi neutra, por lo que se decidió realizar por Cromatografía de Líquidos de Fase reversa.

Se probó en una columna C18 de 150 mm x 3.9 mm. de diámetro interno. Novapak, ya que presenta un tamaño de partícula más pequeño y por lo tanto existe una mayor resolución, se pensó en una mezcla Metanol-Buffer, ahora el problema era el tipo de buffer, se probaron varios buffers midiéndoles el pH hasta llegar al fosfato monobásico de amonio por sus características básicas era más fácil de llegar al pH óptimo del pka.

Se comenzó trabajando una proporción de 50% Metanol-50% Buffer con el pH del pka, no observándose buenos resultados, se comenzó a cambiar el pH hasta llegar al pH de 6.6 donde salía un pico uniforme, pero existía el inconveniente de que salía en un tiempo de retención muy largo, eso se podía mejorar cambiando las proporciones de la fase orgánica hasta llegar a la concentraciones de 25% de Buffer 75% de Metanol grado HPLC.

La molaridad del Buffer fue de 0.1M inicialmente encontrándose que la columna se ensuciaba muy fácilmente y dobleteaba los picos, se pensó en disminuir la molaridad del buffer a 0.01 M., no existiendo una modificación del pico. trabajándose así con esa molaridad para el Buffer.

La longitud de onda se decidió de acuerdo a que presenta un máximo a 230 nm y esa se utilizó.

Para la separación del activo con respecto de la forma farmacéutica (crema) se eligió el metanol por sus cualidades de romper emulsiones, rompiéndose así la emulsión de la crema, después se pensó en como extraer al activo, se pensó en una mezcla de solventes (metanol 30, agua 70, ácido acético 1), teniendo así una parte hidrofílica y otra parte hidrofóbica y así poder extraer al principio activo de la crema.

B. METODOLOGIA.

I MATERIAL.

Frascos de vidrio color ámbar con tapa	60 ml	
Matraz volumétrico	50 ml.	pyrex.
Pipeta volumétrica	25 ml.	kimax.
Probeta graduada	500 ml	pyrex.
Tubos de ensayo	13 x 100 mm.	kimax
Vasos de precipitado	100 ml	pyrex.

Membranas de nylon 66, 0.22 micras de 47 mm de diámetro.

Kit de filtración para solventes marca Millipore.

Kit de filtración para membranas marca Millipore.

Equipo de filtración para muestras.

Filtros de 0.45 micras o equivalente.

2.EQUIPO.

Baño de Ultrasonido

Balanza Analítica

Centrifuga.

Cromatógrafo de Líquidos

Bomba

Detector

Columna

Automuestreador

Detector UV/Vis

Computadora (PC)

Impresora

Mettler modelo ME-11

Mettler modelo AM 100

Solvat.

Beckman

Beckman modelo 126

Beckman modelo 166

μ -Nova-pak C18 150 mm x 4.5 mm

Beckman modelo 502

Beckman modelo 168

Modelo IBM.

Marca Epson.

3. REACTIVOS.

Agua grado HPLC
Acido fosfórico al 85%
Estándar secundario de ketoconazol
Fosfato monobásico de amonio.
Hidróxido de amonio.
Metanol grado HPLC.
Metanol grado reactivo.

4 METODO.

1. PREPARACION DE SOLUCIONES.

A. SOLUCION FLOCULANTE.

Mezclar 30 ml. de metanol con 70 ml de agua y 0.1 ml. de ácido acético glacial.

B.SOLVENTE ACUOSO.

Solución de fosfato de amonio 0.01 M. Disolver en un matraz volumétrico de 1000 ml., 1.1503 g. de fosfato monobásico de amonio en agua grado HPLC y llevar a volumen con el mismo solvente. Ajustar el pH a 6.6 con hidróxido de amonio al 50% (v/v). Filtrar a través del equipo de clarificación de solventes y desgasificar por 15 minutos en el ultrasonido.

C. SOLVENTE ORGANICO.

Filtrar 500 ml., de metanol grado HPLC a través del equipo de clarificación de solventes y desgasificar por 15 minutos en el baño de ultrasonido.

D. FASE MOVIL.

Mezclar 25 ml., de la solución de fosfato de amonio 0.01M con 75 ml de metanol grado HPLC. Filtrar a través del equipo de clarificación de solventes y desgasificar por 10 minutos.

E. SOLUCION ESTANDAR.

Transferir a un matraz aforado de 50 ml alrededor de 50 mg de ketoconazol estándar de referencia, exactamente pesados, agregar 30 ml de fase móvil. Agitar en un baño de ultrasonido durante 10 minutos, diluir y aforar con fase móvil. Transferir una alícuota de 5 ml a un matraz aforado de 50 ml y llevar a volumen con fase móvil. Pasar la solución a través de filtro Millex de 45 micras o equivalente (Concentración: 100 µg/ml).

F.SOLUCION DE LA MUESTRA.

Preparar una solución de la muestra por duplicado. Pesar 1.25 g. de crema (equivalente a 25 mg. de Ketoconazol) en un frasco ámbar de 60 ml con tapa, y adicionar con pipeta volumétrica 25 ml. de metanol grado reactivo y poner en un baño de ultrasonido durante 30 minutos, adicionar con pipeta volumétrica 25 ml. de la solución floculante, cerrar perfectamente y agitar vigorosamente de forma manual, centrifugar durante 15 minutos a 3500 rpm. transferir una alícuota de 10 ml de sobrenadante a un matraz aforado de 50 ml, diluir y aforar con fase móvil. Pasar la solución a través de un filtro millex de 45 micras o equivalente.

SISTEMA CROMATOGRAFICO.

Columna	Nova-pak C18 3.9 x 150 mm Millipore
Detector	Ultravioleta.
Longitud de onda	230 nm.
Flujo	0.8 ml/min.
Volumen de inyección	10 µl.

PROCEDIMIENTO.

Inyectar en el cromatógrafo 6 veces la solución estándar y calcular el coeficiente de variación y el factor de coileo para el pico correspondiente a Ketoconazol. Si el coeficiente de variación es menor de 1.5% y el factor de coileo es menor de 2, inyectar la solución problema en caso contrario dejar estabilizar el sistema y repetir las inyecciones del estándar hasta obtener los valores indicados para el coeficiente de variación y el factor de coileo. Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo 10 µl de la solución muestra. Obtener su correspondiente cromatograma y medir el área del pico.

El tiempo de retención para el Ketoconazol es de 4.6 minutos.

C. VALIDACION DEL METODO.

a. EVALUACION DEL SISTEMA.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Para evaluar este parámetro se preparó una solución patrón, como se indica en la preparación de la solución de estándar, teniendo una concentración de 1 mg/ ml., posteriormente para los cinco niveles se realizó el siguiente procedimiento.

a. Procedimiento.

En matraces volumétricos de 50 ml se vertieron los siguientes ml 8, 9, 10, 11, 12 ml de la solución patrón, para los niveles de 80, 90, 100, 110 120% respectivamente, adicionados con la ayuda de una bureta, posteriormente se diluyeron hasta el aforo con fase móvil, se filtró y se inyectaron 10 µl al cromatógrafo de líquidos con la ayuda del automuestreador automático.

