

114
2j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DEL METODO ANALITICO DE
MICROESFERAS DE ITRACONAZOL POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION (HPLC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

NELIA VILLAMAR JIMENEZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI MAMA Y A
TODA MI FAMILIA:
QUE GRACIAS A SU APOYO
Y COMPRENSION PUDE
TERMINAR MI CARRERA .

A TODAS AQUELLAS
PERSONAS :
QUE GRACIAS A SU
AYUDA Y PACIENCIA
PUDE TERMINAR ESTA
TESIS .

A INES FUENTES :
QUE GRACIAS A SU
MOTIVACION CONSTANTE
Y AYUDA QUE ME BRINDO
TERMINE ESTA TESIS .

INDICE

	Página
Capitulo I. Introducción	1
Capitulo II. Generalidades.	
2.1 Monografía Itraconazol	3
2.2 Métodos Analíticos	3
2.3 Farmacología del Itraconazol	4
Capitulo III. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	6
3.1 Terminología	6
3.2 Clasificación	6
3.3 Parámetros Cromatográficos	8
3.4 Equipo	13
Capitulo IV. Validación	18
4.1 Evaluación del Sistema	18
4.2 Evaluación del Método	19
Capitulo V. Parte Experimental.	
5.1 Equipo, material y reactivos	25
5.2 Desarrollo del método	26
5.3 Validación del sistema	27
5.3.1 Linealidad del sistema	27
5.3.2 Precisión del sistema	27
5.4 Validación del método	27
5.4.1 Especificidad del método	27
5.4.2 Linealidad del método	28
5.4.3 Exactitud del método	29
5.4.4 Precisión del método	29
5.4.5 Estabilidad de la muestra	29
Capitulo VI. Resultados	30
Capitulo VII. Análisis de Resultados	44
Capitulo VIII. Conclusiones	46

Capítulo IX. Apéndice	47
Capítulo X. Glosario	60
Capítulo XI. Bibliografía.....	62

CAPITULO I

INTRODUCCION

Hoy en día uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica y química, es asegurar un adecuado control de la calidad de la materia prima, producto en proceso, y producto terminado. Por ello la validación retrospectiva y prospectiva ha tomado gran importancia en las áreas antes mencionadas.

La parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo. es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La etapa de la validación comprende una serie de pruebas sistemáticas por las cuales queda establecido de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera, que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para principios de medición.

La validación de los métodos analíticos, permite evaluar parámetros estadísticos como son: linealidad, exactitud, precisión evaluada como reproducibilidad y repetibilidad, entre otros, obteniéndose información sobre la confiabilidad del método analítico. Por otra parte, los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son propuestos por la Secretaría de Salud, Organismos Internacionales, etc., los cuales han publicado una serie de normas y especificaciones legales que los respaldan. Tomándolos como referencia, cada laboratorio llevará a cabo una validación del método analítico de acuerdo a sus necesidades.

El presente trabajo es un estudio sobre el desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de Itraconazol, con su respectiva validación para que pueda aplicarse en la evaluación de materia prima y microgránulos.

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFIA ITRACONAZOL

NOMBRE GENERICO :

Itraconazol

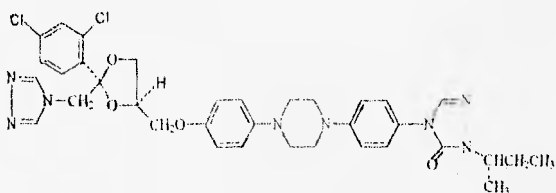
NOMBRE QUIMICO :

4-[4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il] metoxi] fenil]-1- piperazinil] fenil]-2,4-dihidro-2-(1-metilpropil)-3H-1,2,4-triazol-3-ona.

FORMULA CONDENSADA :

$C_{35}H_{22}Cl_2N_8O_4$ (1)

FORMULA DESARROLLADA :



PESO MOLECULAR :

705.64

DESCRIPCION :

Polvo blanco ligeramente amarillento.

SOLUBILIDAD :

Solvente	Solubilidad en g/100 ml de solución
Cloroformo	36.3
Diclorometano	23.9
N-N-dimetilformamida	3.33
Tetrahidrofurano	2.73
Metanol	0.071
Etanol	0.030
Agua (pH 6.7)	< 0.0001

PUNTO DE FUSION :

164-168 °C

2.2 METODOS DE ANALISIS :

El itraconazol es de los antimicóticos el de más reciente desarrollo y ha presentado grandes ventajas frente a los demás imidazoles. posee un espectro más amplio.

Dentro de las técnicas de análisis que se han reportado, se encuentra la colorimétrica, la cual se fundamenta en la formación de un complejo amarillo entre el fármaco y el verde de bromocresol a pH de 3. obteniéndose un máximo absorción en la región visible a 420 nm, en una concentración de 59 µg/ml (6) Otro método reportado (7) se refiere a la determinación de itraconazol en plasma, en pacientes con leucemia, por cromatografía de líquidos en fase-reversa, con una fase móvil de acetonitrilo: la detección de la muestra fue a 263 nm. Se obtuvo un 93.4 % de recobro. El límite de sensibilidad fue de 10 ng/ml. Otro método para la determinación de itraconazol en uñas por cromatografía de líquidos de alta resolución (8) indica utilizar acetonitrilo y dietilamina en agua como fase móvil, la detección a 261 nm; el porcentaje obtenido fue de 92 -94 %.

2.3 FARMACOLOGIA DEL ITRACONAZOL.

Actualmente existen varios derivados sustituidos de los imidazoles de uso tópico o sistémico en el tratamiento de una variedad de infecciones micóticas. Los agentes que son empleados en forma tópica incluyen el clotrimazol, econazol, miconazol y ketoconazol. Otros agentes afines son: bifonazol, itraconazol y terconazol.

Actividad antifúngica.- La evaluación in vitro ha demostrado que estos agentes son sumamente activos contra un amplio espectro de hongos, incluyendo dermatofitos, levaduras, hongos dimórficos, eumicetes, actinomicetes y algunos ficomicetes. Sin embargo la actividad de estos compuestos depende en gran medida de factores tales como el medio de cultivo, el pH y el tamaño de inóculo. Estos derivados imidazólicos también inhiben el desarrollo de bacterias grampositivas y de ciertos microorganismos anaeróbicos.

Mecanismo de acción.- El efecto de los imidazoles sobre las levaduras y otros hongos parece estar relacionado con la capacidad de estos compuestos para alterar la permeabilidad de la membrana. El ergosterol es el esteroide celular principal de los hongos; su síntesis es bloqueada por estos agentes. La inhibición de la síntesis del ergosterol se debe en parte a la capacidad de los imidazoles de inhibir la desmetilación del lanosterol, un precursor del ergosterol.

Los derivados imidazólicos también interfieren con la síntesis de ácidos grasos.

El itraconazol se administra por vía oral, parece tener menores efectos adversos que el ketoconazol y puede tener un espectro de acción algo mayor (9).

Absorción, Distribución y Excreción: El grado de absorción del itraconazol en un estado de ayuno es menor (30 %) del absorbido cuando se ingiere el fármaco con alimento. Las concentraciones sanguíneas aumentan durante los primeros 13 días de administración sucesiva. Las concentraciones plasmáticas máximas después de 15 días de tratamiento (con alimento) se aproxima a 0.5 µg/ml con una dosis diaria de 100 mg (Hardin y col. 1988). La vida media de eliminación del fármaco es cerca de 36 hrs (después de 15 días de tratamiento). Por lo general el agente activo no se detecta en la orina ni en el LCR. La administración concurrente de rifampicina produce una disminución sustancial de las concentraciones plasmáticas de itraconazol. El efecto de itraconazol sobre las concentraciones de ciclosporinas parece ser modesto o nulo(10).

El itraconazol se encuentra unido a proteínas: solo el 0.2 % se encuentra como fármaco libre. Está distribuido en el organismo pero solo pequeñas cantidades llegan al fluido cerebroespinal. Las concentraciones alcanzadas en piel, sebo, pus, y tejidos genitales femeninos son más altas con respecto a las concentraciones en plasma.

El itraconazol se metaboliza en el hígado dando lugar a un gran número de metabolitos que son excretados en la bilis o en la orina; del 3 al 18 % es excretado en heces. Pequeñas cantidades son eliminadas en el estrato córneo y cabello. El itraconazol no es separado por diálisis (11).

Forma Farmacéutica, vía de administración y dosificación.

