



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Cuantificación de Ketorolaco en matrices sol-gel  
utilizando CLAR.

T E S I S   P R O F E S I O N A L

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LUZ ELENA ROMERO MEDINA

ÁREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO:  
Medicamentos de liberación controlada

DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ

ASESOR DE TESIS:  
Dr. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD



México D.F. a 09 de Febrero de 2015



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 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.

## AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos de los proyectos PAPIIT IT119211 “Matrices de componentes híbridos preparadas por el método sol-gel, para desarrollar dispositivos de liberación controlada de principios activos”, e IT200815 “Diseño de matrices híbridas de liberación modificada preparadas mediante el proceso sol-gel, con actividad hipoglucemiante, aplicables en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2”, por lo que se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional autónoma de México.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por dejarme caer muchas veces para poder aprender.

A mi familia por su amor y apoyo incondicional, por creer en mí, por alentarme a seguir adelante, porque nunca me faltó nada, pero sobre todo... porque todos los días me daban una parte de mi herencia... todos los días me mandaron a estudiar.

A mis abuelos Hilaria Ramírez (q.e.p.d.), Silvino Medina, Lucía Rosas y José Romero, por su gran cariño, sus anécdotas y enseñanzas, por ayudarnos en los momentos más difíciles, porque así contribuyeron a esta meta.

A la Universidad Nacional Autónoma de México ya que a través de su Facultad de Estudios Superiores Zaragoza me dio la oportunidad de prepararme profesionalmente brindándome su conocimiento, experiencia y el orgullo de pertenecer a su comunidad.

A la MASS Cynthia Espinosa Contreras, al Dr. Vicente Jesús Hernández Abad por su tiempo, la oportunidad de aprender y realizar esta tesis bajo su dirección y apoyo, y en especial a la Dra. Elizabeth pues sus palabras fueron siempre oportunas y de gran ayuda.

A Claudia Arianna Almazán Méndez, Sonia López Martínez, Jesús Salomón Bárcenas Hernández, Alma Lorena Ruíz Barrera y mi cuñado Juan Manuel Peña García, porque sin obligación alguna me brindaron en su momento lo mejor de sí, su amistad, su ayuda, su hombro y muchas risas, aguantando lo mejor y lo no tan bueno de mí.

*Dedicado a mis padres:*

*María Elena y Fernando*

*Así como a mis hermanas:*

*María Elena (q.e.p.d.), Elisa y Fernanda*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	6
2. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) .....	7
2.2 Tipos de CLAR.....	8
2.3 Cromatografía por par iónico .....	8
2.4 Equipo de CLAR .....	9
2.5 Fase estacionaria.....	10
2.6 Fase móvil.....	10
2.7 Distribución del analito .....	11
2.8 Validación del método de cuantificación de ketorolaco usando CLAR.....	12
2.8.1 Importancia .....	12
2.8.2 Parámetros de estudio.....	13
2.9 Propiedades fisicoquímicas de ketorolaco .....	14
2.10 Algunos métodos de cuantificación de Ketorolaco .....	15
2.11 Algunas técnicas analíticas utilizadas para cuantificación de analito en muestras de sol-gel.....	15
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA .....	16
4. OBJETIVOS .....	16
5. HIPÓTESIS .....	17
6. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	17
6.1 Tipo de estudio.....	17
6.2 Población de estudio.....	17
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación: .....	17
6.4 Variables .....	18
6.5 Cuadro 5. Materiales y métodos .....	18
6.6 Método .....	19
6.7 Diagrama de flujo .....	19
7. METODOLOGÍA.....	20
7.1 Desarrollo del método analítico.....	20

7.2 Validación del sistema .....	21
7.3 Validación del método analítico.....	23
7.4 Aplicación del método analítico en matrices sol-gel.....	25
8.RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	27
9. CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45
APÉNDICE .....	48

## 1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución es utilizada hoy día por su capacidad para el análisis de muestras volátiles o termolábiles, separar y determinar una gran variedad de muestras, inclusive en pequeñas cantidades, lo cual la hace una técnica práctica y muy útil.

Debido a que se siguen originando nuevos productos farmacéuticos, continuamente se desarrollan nuevos métodos analíticos que sean capaces de determinar la cantidad presente del o de los analitos en una muestra dada. En este trabajo se buscó encontrar las condiciones que permitieran contar con un método analítico por CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución), para la determinación de ketorolaco en matrices sol gel que se han desarrollado en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica. Dichas matrices son parte de la búsqueda de formulaciones farmacéuticas óptimas que aseguren la actividad farmacológica del principio activo dentro del organismo, y se ha estudiado una nueva forma de administrar un fármaco de manera constante pero minimizando la cantidad de dosificaciones<sup>1</sup>. Implementar un método analítico como el descrito es esencial en el control de calidad del proceso de fabricación de dichas matrices donde el ketorolaco es el principio activo.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Para poder entender el desarrollo del método analítico propuesto para la cuantificación del ketorolaco presente en matrices sol-gel, es necesario entender también los conceptos básicos involucrados en el método, su verificación y factibilidad.