PRECISION DEL SISTEMA.

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

b. EVALUACION DEL METODO ANALITICO.

1. LINEALIDAD DEL METODO.

Para la determinación de la linealidad del método se prepararon placebos cargados a cinco niveles de concentración y por triplicado cada nivel, para adicionar una cantidad conocida de Ketoconazol se preparó una solución stock con materia prima valorada de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 200 ml se pesaron con exactitud 500 mg. de ketoconazol, se aforó hasta el volumen con metanol grado reactivo para obtener una concentración de 2.5 mg/ml.

El procedimiento que se realizó para la preparación de los cinco niveles es el siguiente:

1. Procedimiento.

En un frasco de color ámbar de 60 ml con tapa se pesó 1 gramo de placebo, y con la ayuda de una bureta de 25 ml se adicionaron 8, 9, 10, 11, 12 ml de la solución patrón (para los niveles de 80, 90, 100, 110, 120 % respectivamente), posteriormente, se dispersó la muestra en un baño de ultrasonido por cinco minutos, después con la ayuda de una bureta de 25 ml, se adicionaron 17,16,15,14,13. ml de metanol grado reactivo para los niveles de 80, 90, 100, 110, y 120 % respectivamente para completar un volumen de 25 ml, con ayuda de una pipeta volumétrica de 25 ml se adicionó solución floculante, se agitó vigorosamente y se centrifugó en tubos de 40 ml., de cada uno de los niveles y replicas a 3500 r.p.m. por 15 minutos, se tomó del sobrenadante claro una alícuota de 10 ml y se llevó a un matraz aforado de 50 ml aforándose con fase móvil se filtró a través de un filtro membrana de 0.2 micras y se inyectaron 10 microlitros al cromatógrafo de líquidos con ayuda del automuestreador automático. Se registraron los resultados de las áreas de los picos obtenidos

2. EXACTITUD DEL METODO.

Para la determinación de la exactitud al 100%, se prepararon placebos cargados a un sólo nivel de concentración por decuplicado, las muestras se prepararon de la siguiente manera:

En un frasco de color ámbar de 60 ml con tapa, se pesó 1 gramo de placebo, y con la ayuda de una bureta de 25 ml se adicionaron 10 ml de la solución patrón, se dispersó la muestra en un baño de ultrasonido por 5 minutos, posteriormente con la ayuda de una bureta de 25 ml se adicionaron 15 ml, de metanol grado reactivo, y 25 ml de la solución floculante con la ayuda de una pipeta volumétrica de 25 ml, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3500 r.p.m. por 15 minutos, del sobrenadante claro se tomó una alícuota de 10 ml se llevó a un matraz aforado de 50 ml,, con fase móvil se filtró a través de un filtro membrana de 0.2 micras, y se inyectaron 10 microlitros con la ayuda de un automuestreador automático. Registrándose las áreas de los picos obtenidos. Las 10 muestras se prepararon de la misma manera.

3. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Para determinar la estabilidad de la muestra, se prepararon 6 placebos cargados a concentración del 100%, estas muestras se prepararon de la misma manera que la exactitud.

Una vez que se prepararon las muestras y se registraron los resultados, se expusieron a la luz normal, temperatura ambiente, refrigeración, por un periodo de 24 y 48 horas (Las muestras estaban en los viales para inyectar utilizados en el automuestreador).

4. ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.

Para la determinación de la especificidad del método para control de calidad se comparó un placebo solo, un placebo cargado, y un estándar.

5. ESPECIFICIDAD PARA PRODUCTOS DE DEGRADACION.

Para probar la especificidad del método analítico para estabilidad se expusieron a la luz por un período de 1 semana de degradación en medio ácido, medio básico, por 3 días a una temperatura de 105 grados centígrados y humedad al 75% por 1 semana.

6. TOLERANCIA.

Para la determinación de la tolerancia de método se modificó la velocidad de flujo y la proporción de la fase móvil.

7. PRECISION (reproducibilidad).

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

El primer día y el segundo día, cada analista prepara tres muestras de producto terminado (al 100% de la cantidad de activo) analizándolas con el método propuesto. Evaluando así analista y día.

CAPITULO IV.
RESULTADOS.

Linealidad del Sistema

A partir de una solución Stock de estándar, se prepararon muestras con una concentración del 80, 90, 100, 110 y 120% de la cantidad requerida por el método analítico y se analizaron. Los resultados de análisis obtenidos se encuentran en la tabla No. 1, junto x^2 , y^2 , xy y la curva corregida por mínimos cuadrados.

Tabla No. 1. Linealidad del Sistema

Concentración($\mu\text{g/ml}$) X	Area bajo la curva Y	X^2	Y^2	$X \cdot Y$	curva corregida
0.000					-0.6421
80	54.94396	6400	3018.8	4395.51	55.2027
80	55.17221	6400	3043.9	4413.77	55.2027
80	54.82913	6400	3006.2	4386.33	55.2027
90	62.20515	8100	3882.4	5599.46	62.1813
90	62.41540	8100	3920.6	5635.38	62.1813
90	62.88877	8100	3954.9	5659.98	62.1813
100	68.82822	10000	4737.3	6882.82	69.1639
100	68.86662	10000	4742.6	6886.66	69.1639
100	69.22392	10000	4791.0	6922.39	69.1639
110	76.00585	12100	5776.3	8160.64	76.1446
110	76.20236	12100	5846.3	8352.25	76.1446
110	76.54647	12100	5859.3	8420.11	76.1446
120	83.37273	14400	6951.0	10694.7	83.125
120	82.93227	14400	6877.7	9951.87	83.125
120	82.82681	14400	6860.2	9939.21	83.125

Σ 1500.0 1037.45987 153000 73218.20 105840.17

número de observaciones (n) = 15

En la gráfica No. 1 se encuentran representados la Concentración contra la respuesta. La pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r^2) para la recta de regresión se determinaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

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

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

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

RESULTADOS

$$m = 0.6981$$

$$b = -0.6921$$

$$r^2 = 0.9990$$

$$r = 0.9994$$

REGLA DE DECISION.

Nuestro resultado de r^2 es 0.999 por lo tanto se cumple con los criterios de linealidad del sistema ya que deben de ser mayor de 0.98.

b. Precisión del Sistema

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente 100% establecido en la linealidad del sistema.

Número de determ.	Respuesta (Y)
1	73.39864
2	73.68933
3	74.13278
4	74.61481
5	74.29232
6	74.50097

Se determinó la sumatoria de y (Σy) :

$$\Sigma y = 444.63$$

Se determinó la sumatoria de y^2 (Σy^2):

$$\Sigma y^2 = 32950.26$$

Se calculó el promedio de las y (y_p):

$$y_p = 74.10$$

Se calculó la desviación estándar (s) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$s = \left(\frac{n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n(n-1)} \right)^{1/2} \quad \text{donde } n = \text{número total de determinaciones.}$$

$$s = 0.47419$$

Se calculó el coeficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = \frac{DE}{Y_p} \times 100 = 0.64$$

REGLA DE DECISIÓN.