El itraconazol se presenta en cápsulas de 100 mg y no se dispone de formulación parenteral, la dosis oral usual es de 200 mg una vez por día, pero se han administrado dosis de hasta 400 mg en micosis refractaria (9).

Efectos adversos: El itraconazol parece ser bien tolerado en una dosis de 200 mg. Alrededor de 10 a 15 % de los pacientes manifiestan náuseas o vómitos, pero los síntomas no suelen requerir la suspensión del tratamiento; en ocasiones han informado erupción, parestesis, impotencia y pérdida del libido. Hasta la fecha, la hepatitis medicamentosa sintomática no ha sido claramente ligada al itraconazol. También se ha reportado dispepsia, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza y desvanecimiento.

El itraconazol produce embriotoxicidad y efectos teratogénicos en ratas.

Usos Terapéuticos: La experiencia clínica inicial ha sido favorable para la mayoría de las indicaciones que responden al ketoconazol, incluyendo blastomicosis, hiptoplasmosis, coccidiodomicosis, paracoccidiodomicosis, muguet bucal y esofágica y tiña versicolor. A diferencia del ketoconazol, el itraconazol puede tener cierto efecto terapéutico en la esporotricosis linfocutánea y en casos seleccionados de aspergilosis (9).

Precauciones: El itraconazol ha causado anomalías en el desarrollo fetal en ratas, por lo que está contraindicado en el embarazo.

CAPITULO III

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

3.1 TERMINOLOGIA

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra (11).

3.2 CLASIFICACION

Basándose en la naturaleza de la fase móvil la cromatografía se divide en Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos, los cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal como se muestra en el diagrama No 3.2.1

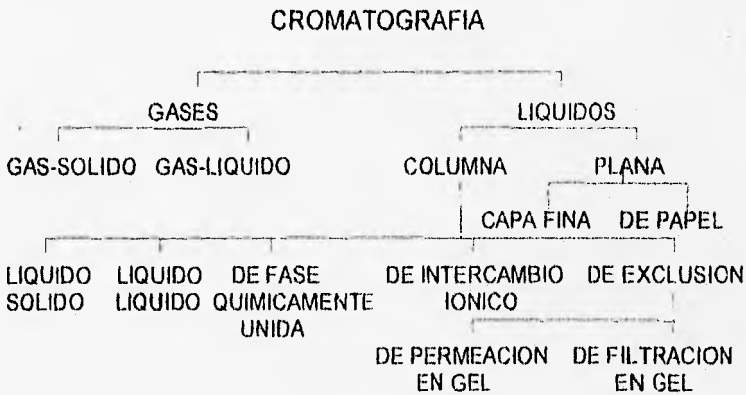


Diagrama No 3.2.1

Para clasificar la cromatografía de líquidos en columna, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, se pueden enumerar cuatro tipos :

- Cromatografía de Adsorción.- La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

-Cromatografía de Partición.- La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

-Cromatografía de Intercambio Iónico.- El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con compuestos iónicos, cuanto mayor es la carga de las muestras, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluída. La fase móvil es un amortiguador acuoso en donde el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

-Cromatografía de Exclusión.- Se rellena la columna con un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Por razones históricas, esta técnica se llama también filtración sobre geles o cromatografía sobre geles, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un "gel".

La cromatografía de líquidos también se clasifica según la polaridad relativa de las dos fases : cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa.

En la cromatografía en fase normal el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

La cromatografía en fase reversa es a la inversa. El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención.

Algunas veces se modifica la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase reversa el aditivo será una sustancia menos polar.

3.3 PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS

TIEMPO DE RETENCIÓN

El tiempo de retención (t_r), es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el momento en que se obtiene el punto de máxima concentración por la señal o pico, este valor siempre será igual en la misma columna y en las mismas condiciones de trabajo. Se calcula con la ecuación No 1 y se representa en la fig. 3.3.1.

$$t_r = t_0 + t'_r \quad (1)$$

TIEMPO MUERTO

Si un componente no es retenido y sale a la misma velocidad de la fase móvil se le llama t_0 (tiempo muerto), o sea que corresponde al tiempo en que la fase móvil se traslada de un lado a otro de la columna.

TIEMPO DE RETENCIÓN CORREGIDO

Es el tiempo que las moléculas del soluto permanecen en la fase estacionaria y se calcula con la ecuación No 2.

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (2)$$

De acuerdo a la figura 3.3.1 se observa la diferencia entre el tiempo de retención corregido y el tiempo de retención.

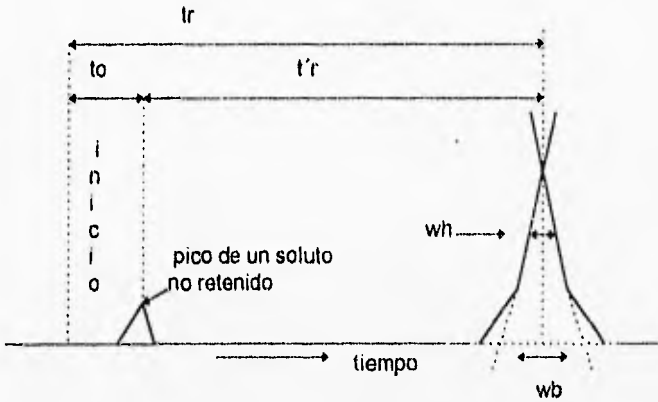


Figura No 3.3.1. Representación del tiempo de retención.

Cromatograma típico, donde :

t_r = Tiempo de retención

t_o = Tiempo muerto

$t'r$ = Tiempo de retención corregido

w_b = Ancho del pico en la base

w_h = Ancho del pico medida al 50 % de la altura total

FACTOR DE CAPACIDAD

El factor de capacidad es el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo " $t'r$ ", mientras " t_o " representa el tiempo que permanece en la fase móvil; por tanto, el cociente entre ambos dará dicho valor, llamado factor de capacidad " K ", representada por la ecuación No 3.

$$K = \frac{t'r}{t_o} = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}} \quad (3)$$

Por otra parte conociendo el factor de capacidad, se puede calcular el tiempo de retención de un compuesto. Representado por la ecuación No.4

$$t_r = t_o (1+K) \dots\dots\dots(4)$$

En la práctica hay que esforzarse por conseguir un valor del factor de capacidad por lo menos igual a uno para el primer pico de interés, con el fin de asegurar su separación del disolvente y sus posibles impurezas, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual o muy próximo a " t_o ".

NUMERO DE PLATOS TEORICOS

La eficiencia de la columna se mide por el número de platos teóricos "N", éstos miden el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna.

Utilizando el método de las tangentes, "N" se determina de acuerdo a la ecuación No 5.

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w_b} \right]^2 \dots\dots\dots(5)$$

DONDE :

- N = Número de platos teóricos
- t_r = Tiempo de retención del soluto
- w_b = Ancho del pico en la base

para determinar el valor de "W_b" se toman medidas directas en el cromatograma :

Se trazan dos tangentes por los puntos de inflexión y se mide la longitud de la línea base donde cortan las tangentes (figura 3.3.2).

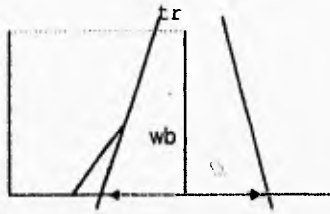


Figura No 3.3.2 Trazado de tangentes para el cálculo de número de platos teóricos "N".

ALTURA EQUIVALENTE DE UN PLATO TEORICO (AEPT)

Es la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico y se calcula con la ecuación No 6.

$$AEPT = \frac{L}{N} \dots\dots\dots (6)$$

DONDE :

AEPT = Altura equivalente a un plato teórico.

L = Longitud de la columna

N = Número de platos teóricos

FACTOR DE SELECTIVIDAD

El factor de selectividad es la relación del tiempo en que dos picos permanecen en la fase estacionaria. Debido a que en esta fase es donde se lleva a cabo la separación de acuerdo a la interacción que haya en cada uno de los compuestos, la salida de la columna será más rápida o más lenta.

Si el valor es aproximadamente = 1 los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realiza la separación, así mientras más elevados sean los valores del factor de capacidad, mayor es la selectividad de la fase estacionaria y más fácil la separación. Ecuación No 7

$$\text{Factor de selectividad} = \frac{t'_{r(B)}}{t'_{r(A)}} \dots\dots\dots (7)$$

DONDE :

$t'_{r(A)}$ y $t'_{r(B)}$ = Tiempo de retención corregido de los solutos A y B

RESOLUCION

La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos y está definida como la distancia que hay entre el centro de los picos, dividida entre el promedio del ancho de los mismos. Ecuación No 8
En la figura 3.3.3 se muestra la manera de calcular la resolución.