La cromatografía como tal es una técnica analítica de separación donde una muestra se desplaza en un sistema que contiene una fase estacionaria o fija de superficie sólida o un fluido sostenido en un sólido y otra móvil, la cual puede ser desde un gas hasta un líquido o un fluido supercrítico.<sup>2</sup> La clasificación de los distintos tipos de cromatografía se muestra en el *Cuadro 1*. En el caso de la separación mediante CLAR, la fase estacionaria se encuentra dentro de una columna. Dependiendo del tipo de fuerza que existe entre las fases estacionaria y móvil se define el tipo de cromatografía.<sup>3</sup>

Cuadro 1. Clasificación de diferentes tipos de cromatografías.

FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA
GAS (CG) CROMATOGRAFÍA DE GASES	LÍQUIDO Cromatografía gas - líquido
	SÓLIDO Cromatografía gas – sólido
LÍQUIDO (CL) CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	LÍQUIDO Cromatografía líquido – líquido
	SÓLIDO Cromatografía líquido – sólido

Fundamentalmente, la separación por CLAR puede llevarse a cabo si tanto la fase móvil como la estacionaria son de polaridad opuesta, todo soluto debe ser completamente soluble en la fase móvil (con la misma polaridad) y después de entrar a la columna, el soluto debe salir de ella como parte del proceso de separación. Así es como por migración diferencial, los solutos presentes dentro de una muestra se separan entre sí al avanzar a distintas velocidades a lo largo de la

columna y como consecuencia de las fuerzas competitivas y selectivas existentes entre ambas fases por las moléculas del soluto, de manera que el soluto puede quedar retenido en el relleno de la columna cromatográfica (fase estacionaria) o disuelto en la fase móvil. De acuerdo al tipo de interacción entre las fases y el soluto se definen los distintos tipos de cromatografía líquida empleados.

## 2.2 Tipos de CLAR

Los tipos de cromatografía se dividen o clasifican en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria: cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de exclusión molecular y de afinidad.

*La cromatografía de adsorción* se refiere al proceso donde los componentes de la muestra compiten entre sí por un lugar en la superficie de la fase sólida o estacionaria con grupos polares.<sup>2-5</sup>

*La cromatografía de reparto* es un proceso donde el soluto según su solubilidad se reparte entre ambas fases y se crea un equilibrio dinámico definido por la constante de distribución.<sup>2-8</sup>

En la *cromatografía de intercambio iónico* la fase estacionaria (sólida) está constituida de grupos con carga electrostática (positiva o negativa) que atraen a sustancias con carga opuesta.<sup>2,3</sup>

*La cromatografía de exclusión molecular* se caracteriza por su fase estacionaria polimérica con tamaño de poro definido que excluye a molécula de mayor tamaño, por lo que también se le conoce como cromatografía de filtración.<sup>2,3</sup>

*La cromatografía de afinidad* se da por interacciones bioquímicas específicas, donde la fase estacionaria adsorbe a moléculas con ligandos de actividad determinados.<sup>2</sup>

## 2.3 Cromatografía por par iónico

La CLAR por par iónico es en parte complemento de la CLAR de fase-reversa, donde la fase móvil se compone de una solución amortiguadora como fase acuosa y un disolvente orgánico (modificador) como el metanol, usando una fase estacionaria sólida en columna compuesta de sílica gel enlazada a compuestos orgánicos, sólo que en este caso se hace uso de cantidades pequeñas pero

conocidas de un contra-ión que posee carga contraria a la del analito agregado a la fase móvil. Así, se crea una capa iónica en la superficie externa de la fase estacionaria que permite la elución y separación de la muestra al afectar su retención. A altas concentraciones de disolvente el contra-ión ayuda en la separación de la muestra, pues se forma una sal con una constante de disociación débil que puede interactuar fuertemente con la fase reversa.<sup>2, 3, 4, 11</sup>

## 2.4 Equipo de CLAR

Cuadro 2. Componentes de un equipo de CLAR.