El sistema es preciso sí: el coeficiente de variación es menor o igual a 1.5 %. 0.64 es menor que 1.5 por lo que concluimos que el sistema es preciso. (3)

c. Linealidad del Método

A partir de una solución Stock de estándar, se prepararon por triplicado placebos cargados con porcentajes de principio activo correspondientes al 80, 90, 100, 110 y 120 % de la cantidad requerida por el método analítico y se analizó cada una de las muestras. Los resultados de análisis obtenidos se muestran en la tabla No. 2:

Tabla No. 2 Linealidad del Método.

miligramos adicionados X	miligramos recuperados Y	X ²	Y ²	X+Y	Y ²	curva corregida
0.0000						-0.26166
80.128	80.794345	6420.7261	6527.72	6473.88		80.56305
80.128	80.559977	6420.4960	6489.90	6455.10	38713.48	80.5637
80.128	80.954333	6420.496	6553.60	6486.70		80.5637
90.144	90.013499	8125.941	8102.42	8114.17		90.6669
90.144	90.473553	8125.941	8186.18	8156.00	73573.68	90.6669
90.144	90.751690	8125.941	8236.23	8180.90		90.6669
100.160	100.553050	10032.026	10110.91	10071.3		100.7701
100.160	100.471984	10032.026	10094.61	10063.2	90899.05	100.7701
100.160	100.469664	10032.026	10094.15	10063.4		100.7701
110.176	111.383010	12138.751	12406.62	12271.9		110.8733
110.176	111.389940	12138.751	12409.72	12273.4	111589.8	110.8733
110.176	111.266670	12138.751	12380.27	12258.9		110.8733
120.192	121.089230	14446.117	14662.60	14553.9		120.9765
120.192	120.427900	14446.117	14625.57	14535.5	131372.45	120.9765
120.192	120.427900	14446.117	14502.87	14474.4		120.9765

S 1502.4 1511.55207 153489.99 15383.4474 154432.858 466148.50

- n 15 (número de observaciones)
 r 3 (número de repeticiones)
 t 5 (número de tratamientos)

En la gráfica No. 2 se encuentran representados los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados. La pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r^2) para la recta obtenida se determinaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

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

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

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

RESULTADOS

m = 1.0087
b = -0.2617
r² = 0.9994

Para elaborar la tabla de análisis de varianza (ANADEVA) Tabla 3, se determinó la suma de cuadrados de la regresión (SCr), la suma de cuadrados del error de regresión (SCer), la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa) y la suma de cuadrados del error puro (SCep) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$SCr = m\sum xy + b\sum y - ((\sum y)^2/n)$$

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

$$SCep = \sum y^2 - ((\sum y)^2/n)$$

$$SCfa = SCer - SCep$$

Resultados

SCr = 3062.23
SCer = 1.91
SCep = 0.61
SCfa = 1.30

Con los resultados anteriores se construyó la tabla de análisis de varianza (ANADEVA).

TABLA No. 3. Análisis de Varianza para la linealidad del método.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Medio de Cuadrados	F calculada	Tablas
Regresión	1	SCr 3062.23	SCr 3062.23	Fr-Sr/MCcr 20836	F(1,13 α,0.99) F(1,13,0.99) =9.07
Error de regresión	n - 2 13	SCr 1.91	SCr/ler 0.15		
Falta de ajuste	(n-2)/(r-1) 3	SCfa 1.30	SCfa/la 0.43	Ffa-MCfa/ MCep =7.05	F(3,10 α,0.95) F(3,10,0.95) =1.71
Error puro	(r-1) 10	SCep 0.061	SCep/lep 0.06		

REGLA DE DECISION:

Se comparan los valores de F calculada contra las F de tablas.

Si Fr es mayor o igual que F(1,13;0.99) y Ffa es mayor o igual que F(3,10;0.95), el modelo lineal es correcto para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.

20835.90 es mayor que 9.07 y 7.05 es mayor que 3.71 por lo tanto el modelo lineal es correcto para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.

Finalmente, se calcula la media Cuadrática del Error de Regresión (McErrReg), la media cuadrática de regresión (McReg), la desviación estándar para la pendiente (Sm) y la desviación estándar para la ordenada al origen (Sb).

$$sm = (McErrReg \left[\frac{\sum xp^2}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} + \frac{1}{n} \right])^{1/2}$$

donde: xp = promedio de x

$$sb = (McReg \left[\frac{1}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \right])^{1/2}$$

$$tm = \frac{1 - m}{sm}$$

$$tb = \frac{0 - b}{sb}$$

RESULTADOS	
McErrReg	= 0.02
McReg	= 0.62.23
sm	= 0.2664
sb	= 0.26
tm	= -0.0327
tb	= 1.0

En las tablas de distribución t de Student, se determinó el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95 ($t_{(n-1, 0.95)}$):

$$(t_{(n-1, 0.95)}) = (t_{(14, 0.95)}) = 2.145$$

REGLA DE DECISION.

Se comparan el valor de t de tablas contra los valores calculados de t_m y t_b :

Sí el valor absoluto de t_m es menor que $t_{(14, 0.95)}$, estadísticamente la pendiente es igual a 1 y

Sí el valor absoluto de t_b es menor que $t_{(14, 0.95)}$, estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

0.0327 es menor que 2.145 por lo tanto el método analítico, estadísticamente, tiene una pendiente igual a uno.

1.0 es menor que 2.145 por lo tanto el método analítico es lineal con una ordenada al origen igual a cero.

d. Exactitud del Método

Para demostrar la exactitud del método, se prepararon diez muestras de placebo cargado al 100% a partir de una solución Stock de estándar y se analizaron. En la tabla No. 4 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA No. 4. Exactitud del método.

observación (n)	% recuperado (y)
1	99.14
2	99.06
3	100.50
4	99.62
5	100.25
6	99.46
7	99.71
8	99.24
9	100.58
10	99.67

s = desviación estándar
de y = 0.519
yp = promedio de las y

Se calculó el valor de t de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(y_p - 100)(n)^{1/2}}{s} = -1.658$$

En las tablas de distribución t de Student, se determinó el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95:

$$t_{(9,0.95)} = 2.262$$

REGLA DE DECISION:

Se compara el valor de la t calculada con el valor de $t_{(9,0.95)}$ y se establece la regla de decisión siguiente:(3)

Sí el valor absoluto de la t calculada es menor que el valor de $t_{(9,0.95)}$ el método es exacto.

1.658 es menor que 2.262 por lo tanto el método analítico es exacto.

Precisión del Método

La Precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea del producto. Para evaluar este parámetro se determinó la repetibilidad y reproducibilidad del método.

REPETIBILIDAD DEL METODO:

Tiene como objetivo demostrar que existe una concordancia entre mediciones repetidas e independientes de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (mismo equipo, analista, día del análisis, etc.). Para cuantificar éste parámetro se utilizaron los datos obtenidos al evaluar la exactitud del método.