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{1}{2}(w_{b1} + w_{b2})} \quad \text{.....(8)}$$

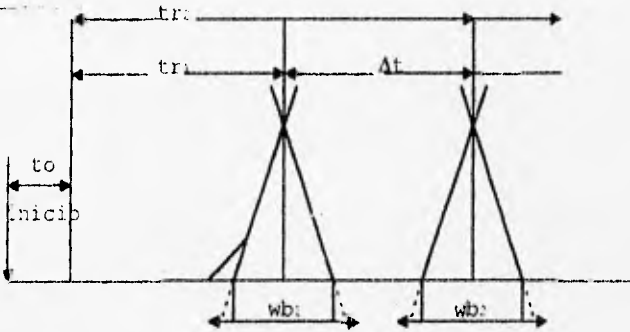


Figura No 3.3.3. Valores medidos para el cálculo de la resolución entre dos picos muy cercanos sobre un cromatograma.

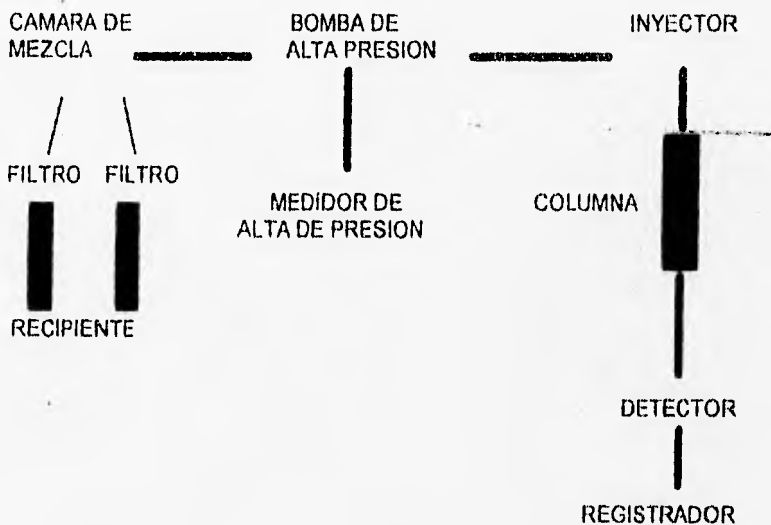
3.4 EQUIPO

Los componentes esenciales que forman parte de un cromatógrafo de líquidos son : Recipientes, bomba, inyector, columna, detector y registrador (Esquema No 1).

RECIPIENTES

Su misión será contener los disolventes que se emplean como fase móvil. Su forma puede variar desde el propio frasco en que comercialmente viene contenido el disolvente hasta un complejo sistema capaz de filtrar, degasificar, etc. el disolvente.

El recipiente debe taparse de manera conveniente. A través del tapón pasa el tubo que conduce la fase móvil a la cámara de mezcla primero y a la bomba después, este tubo succionador, de acero o de teflón, finaliza en un filtro que garantiza la limpieza física del disolvente. Esquema No 1.



Esquema No 1. Representación de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos.

BOMBA CROMATOGRÁFICA

Se entiende por bomba cromatográfica aquel dispositivo o sistema capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para que, operando al flujo o velocidad precisa, atraviese la columna cromatográfica.

El objetivo principal de cualquier bomba destinada a usarse en CLAR consiste en entregar a la columna un flujo de fase móvil constante, confiable y preciso bajo varias condiciones de presión; no importa cuantos pistones tenga la bomba, entre mejor haga la entrega de disolvente, más adecuada será.

INYECTOR

Toda separación depende en gran medida de que la muestra llegue en forma adecuada a la columna; ésto requiere un inyector que se coloca entre la bomba de alta presión y la columna. La mejor manera de introducir la muestra es en pequeña cantidad, ya que ayuda a obtener picos angostos y simétricos.

La manera más sencilla de introducir la muestra, es utilizando una jeringa, donde por medio de un abrir y cerrar de válvulas manualmente, se desvía el flujo de la fase móvil mientras se aplica la muestra en la cámara de carga y luego se reanuda a través de él completándose la inyección.

INYECTOR AUTOMÁTICO

Inyecta por sí solo las muestras disminuyendo el error en la medición del volumen a inyectar y aumentando la precisión de las inyecciones.

COLUMNA

En todo sistema cromatográfico, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva 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.

La longitud de la columna varía entre 5 y 50 cm y están rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5-15 μm). El diámetro interno de las columnas está generalmente comprendido entre 2 y 5 mm. Con respecto a la forma o la geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas.

Los materiales usados para empacar las columnas son de dos tipos, superficialmente poroso o pelicular y totalmente poroso.

El adsorbente pelicular consta de partículas esféricas generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. El espesor de esta capa es 1/40 del diámetro total de la partícula. Las moléculas de soluto pueden penetrar a la capa superficial pero no al soporte sólido.

El adsorbente totalmente poroso tiene un tamaño de partícula de 3 a 20 μm y su distribución de tamaño de partícula está perfectamente controlada. Tiene una amplia superficie para interaccionar con los solutos y tiene un tamaño promedio de poro de aproximadamente 8 Å permitiendo que la mayoría de las sustancias se difundan dentro de los poros. La sílica gel es el material que se usa con mayor frecuencia.

Aunque no forman parte de la columna como tal, las conexiones entre columnas, así como entre columna y detector, o el inyector, deben ser herméticas y de tamaño pequeño. En los extremos de la columna se coloca un disco de metal o teflón poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o se pierda y se produzcan caídas de presión muy grandes.

DETECTOR

Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vió obstaculizado por falta de detectores adecuados. El detector ideal sería aquel que cumpliera con los siguientes requisitos: Altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal.

Al considerar un detector en términos de aplicación a un determinado problema, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como:

-Respuesta.- Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o solo con un tipo específico.

-Sensibilidad.- La sensibilidad de un detector se define como la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

-Ruido.- Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.

-Linealidad.- Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad.

-El intervalo lineal de un detector se puede definir como la relación entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

-Estabilidad.- Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo, a la vez de ser compatible con programaciones de fase móvil.

Actualmente en CLAR se utilizan principalmente los detectores ópticos. En estos detectores se hace pasar la corriente líquida a través de una microbureta de pequeño volumen (aproximadamente 10 μ l), la cual es atravesada por un rayo de luz y se detectan variaciones en la intensidad de la luz, causadas por absorción ultravioleta, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice de refracción, (según el tipo de detector utilizado), que resulta de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la celda.

El detector más usado en CLAR es el de absorción ultravioleta. Un detector de este tipo, de longitud de onda variable, capaz de controlar desde 190 a 800 nm, resulta adecuado para la detección de casi todas las muestras.

REGISTRADOR

Su función es representar en un registro gráfico la señal proporcionada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 milivoltios.

FASE MOVIL

Aunque la fase móvil no es parte del instrumento propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser utilizada en cromatografía líquida son las siguientes:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el detector utilizado.
- Tener alta pureza.

Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se gasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. La fase móvil se degasifica usando vacío o un baño ultrasónico.

FASE ESTACIONARIA

Al igual que en cualquier proceso cromatográfico, la separación en cromatografía líquida se lleva a cabo mediante interacciones entre la muestra y la fase estacionaria. Por consiguiente, la apropiada selección de esta última, representa una decisión clave en cromatografía de líquidos.

El tamaño de partícula es muy importante, para que la fase móvil y la muestra disueltas difundan con facilidad. En la práctica con el fin de aproximarse a la condición ideal, las partículas de relleno deben de ser tan pequeñas como sea posible, para que la muestra esté en contacto con la mayor superficie posible de la fase estacionaria.

Existe, sin embargo, un límite inferior de tipo práctico.

Aproximadamente por debajo de unos 3 μm de diámetro, las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta que el líquido no puede bombearse con facilidad a lo largo de la columna. La mayoría de las columnas comercialmente asequibles hoy en día contienen rellenos con partículas cuyo tamaño promedio es de 5-15 μm , en tanto que en muchos rellenos pelliculares presentan tamaños de 37-42 micras.

Estándar Interno.-La sustancia utilizada como estándar interno debe ser similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra, debe presentar un área similar al analito, resolverse completamente ($R \geq 1.5$).

El método de estándar interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas y, en algunos casos pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como son: diluciones, extracción y derivatización.