COMPONENTE	CARACTERÍSTICA	EJEMPLO	REFERENCIA
Bomba	Mantiene caudal constante de fase móvil.	Tipos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presión constante</li> <li>• Volumen constante</li> <li>• Tipo jeringa</li> <li>• Recíprocas de pistón</li> <li>• Membrana</li> </ul>	6,7,8
Inyector	Automático	De jeringa	6,7,8
Columna	Fase estacionaria de distintos diámetros.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparativas</li> <li>• Semipreparativas</li> <li>• Analíticas</li> <li>• Microcolumnas</li> </ul>	6,7,8
Detector	Transformador de propiedades en señales.	Absorbancia como UV-visible, fluorescencia, amperométrico o de separación como el de espectrometría de masas, electroquímicos, de refracción.	6,7,8
Ordenador	Tratamiento de datos	Software	6,7,8

Gran parte del éxito en la separación por la CLAR de los compuestos de una mezcla está dada por la interacción que existe entre el analito y las fases, tanto la estacionaria como la móvil, por ello es de suma importancia la elección de éstos según el método a emplear.

## 2.5 Fase estacionaria

Gran parte del trabajo cromatográfico recae en esta fase y se le identifica en columna cromatográfica, su empaquetamiento debe ser tal, que su interacción con diversos analitos sea específica así como el área superficial, pues ésta determina la retención del analito. La base química de la columna es indispensable para su estabilidad química y mecánica, la cual influye en la adsorción en fase-reversa y en la tensión superficial de la que depende la rigidez del material de empaquetamiento. El tamaño de poro puede llegar a impactar en el proceso de separación de la muestra puesto que el diámetro debe permitir que el soluto acceda a la fase estacionaria.<sup>4</sup>

La polaridad y reactividad de la columna están dadas por los grupos silanol ( $\equiv\text{Si} - \text{OH}$ ) que se encuentran libres en la superficie de la sílica. Lamentablemente el uso de sílica tiene sus desventajas, por ejemplo, a pH alto la columna pierde estabilidad al tener la sílica la capacidad de disolverse (en agua), y además la alta densidad superficial de los silanoles. Es por ello que se le ha dado uso a la sílica híbrida, la cual posee uniones del grupo silanol con grupos orgánicos que le confieren mayor estabilidad frente al pH.<sup>4</sup>

También es importante señalar entre las características de la columna los *platos teóricos* como los que se conocen en el proceso de destilación. Se considera que el soluto se encuentra en equilibrio con ambas fases aunque no sea así, es por ello que la columna es dividida longitudinalmente en un cierto número secciones conocidas como platos teóricos.<sup>3, 4</sup>

El soluto en su paso por la columna, atraviesa cada uno de los platos teóricos donde pasa un cierto tiempo, permitiendo que el soluto alcance el equilibrio con ambas fases. Entonces se asume que los platos teóricos se relacionan con la eficiencia de la columna cromatográfica, pues si los platos son cortos y se exhibe un gran número de ellos, se considera que la muestra alcanza el equilibrio con las dos fases un mayor número de veces a lo largo de toda la columna mientras pasa a través de ella, de no ser así el desempeño de la columna es pobre. Entonces el número de platos teóricos dependerá de la longitud de la columna y la longitud de cada plato teórico.<sup>3, 4, 6</sup>

## 2.6 Fase móvil

Será la encargada de la elusión de la muestra y para seleccionarla correctamente se debe tomar en cuenta su viscosidad baja para disminuir la presión y aumentar la velocidad de transferencia de masa, además debe ser transparente para ser

leído por el detector, poseer alto punto de ebullición que disminuya el estrés durante la elusión, tener alta pureza de modo que se evite la interferencia en la detección del analito, debe ser inerte en presencia de la muestra, aunque no siempre es así y la solubilidad del analito como el coeficiente de distribución dependerán del eluyente. La fase móvil puede componerse de soluciones acuosas o amortiguadoras de pH, mezclas de éstas con disolventes orgánicos, o tratarse de soluciones iónicas, si se requiere de una fase móvil a cierto pH, éste dependerá de la identidad del analito y por tanto de sus propiedades, como su capacidad de ionizarse.<sup>3</sup>

Para el caso de la CLAR en fase-reversa se prefiere el uso de mezclas de soluciones acuosas (amortiguadores) con disolventes orgánicos que en suma tengan polaridad opuesta a la de la columna. Cuando se trata de CLAR por par iónico, se pueden manejar las mismas condiciones que para la fase reversa salvo que, en este caso se adiciona una cantidad conocida de un contra-ión, el cual ha de poseer carga opuesta a la de la muestra o analito. Otro punto importante es la velocidad de flujo, la cual debe permanecer constante o de lo contrario podrían aparecer errores en la determinación de la distribución del peso molecular de los polímeros. Cambios en el volumen de flujo pueden llegar a darse por fallas en la bomba, cambios en la viscosidad de la fase móvil o en la temperatura, e incluso cuando hay obstrucción de la columna.<sup>3,10,11</sup>