Se determinó el coeficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = \frac{(s) (100)}{y_p} = 0.52$$

REGLA DE DECISION

El método es repetible si el coeficiente de variación es menor o igual a 2,(3)

0.52 es menor que 2 por lo tanto el método analítico es repetible.

e. Reproducibilidad del Método.

Tiene como objetivo demostrar que los resultados obtenidos al utilizar el método analítico son independientes del laboratorio, analista, día del análisis o equipo utilizado en la determinación. En este caso sólo se tomó en cuenta la diferencia que podría existir entre 2 analistas y 2 días diferentes para la determinación.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 5

TABLA No. 5. Reproducibilidad del método.

DÍA	ANALISTA	
	1	2
1	90.50	89.21
	89.002	90.74
	92.502	89.33
2	91.50	89.95
	93.00	91.19
	93.00	92.65

Se calculó la suma de las combinaciones analista-día (y_{ij}):

$$y_{1.} = y_{11} + y_{12} + y_{13} = 272.0$$

$$y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123} = 277.50$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213} = 269.28$$

$$y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223} = 273.79$$

Se calculó la suma para cada analista ($y_{i..}$)

$$y_{1.} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} = 549.50$$

$$y_{2.} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223} = 543.07$$

Se calculó la suma total ($y_{...}$)

$$y_{...} = y_{1.} + y_{2.} = 1092.57$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{ij.}^2 = (y_{11})^2 + (y_{12})^2 + (y_{21})^2 + (y_{22})^2 = 298462.9$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum y_{i.}^2 = (y_{1.})^2 + (y_{2.})^2 = 596875.3$$

Se calculó la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 +$$

$$(y_{223})^2 = 99500.4$$

Se calculó la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_{i.}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr} = 3.4454$$

donde: a = número de analistas

d = número de días

r = número de repeticiones

Se calculó la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r} - \frac{\sum y_{i.}^2}{dr} = 8.4317$$

Se calculó la suma de cuadrados del error (SCe) con la siguiente fórmula:

$$SCe = \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r} = 12.7675$$

Con los datos obtenidos se construyó la tabla de análisis de varianza:

TABLA No. 6. Análisis de varianza para reproducibilidad del método.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Medio de Cuadrados	Focalizada	Tablas
Analista	b-1 1	SCa 3.4454	SCa 0.8173	F _a = SCa/MC _a 0.8173	F _(1, 16, 0.99) F(1, 2, 0.99) = 38.51
Día	(d-1) 2	SCd	SCd _{g.l.d.} 4.2158	F _d = MC _d /MC _e = 2.6416	F _(2, 16, 0.99) F(2, 8, 0.99) = 6.06
Error	(r-1)nd 8	SCe	SCe/g.l.e. 1.5959		

REGLA DE DECISION

Se comparan el valor de F_a y F_d con los valores de $F(1;2;0.95)$ y $F(2;8;0.95)$, respectivamente:

Sí el valor de F_a es menor que $F(1;2;0.95)$ el método analítico es reproducible por los analistas.

0.82 es menor que 38.51 por lo que el método analítico es reproducible por los analistas.

Sí el valor de F_d es menor que $F(2;8;0.95)$ el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

2.6416 es menor que 6.06 por lo que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

f. Estabilidad de la Muestra.

Al evaluar este parámetro se determina cuanto tiempo puede transcurrir desde que la muestra está lista para cuantificar hasta el momento de la determinación, almacenándola bajo diferentes condiciones. Se tomaron tres muestras de las utilizadas para determinar la exactitud del método, cada una de ellas se dividió en 3 partes iguales, almacenándolas bajo diversas condiciones y analizando a diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados se muestran en la tabla No. 7.

Para cada muestra y condición (tratamiento) se calculó el promedio (Y_m) y la varianza (S_i^2).

Se calculó la varianza ponderada (S_p^2) del tratamiento y la condición inicial:

$$S_p^2 = \frac{s_0^2 + s_1^2}{c + 1} \quad \text{donde } c = \text{número de condiciones a comparar (2).}$$

Para cada uno de los tratamientos se calculó el intervalo de confianza:

$$IC = (y_i - y_0) \pm t_D \cdot (2/3 \cdot s_p^2)^{1/2}$$

donde t_D = t de Dunnet con c comparaciones y 2(c-1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975. Este valor es 2.86.

TABLA No. 7. Estabilidad de la muestra a analizar.

CONDICION TIEMPO (horas)	LUZ			OSCURIDAD			REFRIGERACION		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Y1	48.40	48.90	48.58	48.40	48.85	48.60	48.40	48.52	48.60
Y2	49.16	48.18	48.55	49.16	49.27	49.19	49.16	48.90	48.70
Y3	48.15	48.81	48.23	48.15	48.35	48.20	48.15	48.45	48.80
promedio (\bar{Y}_p)	48.57	48.63	48.45	48.57	48.82	48.66	48.57	48.63	48.70
varianza (S_p^2)	0.18	0.012	0.025	0.184	0.14	0.16	0.018	0.039	0.0067
varianza ponderada (S_{pw}^2)		0.10	0.07		0.11	0.11		0.074	0.0636
$t^2(2/3^*s_{pw})^4$		0.72	0.62		0.77	0.79		0.63	0.5891
$(y_i - \bar{y}_p)$		0.06	0.12		0.25	0.09		0.05	0.13
$(y_i - \bar{y}_p) + t_0^2(2/3^*s_{pw})^4$		0.78	0.50		1.027	0.89		0.69	0.72
$(y_i - \bar{y}_p) - t_0^2(2/3^*s_{pw})^4$		0.67	0.74		0.52	0.71		0.58	0.46
CONCLUSION				ME	ME	ME	ME	ME	ME

ME = Muestra Estable

MI = Muestra Inestable

REGLA DE DECISION

Para un tratamiento dado, la muestra es estable si en el intervalo de confianza está incluido el valor de cero.

g. Tolerancia del Método.

Al evaluar la tolerancia del método se establece cuales condiciones pueden afectar el resultado de análisis. Para esto, se cambian condiciones del método que a juicio del analista pueden ser críticas. Estas condiciones pueden ser: cambios en el pH; para métodos cromatográficos, ligeros cambios en la composición de la fase móvil, probar columnas con menor eficiencia, etc.

Cada análisis se efectuó por triplicado y siempre se analiza en paralelo una muestra bajo las condiciones normales del método, también por triplicado y que servirá como control.

Para cada tratamiento se calculó el promedio (y_{pi}) y la varianza (s_i^2).

Se calculó la varianza ponderada (s_p^2) del tratamiento i y del tratamiento control de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$s_p^2 = \frac{(N_0 - 1)s_0^2 + (N_i - 1)s_i^2}{(N_0 - 1) + (N_i - 1)}$$

donde N_i = número de repeticiones del
tratamiento i

N_0 = número de repeticiones del
tratamiento control

s_0^2 = varianza del tratamiento i

s_i^2 = varianza del tratamiento control

Se calculó el valor de t de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|y_{m1} - y_{m2}|}{s_p \sqrt{(1/N_1 + 1/N_2)}}$$

En tablas de distribución t de Student se localizó el valor para la t con $(N_1 + N_2 - 2)$ grados de libertad y un nivel de significancia del 95%.