CAPITULO IV

VALIDACION

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

La validación de un método analítico depende básicamente de la determinación de su : Especificidad, Exactitud, Precisión, Linealidad, Estabilidad de la muestra y Tolerancia del método a utilizar, así como Precisión y Linealidad del sistema.

Se consideran dos partes en la validación :

1) SISTEMA

- Precisión
- Linealidad

2) METODO

- Especificidad
- Exactitud
- Linealidad
- Precisión
- Estabilidad de la muestra
- Tolerancia
- Concentración mínima detectable
- Concentración mínima cuantificable

4.1 EVALUACION DEL SISTEMA

PRECISION DEL SISTEMA

Es el grado de concordancia de medidas individuales de un proceso y se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIO METODO CROMATOGRAFICO :

$$CV \leq 1.5 \%$$

LINEALIDAD DEL SISTEMA :

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, sean proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependen del propósito del método: para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como el 100 %.

CRITERIOS METODO CROMATOGRAFICO :

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

4.2 EVALUACION DEL METODO

-ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

-ESPECIFICIDAD PARA METODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Con el método propuesto :

a) Analizar placebos del producto.

b) Identificar las respuestas del (los) activos (s), y/o de otras sustancias presentes (productos de degradación).

CRITERIO

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés, analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que, la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25 % con respecto a la original.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; la persona que realice el estudio deberá escoger aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado.

a) Colocar la sustancia de interés al placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70-120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante número determinado de días (dos a cuatro semanas).

b) Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o a humedad.

c) Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o a 10-12 y colocarlos a 60°C - 80°C durante dos a cuatro semanas.

d) Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semilíquidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de dos a cuatro semanas a temperatura ambiente ; y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60°C-80°C durante dos a cuatro semanas.

CRITERIO:

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina de cuando menos seis placebo cargados, de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO :

El porcentaje recuperado y el Coeficiente de variación (CV) deberán estar de acuerdo con la tabla No 4.1

Tabla No 4.1 Porcentaje recuperado (%) y coeficiente de variación (CV) de los diferentes métodos analíticos para evaluar la exactitud.

METODOS		
Cromatográficos	98 - 102 %	2 %
Titulométricos	98 - 102 %	2 %
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103 %	3 %
Microbiológicos	95 - 105 %	5 %

Para suspensiones y semisólidos en los métodos cromatográficos y titulométricos se acepta una ampliación del 1 % en el intervalo expresado en el promedio de recobro y el $CV \leq 3 \%$.

LINEALIDAD DEL METODO :

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de las linealidades del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 %.

La amplitud del estudio depende del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudios de estabilidad, etc.) y debe llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIO METODO CROMATOGRAFICO:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 \geq 0.98$

Donde :

m = Pendiente

b = Ordenada al origen

r^2 = Coeficiente de determinación

Porcentos recuperados y los coeficientes de variación (CV) a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla No 4.1.

PRECISION DEL METODO

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

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

a) REPETIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b) REPRODUCIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, utilizando el mismo y/o diferentes equipos etc.).

Se determina en una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

CRITERIO:

El coeficiente de variación (CV) total debe cumplir con los criterios de la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Coeficiente de variación para la precisión de los métodos analíticos.

METODOS	CV
Cromatográficos	≤ 2%
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 2%
Microbiológicos	≤ 5%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de mantener su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de permanecer durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las muestras analizadas se almacenan bajo distintas condiciones (por ejemplo : temperatura ambiente, refrigeración, protegidos de luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Realizando los análisis bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

CRITERIO :

La muestra es estable si el Intervalo de Confianza para la diferencia de la media de los resultados de las muestras con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes con respecto al 100 %, según la Tabla No 4.3.

Tabla No 4.3. Criterios para el intervalo de confianza con respecto al 100 %

METODOS	CV
Cromatográficos	± 2%
Tritulométricos	± 2%
Químicos y Espectrofotométricos	± 3%
Microbiológicos	± 5%

TOLERANCIA DEL SISTEMA

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

CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

5.1 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

EQUIPO

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución equipado con:
Bomba Beckman modelo Programmable solvent module 166
Inyector manual Rheodyne 7725i
Detector Programmable Module 166
Registrador Epson FX870
- Columna ODS ultrasphere, 5 μm 4.6 mm x 25 cm.
- Agitador mecánico Multimagnestir Lab-line
- Balanza Analítica Sartorius

MATERIAL

- Microjeringa
- Equipo de filtración Millipore
- Membranas de filtración Millipore Tipo Hulp 0.45 μ
- Pipetas Volumétricas 1, 2, 3, 4, y 5 ml.
- Matraces Volumétricos 25, 50 y 100 ml.
- Matraces Erlenmeyer 50 ml.
- Embudos de filtración
- Papel filtro Whatman No 42

REACTIVOS

- Agua HPLC.
- Acetonitrilo HPLC.
- Acetato de Amonio R.A.
- Itraconazol Patrón de Referencia Secundario
- Microgránulos de itraconazol
- Metanol HPLC.
- Ketoconazol Patrón de Referencia Secundario

FORMULA:

Cada cápsula contiene 100 mg de itraconazol.

5.2 DESARROLLO DEL METODO

Se desarrolló el método para valorar itraconazol en materia prima y en producto terminado con las condiciones siguientes:

Fase Móvil:

Acetato de Amonio 0.05 %	(20 %)
Acetonitrilo	(60 %)
Metanol	(20 %)

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Detector :	UV
Longitud de onda :	270 nm
Volumen de inyección :	20 µl
Flujo:	1.5 ml/min.
Columna:	ODS ultrasphere 5µ 4.6 mm x 25 cm.

Concentración del estándar interno de referencia 1 mg/ml
Concentración del Patron de referencia 1 mg/ml.
Concentración de la muestra : 80 µg/ml (correspondiente al 100 %).

SELECCION DEL ESTANDAR INTERNO.

Se buscó el posible estándar interno inyectando muestras de ketoconazol, se observó el tiempo de retención, la forma del pico cromatográfico y la separación entre el itraconazol y el ketoconazol, encontrándose adecuada para la prueba.

PREPARACION DE LA SOLUCION DEL ESTANDAR INTERNO

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de ketoconazol sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con una mezcla de metanol-cloroformo 1:1. Esta solución contiene aproximadamente 1mg/ml.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de itraconazol sustancia de referencia y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con una mezcla de metanol-cloroformo 1:1. Esta solución contiene aproximadamente 1 mg/ml.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA

De los microgránulos de itraconazol pesar el equivalente a 50 mg de itraconazol, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 5 ml de agua purificada y colocar en el ultrasonido por 20 minutos a una temperatura de 37° C. Enfriar y llevar al aforo con la misma mezcla de metanol - cloroformo 1:1. Filtrar la solución a través de papel filtro Whatman No 42, descartando los primeros 10 ml del filtrado. De la solución filtrada tomar diferentes alcuotas para obtener concentraciones del 25, 50, 75, 100 y 125 % diluyendo con fase móvil.

5.3 VALIDACION DEL SISTEMA

5.3.1- LINEALIDAD DEL SISTEMA

De la solución patrón de itraconazol se realizan diluciones para obtener concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml, que equivalen al 25, 50, 75, 100 y 125 % respectivamente.

Se analizó cada solución por triplicado, en dos diferentes días, a cada una de las soluciones se adicionó estándar interno de ketoconazol, para obtener las condiciones antes mencionadas; la concentración final a la que se llegó del estándar interno fue de 80 µg/ml.

5.3.2 - PRECISION DEL SISTEMA

- EVALUADA COMO REPETIBILIDAD

Se analizó por sextuplicado una solución de itraconazol conteniendo 100 % de la cantidad seleccionada según la prueba de linealidad del sistema. Se adicionó estándar interno de ketoconazol a una concentración de 80 µg/ml de acuerdo al procedimiento mencionado en linealidad del sistema.

5.4 VALIDACION DEL METODO

5.4.1 - ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Se analizó el placebo inyectándolo al cromatografo, para comprobar que ninguno de los excipientes interfiera con el pico del compuesto de interés.

Se analizaron utilizando el método propuesto :

(Con adición de estándar interno de ketoconazol 80 µg/ml).

- a) Placebo cargado al 100 %
- b) Sustancia de referencia de itraconazol
- c) Placebo sin fármaco de interés

El placebo utilizado fue :

COMPOSICIÓN	CANTIDAD POR CAPSULA.
Microesferas de azúcar	192 mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	150 mg
Polietilenglicol 6 000	18 mg
Cloruro de Metileno	925 µ l
Alcohol	666 µ l

5.4.2 LINEALIDAD DEL METODO

Se evaluó analizando por triplicado placebos cargados a los niveles de 0, 20, 80, 100 y 120 % de la cantidad seleccionada. Se adicionó estándar interno de ketoconazol en una concentración de 80 µg/ml.