Los resultados se muestran en la tabla No. 8.

TABLA No. 8. Tolerancia del Método.

procedimiento	TRATAMIENTO CONTROL	FLUJO 0.75 ml/min	FASE MÓVIL 70.00 ml 0.10 4416
		99.71	99.81
	99.67	99.48	97.90
	99.77	99.11	97.81
	99.90	99.94	97.81
s_p	0.0014	0.0171	0.0116
t_{95}	--	0.0708	1.8216
s_{p2}	--	0.0092	0.0065
t CALCULADA		1.9396	163.0952
t TABLAS		2.78	2.78

REGLA DE DECISION

Para un tratamiento dado, el cambio al método no afecta al resultado si el valor de la t calculada es menor que la t de tablas.

En todas las condiciones probadas, la t calculada es mayor que la t de tablas por lo que concluimos que al efectuar el análisis, se deberán respetar estrictamente las condiciones marcadas en el método. No se podrán hacer los cambios de proporción de fase móvil y velocidad de flujo.

h. Especificidad del Método

Especificidad para Control de Calidad:

Para probar la especificidad para Control de Calidad, se analizó una muestra de placebo, placebo cargado y estándar.

Se verificó que los excipientes no presentaran ningún pico con un tiempo de retención similar al de Ketoconazol. Se anexan cromatogramas.

Especificidad para Estabilidad:

Para probar la especificidad del método analítico para estabilidad, se expusieron a la luz durante una semana: muestras de principio activo, placebo y placebo cargado. Después las muestras se sometieron a análisis de acuerdo al método analítico:

- Se verificó que la muestra de placebo no mostrara ningún pico en la región en la cual aparece el Ketoconazol. Se anexa el cromatograma obtenido.
- Con la ayuda del detector de arreglo de diodos, se comprobó que el pico identificado como Ketoconazol era puro.

Se obtuvo el espectro de Absorción en 6 puntos del pico correspondiente al Ketoconazol, los espectros se normalizaron y se compararon entre sí. El criterio para considerar puro al pico es que los 6 espectros de absorción normalizados sean similares, se puede aceptar ligera diferencia en los espectros obtenidos al inicio y al final del pico, ya que en estas regiones al ser las regiones del pico con menor absorbancia, al normalizar los espectros puede existir interferencia por parte de la fase móvil. Se sometieron muestras a degradación en medio ácido, básico, oxidante y luz, la única condición en la que se observó una degradación apreciable fue en medio ácido y medio básico, por lo que fueron estas muestras las que se utilizaron para realizar el análisis espectral.

CAPITULO V.
DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

La validación del método analítico para la determinación de Ketoconazol en crema, se realizó tomando en cuenta los parámetros mínimos establecidos por el Laboratorio (Linealidad y precisión del sistema, linealidad y exactitud del método así como estabilidad de la muestra y tolerancia, especificidad para control de calidad y especificidad para estabilidad.

Al evaluar 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 de respuesta obtenida por el equipo, resultando una ordenada al origen y una pendiente satisfactoria 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 se obtuvo un coeficiente de variación menor de 1.5 (0.64), en las condiciones de operación en las que fue sometido.

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 al 100% se aprecia en los resultados obtenidos que el método es exacto, por lo que puede ser empleado para la cuantificación de ketoconazol.

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

Los resultados de la estabilidad de la muestra demuestran que esta es estable a temperatura ambiente por un período de 48 horas.

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

Los resultados de tolerancia del método demostraron que no es tolerante a los cambios de proporciones de fase móvil así como tampoco para velocidad de flujo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

De acuerdo a los parámetros evaluados, el sistema resultó ser lineal y preciso. El método es exacto, repetible, reproducible y específico para control de calidad y estabilidad. Para determinar la especificidad del método para estabilidad se utilizó el arreglo de diodos. Por los resultados obtenidos concluimos que el pico del cromatograma correspondiente al principio activo es puro.

En cuanto a la estabilidad de la muestra a analizar, los resultados obtenidos nos indican que la muestra es estable bajo las condiciones y tiempos probados.

En la tolerancia del método, éste resultó ser no tolerante al realizar cambios en la concentración de fase móvil en proporción 70 metanol 30 buffer, así como para velocidad de flujo 0.75 ml /min por lo que al trabajar con el método se deberá tener cuidado en seguirlo al pic de la letra.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

1. Clark "Identificación de Drogas".

Pag. 696,697.

2. Comisión Permanente de la Farmacopea, "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos", Secretaría de Salud 5a. edición, (1988) pag 731.

3. "Comité de Elaboración de las Guías oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, S.S.A."

4. "Current Concepts for the validation of Compendial pharmacopeial" Forum, the United States pharmacopeial Convention. Inc, 1988.

5. Geert Cauwenbergh and Jan Van Cutsem. "Role of animal and human pharmacology in antifungal Drug Design".

Annals of the New York. Academy of Sciences (New York) 1988; Volumen 544 pag. 264-269.

6. Goodman y Gilman. "Las bases Farmacológicas de la Terapéutica" Editorial Medica Panamericana. 8a. edición pag 523-525.

7. González Ochoa A. "Coccidioidomycosis en México". Rev. Salud Pública (México) 26, 1966 pag 245-262.

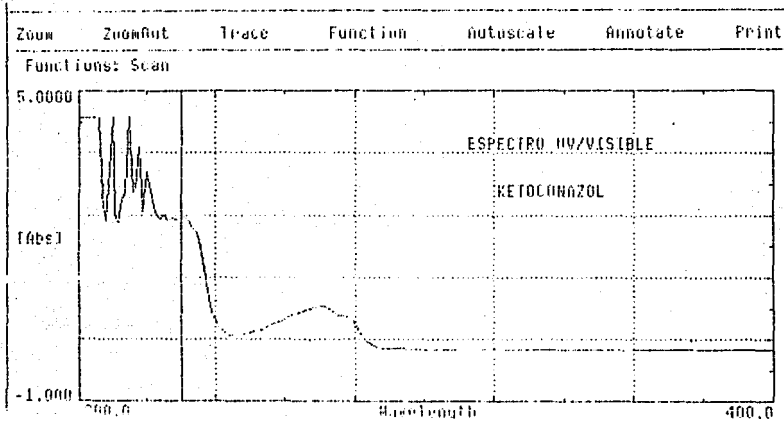
8. Guerra, J., "Validation of analytical Methods by FDA Laboratories". Pharm. Technol; March 1988, pag 74-84.

9. Harold M Menair y Benjamin Esquivel "Cromatografía de Líquidos de Alta presión". 2a. edición; EditorialSecretaría General de los Estados Americanos, Washington D.C.