Se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación.

5.4.3 EXACTITUD DEL METODO

Se llevó a cabo analizando por sextuplicado muestras cargadas al 100 %, con la adición del ketoconazol como estándar interno en una concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ y determinando el porcentaje recuperado, así como el coeficiente de variación .

5.4.4 PRECISION DEL METODO

-EVALUADA COMO REPETIBILIDAD

Se determinó analizando, mismo día, mismo analista, por sextuplicado placebos cargados con itraconazol a una concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ (100%), con adición de estándar interno de ketoconazol (80 $\mu\text{g/ml}$).Se calculó el coeficiente de variación (CV).

-EVALUADA COMO REPRODUCIBILIDAD

Se determinó con el estudio de análisis independientes de una misma muestra homogénea de placebos cargados con itraconazol, (100 %), con adición de estándar interno de ketoconazol (80 $\mu\text{g/ml}$), en dos días por dos analistas con 3 réplicas por día y el mismo equipo.

5.4.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCION.

Se evaluó este parámetro analizando el placebo cargado con 60 $\mu\text{g/ml}$ de itraconazol, adicionando estándar interno de ketoconazol (80 $\mu\text{g/ml}$). La solución correspondiente se mantuvo a temperatura ambiente y refrigeración en los tiempos de 24 hrs y 8 días.

CAPITULO VI

R E S U L T A D O S

ESPECIFICIDAD Y TIEMPO DE RETENCION DEL ESTANDAR INTERNO Y DEL PRINCIPIO ACTIVO.

En la figura No 6.1 se muestra el cromatograma del estándar interno (ketoconazol) el cual se ajusta a nuestras condiciones, como son buena resolución, además de que el tiempo de retención es corto.

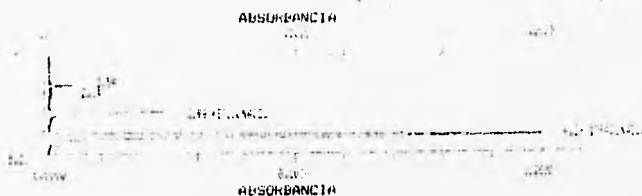


Figura No 6.1. Cromatograma estándar interno ketoconazol y principio activo itraconazol.

VALIDACION DEL SISTEMA

LINEALIDAD DEL SISTEMA

En las tablas No 6.1, 6.2, 6.1.1 y 6.2.1 se muestran los resultados de linealidad del sistema y su análisis estadístico en los intervalos de 20 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en base a las áreas relativas, de los días 1 y 2, considerando el estándar interno de ketoconazol. Además se obtuvieron las gráficas No 6.1 y 6.2 en donde se muestra la linealidad del sistema de los días 1 y 2.

Tabla No 6 . 1. Resultados de linealidad del sistema día 1.

NIVEL %	CONCENT. µg/ml	AREA RELAT. ITRACONAZOL	AREA RELAT. PROM.	CV %
0	0	0		
0	0	0		
0	0	0	0	0
25	20	1.648947		
25	20	1.648672		
25	20	1.625948	1.641189	0.80
50	40	3.266893		
50	40	3.245316		
50	40	3.259577	3.257262	0.34
75	60	4.888163		
75	60	4.882578		
75	60	4.816371	4.862371	0.82
100	80	6.457338		
100	80	6.441266		
100	80	6.469303	6.455969	0.22
125	100	8.140747		
125	100	8.016037		
125	100	8.110157	8.08898	0.80

Tabla No. 6.2. Resultados de la linealidad del sistema día 2.

NIVEL %	CONCENT. µg/ml	AREA RELAT. ITRACONAZOL	AREA RELAT. PROM.	CV %
0	0	0		
0	0	0		
0	0	0	0	0
25	20	1.559432		
25	20	1.545496		
25	20	1.540791	1.548573	0.62
50	40	3.074375		
50	40	3.058771		
50	40	3.001562	3.044903	1.26
75	60	4.489124		
75	60	4.573126		
75	60	4.476020	4.512757	1.17
100	80	6.046707		
100	80	6.121137		
100	80	6.073478	6.080441	0.62
125	100	7.679793		
125	100	7.677416		
125	100	7.659271	7.672160	0.17

Tabla No 6.1.1 Análisis estadístico de la linealidad del sistema día 1.

	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACION
COEFICIENTE DE DETERMINACION		
	r^2 0.99	≥ 0.98
COEFICIENTE DE CORRELACION		
	r 0.99	≥ 0.99

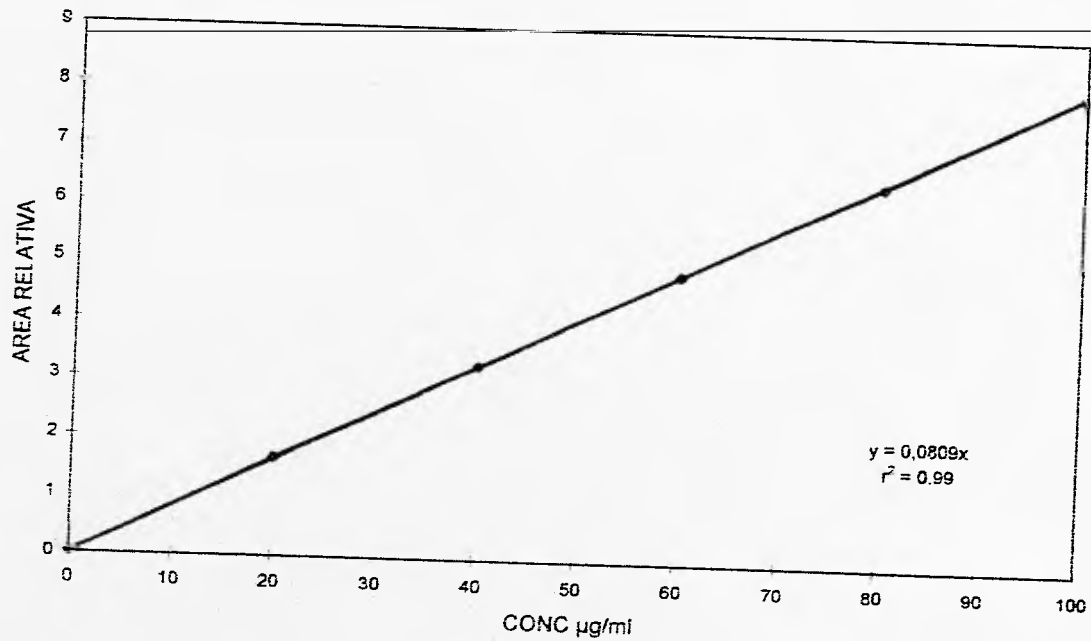
Tabla No 6.2.2 Análisis estadístico de la linealidad del sistema día 2.

	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACION
COEFICIENTE DE DETERMINACION		
	r^2 0.99	≥ 0.98
COEFICIENTE DE CORRELACION		
	r 0.99	≥ 0.99

PRECISION DEL SISTEMA

En las tablas No 6.3.1 y 6.3.2 se muestran los resultados para la precisión del sistema y el análisis estadístico considerando las áreas relativas en un nivel de concentración del 100%.