10. Index Merck; Eleven Edition pag. 5183.
11. J. Brugmans, M.D., J. Van Cutsem, C. Hermans, "Determinación del tiempo óptimo de administración y la influencia de la presentación farmacéutica de Ketoconazol". Janssen Pharmaceutica Octubre 1988.
12. "Manual del curso Monográfico teórico de Micología". 1990.
13. "Manual del curso Monográfico teórico-práctico de Micología Médica". facultad Medicina UNAM.
14. Martindale "The Extra Pharmacopeia" 29a. edición, Aidley, Wade, Published by; the pharmaceutical Press (1990) pag.426-429.
15. "Métodos Analíticos Validación" Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos biólogos México A.C. México (1991).
16. M. Borgers "Mecanismo de acción de fármacos Antifúngicos" Reviews of Infections Diseases Volumen II Julio-Agosto 1984 pag.520.
17. PLM ed.35a. pag 616-617.
18. Remington "Farmacología" 17a. edición Editorial Mexicana Panamericana S.A., Buenos Aires Argentina, Vol I, pag 809-844 (1990).
19. Snyder L.R. Kirkland JJ. "Introduction to Modern Liquid Chromatography" 2a. edición Ed. Wiley & Sons, N.Y. (1990).
20. Tajeb a; Legrain V; Palmier C; Lejeans; Six M; Maleville. "Topical ketoconazole for infantile seborrheic dermatitis". Dermatologica 1990; Volumen 181 (1) pag 26 -32.
- .USP DI. "Anexos Farmacopeicos" Año 1990. pag 1689-90
Taylor, J.K. "Validation of Analytical Methods" ANALYTICAL CHEMISTRY, 55 (6) 600a-608a (1983).

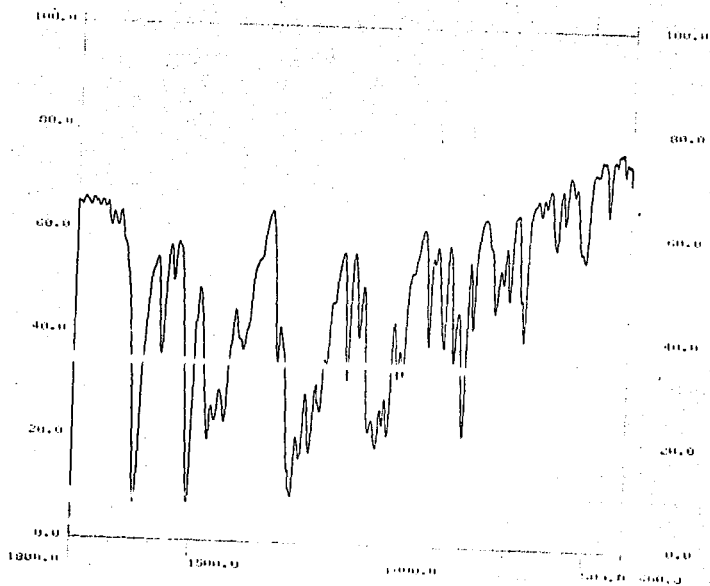
ANEXOS

ReadSamples	Tabulate	Tr+Scans	Scatter	Method	SaveClear	Print	Quit
Scan direction: W	Function: Scan	Wavelength: 230.0	Name: A:\DEFAULT				
Start W: 200.0 nm	Scan Name	Reading	Device: In:\SCANS				
End W: 400.0 nm			Integration time: 0.50 sec				
Overlay scans: 1/1	A:\SCANS123	2.54534					
A:\SCANS123							



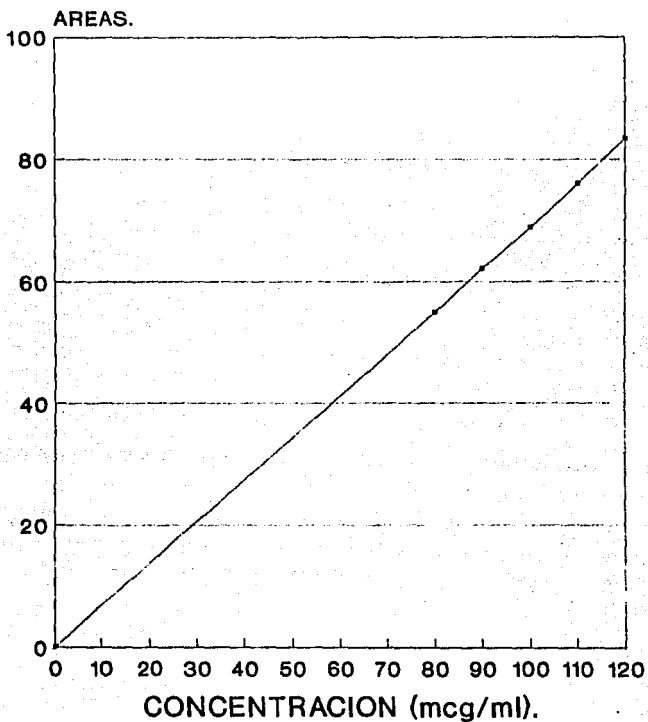
GROUP	UVIS	OFF	RediScan	STATUS	TIME	DATE	TEMP	CELL
NRICH	OFF	UV	OFF	1 RediRead	DEVILES	PreScan	07:51 03/29/95	N/A 1

ESPECTRO No. 1 UV, VISIBLE.



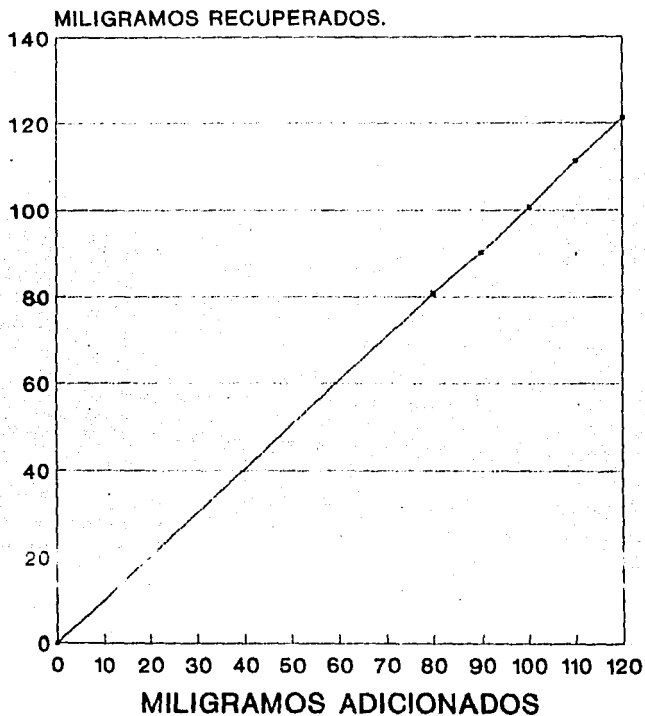
ESPECTRO No. 2 INFRARROJO.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.



GRAFICA No. 1
LINEALIDAD DEL SISTEMA.

LINEALIDAD DEL METODO.