LINEALIDAD DEL SISTEMA DIA 1 Gráfica No. 6.1



LINEALIDAD DEL SISTEMA DIA 2 Gráfica No. 6.2

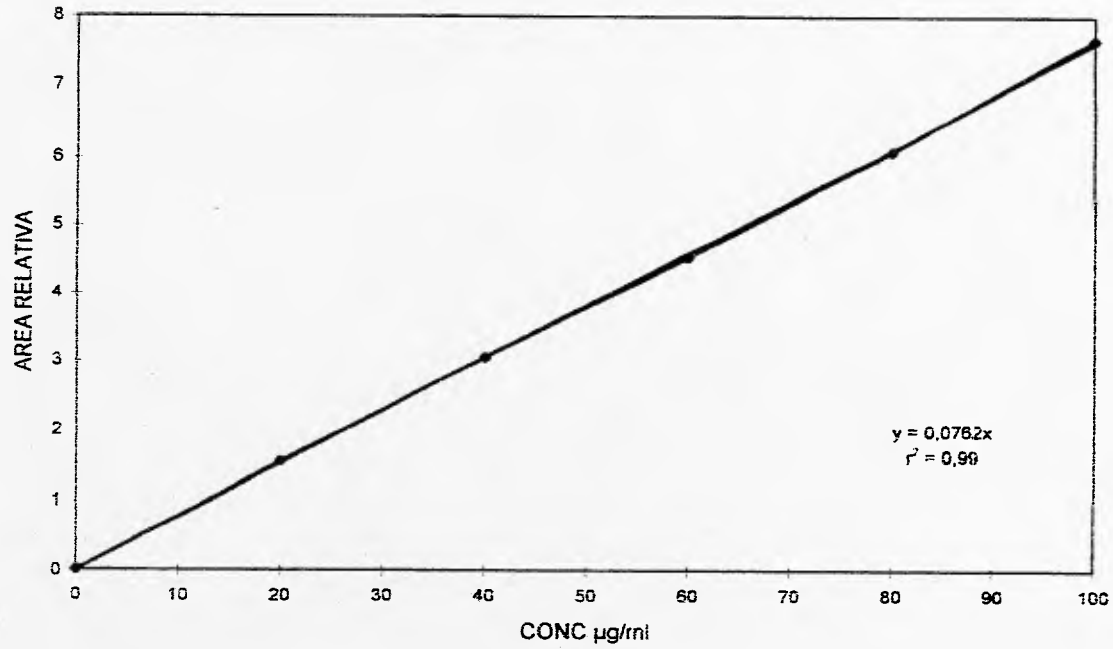


Tabla No 6.3.1 . Resultados de la precisión del sistema.
(evaluada como repetibilidad)

CONC. (µg/ml) ITRACONAZOL	AREAS RELATIVAS ITRACONAZOL
80	6.457338
80	6.441266
80	6.469303
80	6.455393
80	6.478098
80	6.424746

Tabla No 6.3.1. Análisis estadístico de la precisión del sistema (evaluada como repetibilidad).

	RESULTADO AREAS/REL	CRITERIO DE ACEPTACION
MEDIA	6.454357	-----
DESVIACION ESTANDAR (DE)	0.017536	-----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.3 %	≤ 1.5 %

VALIDACION DEL METODO

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

En la figura No 6.2 se muestra el cromatograma del placebo en el que se comprueba que no hay ninguna respuesta, que interfiera con el pico de interés, arriba de cero de absorbancia.



Figura 6.2. Cromatograma del placebo.

LINEALIDAD DEL METODO

Los datos de linealidad del método, obtenidos con muestras cargadas a los niveles de 0 - 120 %, en los días 1 y 2 se muestran en las tablas No 6.4, 6.5, con sus correspondientes análisis estadísticos, 6.4.1 y 6.5.1.. Además se presentan las gráficas No 6.3 y 6.4 que muestran la linealidad correspondiente de los días 1 y 2.

Tabla No 6.4 Resultados de linealidad del método día 1.

NIVEL %	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS
0	0	0
0	0	0
0	0	0
80	64	67.03
80	64	66.61
80	64	63.88
100	80	79.99
100	80	79.81
100	80	79.73
120	96	95.68
120	96	95.62
120	96	92.94

NIVEL %	PROMEDIO mg ADIC	PROMEDIO mg REC.
0	0	0
80	64	65.84
100	80	79.84
120	96	94.74

Tabla No 6.5 .Resultados de linealidad del método día 2.

NIVEL %	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS
0	0	0
0	0	0
0	0	0
80	64	67.77
80	64	66.82
80	64	66.40
100	80	84.93
100	80	84.73
100	80	84.65
120	96	101.59
120	96	101.53
120	96	98.68

NIVEL %	PROMEDIO mg. ADIC.	PROMEDIO mg. REC.
0	0	0
80	64	66.99
100	80	84.77
120	96	100.60

Tabla No 6.4.1. Análisis estadístico de la linealidad del método día 1.

	RESULTADO	CRITERIO ACEPTACION
COEFICIENTE DE DETERMINACION r^2	0.99	≥ 0.98

Tabla No 6.5.1. Análisis estadístico de la linealidad del método día 2.

	RESULTADO	CRITERIO ACEPTACION
COEFICIENTE DE DETERMINACION r^2	0.99	≥ 0.98

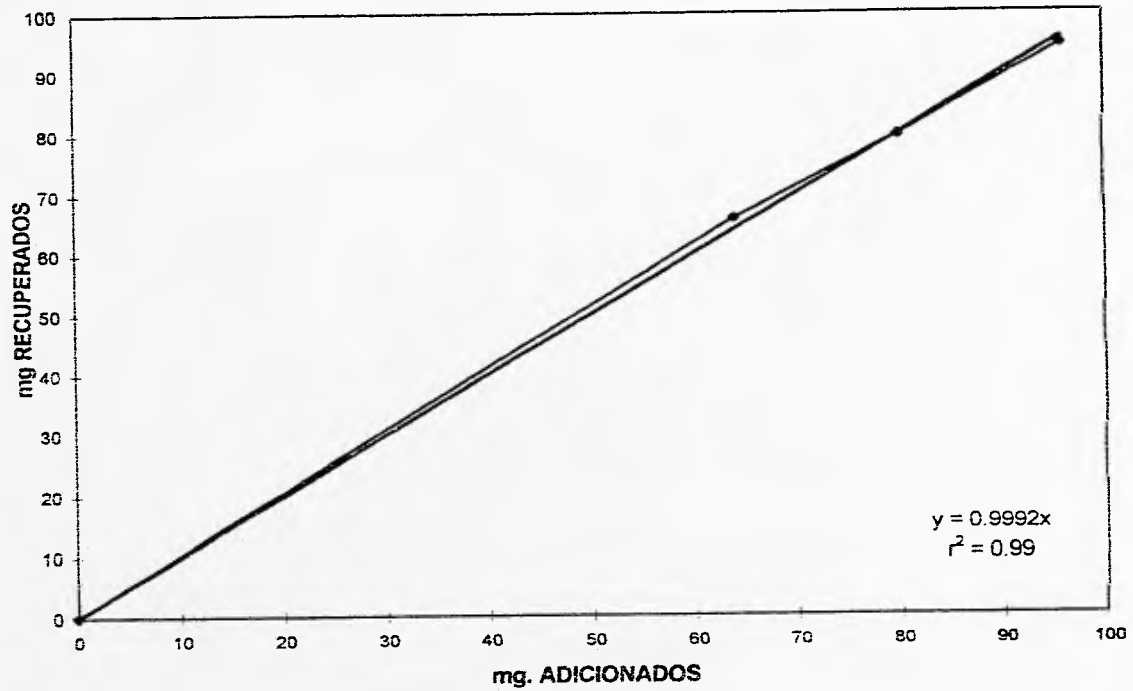
EXACTITUD AL 100 % Y REPETIBILIDAD DEL METODO

En las tablas No 6.6 y 6.6.1 se muestran los resultados de la exactitud del método obtenidos con muestras adicionadas al 100% y su correspondientes análisis estadísticos. Los datos se utilizan para evaluar la repetibilidad del método.

Tabla No 6.6 . Resultados de la exactitud del método.

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO RECUPERADO
80	80.621875	101.03
80	80.801689	101.00
80	79.892032	99.87
80	79.988538	99.99
80	79.807087	99.76
80	79.723505	99.65

LINEALIDAD DEL METODO DIA 1 Gráfica No 6.3



LINEALIDAD DEL METODO DIA 2 Gráfica No 6.4

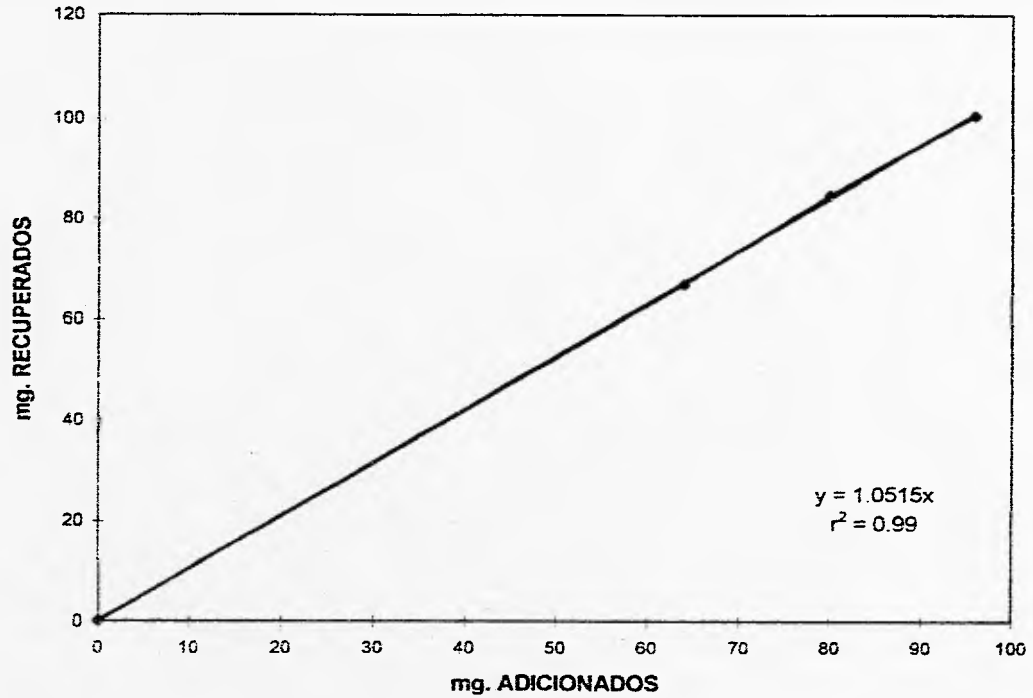


Tabla No 6.6.1. Análisis estadístico de la exactitud del método.

	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACION
PROMEDIO DEL PORCIENTO RECUPERADO (X)	100.22	98 - 102%
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.63	≤ 2.0 %
LIMITE SUPERIOR DE CONFIANZA (LSC)	100.87	-----
LIMITE INFERIOR DE CONFIANZA (LIC)	99.55	-----
INTERVALO DE CONFIANZA (IC) AL 95%		

PRECISION DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD

En las tablas No 6.8.1 y 6.8.2 se muestran los resultados de la reproducibilidad y su correspondiente análisis estadístico para los diferentes analistas, en diferentes días

Tabla No 6.8.1. Resultados de reproducibilidad.

	ANALISTA	
	1 %	2 %
	DE RECOBRO	DE RECOBRO
D	101.05	99.99
1	101.03	99.76
	101.00	99.65
D	101.22	99.68
2	101.1	99.87
	100.99	100.34

Tabla No 6.8.2. Análisis estadístico de reproducibilidad día 1 y día 2.

	DIA 1 RESULTADOS	CRITERIO DE ACEPTACION
MEDIA % (X)	100.47 %	-----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.64 %	≤ 2 %
VARIANZA	0.46	-----

DIA 2

MEDIA % (X)	100.53 %	-----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.66 %	≤ 2.0 %
VARIANZA	0.44	-----
F = 0.09 CALC.		
P = 0.76		

ANALISTA 1

MEDIA (\bar{X})	101.06 %	-----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.08 %	≤ 2%
VARIANZA	0.007	-----

ANALISTA 2

MEDIA (\bar{X})	99.88 %	-----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.25 %	≤ 2 %
VARIANZA	0.06	-----
F = 114.27		
P = 8.6		

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCION

En la tabla No 6.10, se muestran los resultados de la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente y refrigeración, en 24 horas y 8 días. La concentración utilizada fue 60 µg/ml.

Tabla No 6.10. Resultados de la estabilidad de la muestra a 24 hrs y 8 días, temperatura ambiente y refrigeración.

TIEMPO	TEMPERATURA	AREA KETOCONAZOL	AREA. ITRACONAZO
INICIAL	AMBIENTE	6.25619	32.63578
24 HRS	AMBIENTE	6.39386	32.60680
8 DIAS	AMBIENTE	6.27950	33.27332
8 DIAS	REFRIGERACION	6.03787	32.10604

CAPITULO VII

ANALISIS DE RESULTADOS

ESPECIFICIDAD Y TIEMPO DE RETENCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO Y DEL PRINCIPIO ACTIVO.

La resolución y el tiempo de retención del ketoconazol fue adecuado y no interfirió con el del Itraconazol.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

De la linealidad del sistema día 1 y 2 se obtuvieron los siguientes resultados

	Día 1	Día 2
Coefficiente de correlación, r	0.99	0.99
Coefficiente de determinación, r ²	0.99	0.99

Considerando los criterios de aceptación $r^2 > 0.99$ y $r > 0.98$, los resultados cumplen con los criterios para la linealidad del sistema.

PRECISION DEL SISTEMA

El CV obtenido fue 0.3 %. considerando que el criterio de aceptación es : CV es menor del 2 %, se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

No se obtuvo alguna respuesta al introducir el placebo en el análisis, con lo que concluimos que el método propuesto es específico.

LINEALIDAD DEL METODO

Los resultados obtenidos en los días 1 y 2 fueron :

	Día 1	Día 2
Coefficiente de determinación r^2	0.99	0.99
Coefficiente de correlación r	0.99	0.99

Considerando que el criterio de aceptación es $r^2 \geq 0.99$, los resultados cumplen para linealidad del método.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Según los resultados obtenidos fueron :

CV 0.63 %

Límite superior de confianza (LSC) 100.87

Límite inferior de confianza (LIC) 99.55

Ya que el coeficiente de variación (CV) es menor del 2.0 % y el intervalo de confianza (IC) pasa por el 100 % se cumple con los criterios para la exactitud y repetibilidad del método

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

Debido a que F calculada es menor que F teórica con respecto al día 1 y día 2, por el analista 1 y 2. no hay diferencia significativa, debido a esto, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista. Con respecto a los diferentes analistas el CV es 0.16 % este es menor del 2 % por lo tanto el método analítico es reproducible.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la validación del método analítico de itraconazol por cromatografía de líquidos de alta resolución para microesferas debido a que este método no está incluido en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 6a Ed. ni en la USP 23.

El método propuesto según los datos obtenidos de la validación del método, es lineal en el intervalo de concentración de 20 a 100 $\mu\text{g/ml}$, exacto y reproducible. Además, presenta la cualidad de que la realización del procedimiento requiere poco tiempo, ya que el tiempo de retención del itraconazol es de aproximadamente 4.3 minutos.

Las muestras listas para el análisis son estables, hasta 8 días a temperatura ambiente y en refrigeración.

El método analítico propuesto es confiable y puede emplearse como indicador en control de calidad para microesferas, por lo antes dicho, se cumplió con el objetivo de este trabajo.

CAPITULO IX

APENDICE

LINEALIDAD DEL SISTEMA

PRECISION DEL SISTEMA

CALCULOS :

a) Tabular los resultados.

$y_1, y_2, y_3, \dots, y_N$

b) Cálculos preliminares.

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_N$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_N^2$$

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

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

Donde :

DE = Desviación estándar

N = Número de muestras

a) Cálculos finales.

Coefficientes de variación :

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

CV = Coeficiente de variación

LINEALIDAD DEL SISTEMA

CÁLCULOS:

a) tabular los resultados en base al siguiente formato :

Concentración de la
dilución de la
solución patrón (x).

Propiedad medida (y)

x ₁	y ₁₁ , y ₁₂ ... , y _{1n}
x ₂	y ₂₁ , y ₂₂ ... , y _{2n}
x ₃	y ₃₁ , y ₃₂ ... , y _{3n}
⋮	⋮
⋮	⋮
⋮	⋮
x _t	y _{t1} , y _{t2} ... , y _{tn}

t= número de diluciones.

n= número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

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

b) Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación.

$$\Sigma X = n (x_1 + x_2 + \dots + x_i)$$

$$\Sigma Y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{i1} + \dots + y_{i2} + \dots + y_{in}$$

$$\Sigma X^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_i^2)$$

$$\Sigma Y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{i1}^2 + y_{i2}^2 + \dots + y_{in}^2$$

$$\Sigma XY = x_1 (y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_i (y_{i1} + y_{i2} + \dots + y_{in})$$

c) Cálculos finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación.