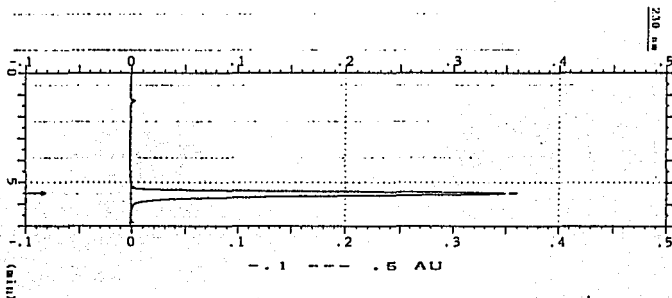


GRAFICA No. 2
LINEALIDAD DEL METODO.

```

-----
Waters 991 Integrator                                     Waters
STDF021.DT3 03-28-1995 13:08:51 Sample name FUNGOSIN(2-02-1)
Y-scale .6 AU/FS Paper speed 6 nm/min
Sampling time 21 msec *16 Column mm ID * nm
Sense normal Packing material
Resolution 3 nm Mobile phase
Time range 0 --- 7 min Flow rate ml/min
Interval .67 sec Pressure
Baseline . OFF Slope
Smoothing 15 points Height .0035 AU/min
Drift .5 AU/min Min. area .001 AU*min
Width 0 min Minus peak 159FF
Time double 1 min
-----

```



```

-----
Waters 991 Integrator                                     STDF021.DT3 Waters
03-28-1995 13:08:51 Sample name FUNGOSIN(2-02-1)
Sampling time 21 msec *16 Baseline OFF
Sense normal Resolution 3 nm
Time range 0 --- 7 min Interval
Smoothing 15 points Slope
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF
Column mm ID * nm Packing material 160
Mobile phase Flow rate ml/min
Pressure
-----

```

Report File STDF021.DT3

230 nm

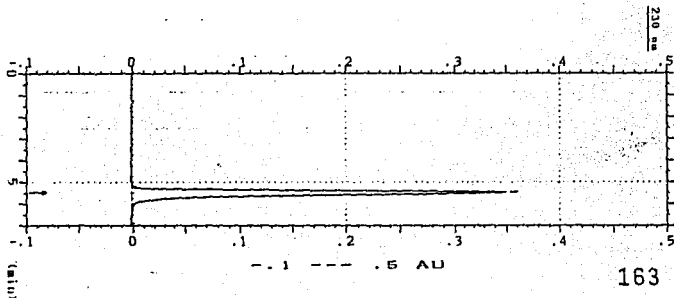
No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
1	5.50	0.3475	5.21	6.83	0.087715	100.000	1

CROMATOGRAMA No.1
ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD
ESTANDAR DE KETOCONAZOL.

```

Waters 991 Integrator
PBCAR021.DT3 03-28-1995 13:17:10 Sample name FUNGOSIN(3-02-1) Waters
Y-scale .6 AU/FS Paper speed 6 mm/min
Sampling time 21 msec *16
Sense normal Column mm ID * mm
Resolution 3 mm Packing material
Time range 0 --- 7 min Mobile phase
Interval .67 sec Flow rate ml/min
Baseline OFF Pressure
Smoothing 15 points Slope .8 AU/min
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF

```



```

Waters 991 Integrator
03-28-1995 13:17:10 PBCAR021.DT3 Waters
Sampling time 21 msec *16 Sample name FUNGOSIN(3-02-1)
Sense normal Baseline OFF
Time range 0 --- 7 min Resolution 3 mm
Interval .67 sec Mobile phase
Smoothing 15 points Slope .8 AU/min
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF
Column mm ID * mm Packing material
Mobile phase Flow rate ml/min
Pressure

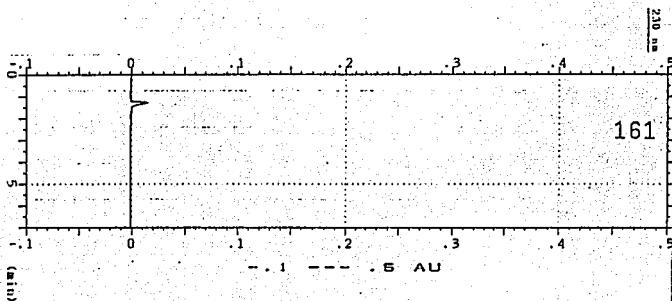
```

Report File PBCAR021.DT3

No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
1	5.48	0.3478	5.20	5.89	0.087875	100.000	1

CROMATOGRAMA No.2
ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.
PLACEBO CARGADO.

Waters 991 Integrator			Waters	
PHSOL012.DT3	03-28-1995	13:00:34	Sample name	FUNGOSIN(1-1-2)
Y-scale		.6 AU/FS	Paper speed	6 mm/min
Sampling time	21	msec *16	Column	mm ID * mm
Sense		normal	Packing material	
Resolution		3 mm	Mobile phase	
Time range	0	--- 7 min	Flow rate	ml/min
Interval		.67 sec	Pressure	
Baseline		OFF	Slope	.8 AU/min
Smoothering		15 points	Height	.0035 AU
Drift		.5 AU/min	Min. area	.001 AU*min
Width		0 min	Minus peak	OFF
Time double		1 min		



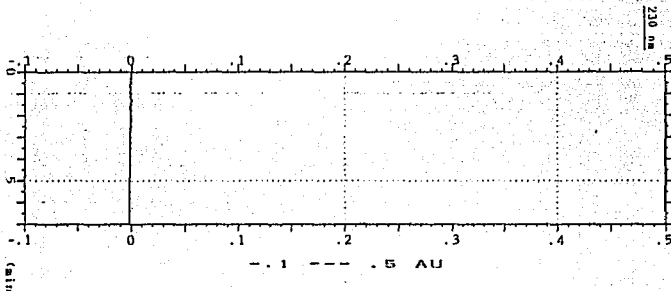
Waters 991 Integrator			PHSOL012.DT3		Waters	
03-28-1995		13:00:34	Sample name	FUNGOSIN(1-01-2)	Baseline	OFF
Sampling time	21	msec *16	Resolution	3 mm	Interval	.67 sec
Sense		normal	Slope	.8 AU/min	Height	.0035 AU
Time range	0	--- 7 min	Min. area	.001 AU*min	Minus peak	OFF
Smoothering		15 points	Packing material		Flow rate	ml/min
Drift		.5 AU/min				
Width		0 min				
Time double		1 min				
Column		mm ID * mm				
Mobile phase						
Pressure						

Report File PHSOL012.DT3

No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
No peak !!							162

**CROMATOGRAMA No.3
ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.
PLACEBO SOLO**

Waters 991 Integrator			Sample name		Waters
DACID031.DT3	03-28-1995	13:25:29	FUNGOSIN(4-03-1)		4-03-1
Y-scale		.6 AU/FS	Paper speed	6	mm/min
Sampling time	21	msec *16	Column	mm ID #	104 mm
Sense		normal	Packing material		
Resolution		3 nm	Mobile phase		
Time range	0 ---	7 min	Flow rate		ml/min
Interval		.67 sec	Pressure		
Baseline		OFF	Slope		.8 AU/min
Smoothering	15	points	Height		.0035 AU
Drift		.5 AU/min	Min. area		.001 AU*min
Width		0 min	Minus peak		OFF
Time double		1 min			