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

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

d) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

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

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

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

- Calcular la suma de los factores, la suma de cuadrados de factores y la medida del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{11} + F_{12} + F_{1n}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2$$

$$F = \frac{\Sigma F}{N}$$

donde:

N = Cálculos finales para el coeficiente de variación:

F = Factor promedio para cálculos de linealidad del sistema

e) Cálculos finales para el coeficiente de variación :

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

$$CV = \frac{DE}{F} \times 100$$

Donde :

CV = Coeficiente de variación

DE = Desviación Estandar

F = Factor para cálculos de linealidad del sistema

EXACTITUD

CALCULOS :

a) Tabular los resultados del porciento recuperado (R), con base al siguiente formato :

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

b) Cálculos preliminares :

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_N^2$$

$$R = \frac{\Sigma R}{N}$$

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

c) Cálculos finales :

Coefficiente de variación.

$$CV = (DE/R) 100$$

LINEALIDAD DEL METODO

CALCULOS:

1o Cantidad adicionada - Cantidad recuperada

a) Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)
X ₁₁ , X ₁₂ , ..., X _{1n}	y ₁₁ , y ₁₂ , ..., y _{1n}
X ₂₁ , X ₂₂ , ..., X _{2n}	y ₂₁ , y ₂₂ , ..., y _{2n}
X ₃₁ , X ₃₂ , ..., X _{3n}	y ₃₁ , y ₃₂ , ..., y _{3n}

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

b) Cálculos preliminares:

$$\Sigma X = x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n}$$

$$\Sigma Y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}$$

$$\Sigma X^2 = x^2 + x^2 + \dots + x^2 + x^2 + x^2 + \dots + x^2 + \dots + x^2 + x^2 + \dots + x^2$$

$$\Sigma Y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2$$

$$\Sigma XY = x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} + \dots + x_{1n} y_{1n} + x_{21} y_{21} + x_{22} y_{22} + \dots + x_{2n} y_{2n} + x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} + \dots + x_{1n} y_{1n}$$

c) Cálculos finales:

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

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

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

2o Por ciento recuperado

Calcular el por ciento recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = (y/x)100$$

a) Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

b) Cálculos preliminares

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$\bar{R} = (\Sigma R) / N$$

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

c) Cálculos finales :

Coefficiente de variación :

$$CV = (\overline{DE/R}) 100$$

PRECISION DEL METODO

CALCULOS

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilizan dos días, dos analistas diferentes y tres determinaciones.

a) Tabular los resultados con base en el siguiente formato :

ANALISTA		
	1	2
	y ₁₁₁	y ₂₁₁
1	y ₁₁₂	y ₂₁₂
	y ₁₁₃	y ₂₁₃
DIA		
	y ₁₂₁	y ₂₂₁
2	y ₁₂₂	y ₂₂₂
	y ₁₂₃	y ₂₂₃

B) Cálculos preliminares

$$y_{...} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2_{...} = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$y = y_{...} / \bar{N}$$

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

N = Número total de determinaciones (en este caso específico)

$$N = 12$$

c) Cálculos finales :

Coefficiente de variación

$$CV = (DE / \bar{y}) 100$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

CALCULOS:

a) Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:

	CONDICIÓN / TIEMPO		
INICIAL.	1	2	3
y ₁	y ₄	y ₇	y _{N-2}
y ₂	y ₅	y ₈	y _{N-1}
y ₃	y ₆	y ₉	y _N

b) Cálculos preliminares para el intervalo de confianza :

MEDIA \bar{Y}_0 \bar{Y}_1 \bar{Y}_2 \bar{Y}_M

VARIANZA S_0^2 S_1^2 S_2^2 S_M^2

$$Sp^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c + 1)}$$

$$Sp^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c + 1)}$$

$$Sp^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c+1)}$$

c) Cálculos finales para el intervalo de confianza :

Para cada condición x tiempo .

$$IC = (\bar{Y}_i - \bar{Y}_0) \pm t^* [Sp,^2] \begin{Bmatrix} 2 \\ 3 \end{Bmatrix}^{1/2}$$

DONDE :

t^* = Valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2 (c + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

d) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación para cada condición / tiempo / muestra, calcular el factor (f) con la siguiente fórmula :

$$f = \frac{(\text{análisis muestra / condición / tiempo})}{(\text{análisis inicial } y)} \times 100$$

$$f_1 = \frac{Y_4}{Y_1} \times 100$$

$$f_2 = \frac{Y_5}{Y_2} \times 100$$

$$f_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{Y_{n-2}}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_3} \times 100$$

Para cada condición / tiempo, calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula :

$$\bar{I} = \frac{\Sigma I \text{ (condición / tiempo)}}{N}$$

Donde :

N = número de muestras por cada condición / tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$t_3 = \frac{- + l_7 + l_8 + l_9}{3}$$

La media del factor (I) para cada condición / tiempo deberá cumplir con los criterios de la tabla IV.

Tabla IV. Criterios de la condición/tiempo del intervalo de confianza expresado en por ciento.

METODOS	VALOR DE I
Cromatográficos	98 - 102 %
Titrimétricos	98 - 102 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %
Microbiológicos	95 - 105 %

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO X

GLOSARIO

- b = Ordenada al origen o intercepto
r = Coeficiente de correlación
r² = Coeficiente de determinación
CV = Coeficiente de variación
Σ = Sumatoria
m = Pendiente
n = Número de replicaciones
t = Número de diluciones o número de cantidades adicionadas
- \bar{y} = Media aritmética
N = Número total de determinaciones
S² = Varianza
DE = Desviación estándar
x = Dilución o cantidad adicionada
y = Propiedad medida o cantidad recuperada
R = Por ciento recuperado
- \bar{R} = Promedio aritmético del por ciento recuperado.
t = Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975
- t* = Valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0.975
Sp² = Varianza ponderada
LSIC = Límite superior del intervalo de confianza al 95 %
LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza al 95 %
F = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada 0.975
DEP = Desviación estándar ponderada
gl = Grados de libertad
y... = y total
F = Factor para cálculos en la Linealidad del Sistema
l = Factor para cálculos en la Estabilidad de la Muestra
c = Número de comparaciones en la prueba de t de Dunnett
Se² = Varianza error de regresión

Sdm² = Varianza de la diferencia de pendiente

Sdo² = Varianza de la diferencia de ordenadas

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

- 1.- The Merck Index. Eleven Edition, 1989. Merck Co., Inc. USA . p 5133.
- 2.- Arenas Roberto, Fernández Genoveva, Domínguez Luciano. Onchomycosis treated with itraconazole or Griseofulvin alone with and without a topical antimicotic or keratolytic agent. *International Journal of Dermatology*. 1991; 30: 8
- 3.- Domonks Anthony N. Odom Richard B. *Tratado de Dermatología*. Tercera Edición. Salvat Editores. España 1985 : 398.
- 4.- Martindale. *The extra Farmacopoeia*. 29 th edition. The Pharmaceutical Press U.K. 1989.
- 5.- Cavrini V. High-pressure liquid chromatographic (HPLC) analysis of imidazole antifungals in commercial dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 1982; 10: 4.
- 6.- Patricia Tapia O., Adriana Ganem R., David Quintanar G. Determinación colorimétrica de tres antimicóticos tipo imidazol : Nitrato de Miconazol, Ketoconazol, e Itraconazol. Facultad de Estudios Superiores Cuauhtitlán. Sección Tecnología Farmacéutica. p. 22
- 7.-Rommel,Rory P.: Dombrovskis, Dzintra; Canafax, Daniel M. (Coll. Pharma., Univ. Minnesota, Mineapolis., *J. Chromatogr*. 1988, 432, 388-94
- 8.-Babcock, N. R.; Davies, A. (Dep. Chem. Pathol., Adelaide Med. Cent. Women Child., North Adelaide, 5006 Australia). *Ann Clin. Biochem*. 1990, 27(5), 506-8.
- 9- Goodman y Gilman. *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Séptima Edición. p.1166
- 10.- Goodman y Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición 1991. p. 1134.

- 11.- Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Thirtieth Edition. Edited by James E.F Reynolds. London The Pharmaceutica l press. 1993. p.325
- 12.- Adrián García de Marina, Benito de Castilla. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Primera edición 1988. Edit. Limusa, S.A de CV p. 36
- 13.-Beckman Instruments de México, S.A de CV. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución. pp. 1-13.
- 14.-Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México, A.C Guía do Validación de Métodos Anallticos.
- 15.-Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México, A.C (Ma. Eugenia Guerrero) Conferencia Validación de Métodos Analíticos.
- 16.-Journal of Pharmaceutical Science and Tecnology 1996. January-February Vol.50, No 1.
- 17.-Pharma News. Actualización en Tecnología farmacéutica. Noviembre 90. Vol 1/No.5. p.p 16-17.
- 18.-Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Aplicación y práctica. Oscar Alberto Quattrocchi. Laboratorios Dr. Gador, Buenos Aires Argentina, Sara Inés Abelaira de Andrizzi. Lab. Farmerit, Buenos Aires Argentina. 1992. Pág. 261-262.