Waters 991 Integrator			Sample name		Waters
DACID031.DT3	03-28-1995	13:25:29	FUNGOSIN(4-03-1)		4-03-1
Sampling time	21	msec *16	Baseline		1.00 OFF
Sense		normal	Resolution		3 nm
Time range	0 ---	7 min	Interval		.67 sec
Smoothering	15	points	Slope		.8 AU/min
Drift		.5 AU/min	Height		.0035 AU
Width		0 min	Min. area		.001 AU*min
Time double		1 min	Minus peak		OFF
Column	mm ID #	mm	Packing material		
Mobile phase			Flow rate		ml/min
Pressure					

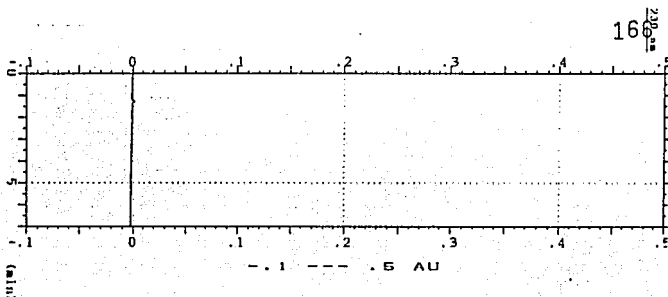
Report File DACID031.DT3

230 nm

No.	Retention time	Height [AU]	Left time	Right time	Area [AU*min]	Area [%]	Mark
No peak !!							

**CROMATOGRAMA No. 4
ESPECIFICIDAD PARA ESTABILIDAD
MUESTRA DEGRADADA POR HIDROLISIS ACIDA**

Waters 991 Integrator			Waters	
DBAS041.DT3	03-28-1995	13:42:06	Sample name	FUNGOSIN(5-04-1)
Y-scale		.6 AU/FS	Paper speed	6 mm/min
Sampling time	21 msec	*16	Column	mm ID * mm
Sense		normal	Packing material	
Resolution		3 nm	Mobile phase	ml/min
Time range	0 --- 7 min		Pressure	
Interval		.67 sec	Slope	.0035 AU/min
Baseline		OFF	Height	.001 AU*min
Smoothing	15 points		Min. area	OFF
Drift	.5 AU/min		Minus peak	
Width	0 min			
Time double	1 min			



Waters 991 Integrator			Waters	
DBAS041.DT3	03-28-1995	13:42:06	Sample name	FUNGOSIN(5-04-1)
Sampling time	21 msec	*16	Baseline	OFF
Sense		normal	Resolution	3 nm
Time range	0 --- 7 min		Interval	.67 sec
Smoothing	15 points		Slope	.0035 AU/min
Drift	.5 AU/min		Height	.001 AU*min
Width	0 min		Min. area	OFF
Time double	1 min		Minus peak	
Column	mm ID * mm		Packing material	
Mobile phase			Flow rate	ml/min
Pressure				

Report File DBAS041.DT3

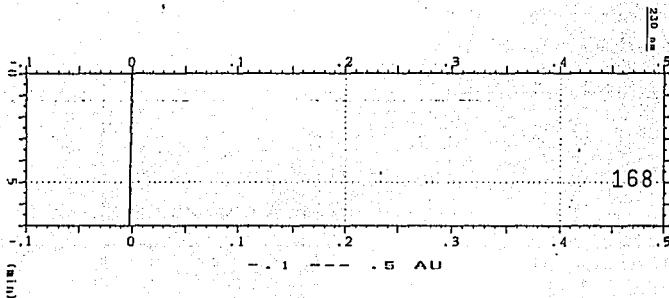
No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
No peak !!							

**CROMATOGRAMA No.5
ESPECIFICADA PARA ESTABILIDAD
MUESTRA DEGRADADA POR HIDROLISIS BASICA.**

```

-----
Waters 991 Integrator
DLUZ051.DT3 03-28-1995 13:50:25 Sample name - FUNGOSIN(6-05-1) Waters
Y-scale 1.5 AU/FS Paper speed 6 mm/min
Sampling time 21 msec #16
Sense normal Column mm ID * mm
Resolution 0 --- 7 nm Packing material
Time range 0 .67 min Mobile phase
Interval .67 sec Flow rate ml/min
Baseline OFF Pressure
Smoothing 15 points Slope
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF
-----

```



```

-----
Waters 991 Integrator
DLUZ051.DT3 Waters
03-28-1995 13:50:25 Sample name FUNGOSIN(6-05-1)
Sampling time 21 msec #16 Baseline OFF
Sense normal Resolution 3 nm
Time range 0 --- 7 min Interval .67 sec
Smoothing 15 points Slope
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF
mm ID * mm Packing material
Mobile phase Flow rate ml/min
Pressure
-----

```

Report File DLUZ051.DT3

230 nm

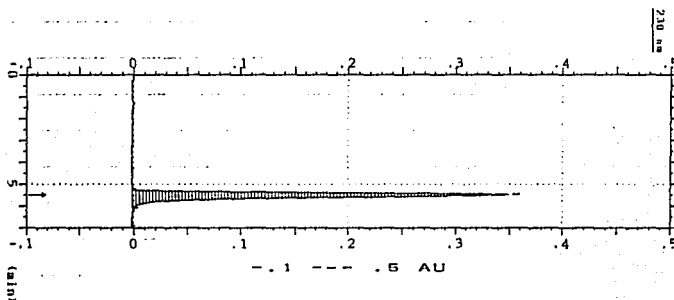
No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
No peak !!							

CROMATOGRAMA No. 6
ESPECIFICIDAD PARA ESTABILIDAD
MUESTRA DEGRADADA POR LUZ UV.


```

-----
Waters 991 Purity check
PBCAR021.DT3 03-28-1995 13:17:10 Sample name FUNGOSIN(3-02-1)
Y-scale 5 AU/FS Paper speed 6 mm/min
Sampling time 21 msec *16 Threshold 950
Sense normal Column mm ID * nm
Wavelength 220 --- 290 nm Packing material
Resolution 2 nm Mobile phase
Time range 0 --- 7 min Flow rate ml/min
Interval .67 sec Pressure
Baseline OFF
Sloping 15 points Slope
Smoothing .5 AU/min Height .0035 AU
Drift 0 AU/min Min. area .001 AU*min
Width 1 min Minus peak OFF
Time double ---
-----

```



```

-----
Waters 991 Purity check PBCAR021.DT3 Waters
03-28-1995 13:17:10 Sample name FUNGOSIN(3-02-1)
Sampling time 21 msec *16 Baseline OFF
Sense normal Threshold 950
Wavelength 220 --- 290 nm Resolution 3 nm
Time range 0 --- 7 min Interval .67 sec
Smoothing 15 points Slope .8 AU/min
Drift .5 AU/min Height .0035 AU
Width 0 AU/min Min. area .001 AU*min
Time double 1 min Minus peak OFF
Column mm ID * nm Packing material
Mobile phase Flow rate ml/min
Pressure
-----

```

Report File PBCAR021.D*3

230 nm

No.	RT	Match (%)	Area (AU*min)	Pure	Left time	Pure	Right time	Pure
1	5.48	99.47	0.087875	0.087412	5.20	5.24	6.89	6.07

CROMATOGRAMA No. 7
PRODUCTO TERMINADO.