## 2.7 Distribución del analito

Para que se pueda llevar a cabo la separación del analito, es necesario que sea eluido viajando en la fase móvil a través de la fase estacionaria, y para que sea separada la muestra es necesario que se lleve a cabo una interacción entre la muestra y ambas fases, lo que lleva a su distribución en ellas. La forma de expresar este hecho es a través de  $K_2$  que es la constante de distribución del soluto entre las fases y está dada por el cociente de la concentración del soluto en la fase estacionaria entre la concentración del soluto en la fase móvil.<sup>3</sup>

Durante el desarrollo del proceso de separación por medio de la CLAR, es importante el registro de datos que permitan hacer el análisis de resultados, lo que se logra por medio de la obtención de los cromatogramas como el que se muestra en la Figura 1. En un cromatograma es necesario identificar el pico más alto y definido, así como su tiempo de retención ( $t_r$ ) y  $Q$  (volumen de flujo de la fase móvil a través de la columna en mL/min) pues son característicos de la muestra y servirán para su identificación usando el método establecido. Otras características importantes son  $V_0$ ,  $t_0$ ,  $V_r$ ,  $t_r'$  que se definen en el Apéndice.<sup>2</sup>

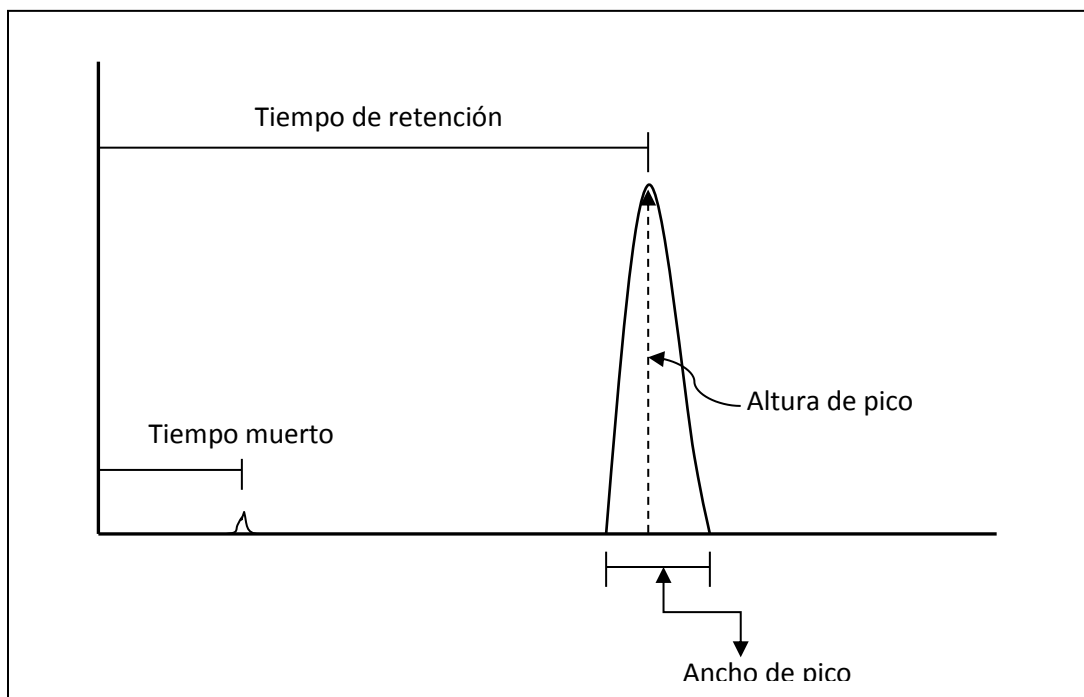


Figura 2. La nomenclatura de un cromatograma.

Ya que se han definido los conceptos más importantes de la CLAR se puede proponer el método analítico que permita determinar al analito de interés, y una vez obtenido el método es necesario corroborar la factibilidad de su implementación mediante su validación.

## 2.8 Validación del método de cuantificación de ketorolaco usando CLAR

### 2.8.1 Importancia

La validación es la evidencia documentada que demuestra la aceptación de un método analítico, y que garantiza que dicho método realiza la tarea para la cual fue diseñado en función de una serie de parámetros que han de determinarse. Tales parámetros incluyen: linealidad, exactitud, precisión, selectividad o especificidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, tolerancia, límite de detección y límite de cuantificación. <sup>12-14</sup>

## 2.8.2 Parámetros de estudio

Los parámetros incluidos en el proceso de validación son: linealidad, exactitud, precisión, selectividad o especificidad, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, robustez, tolerancia, límite de detección y límite de cuantificación.

<sup>15</sup>

Su papel dentro del desarrollo de un método analítico es de suma importancia pues la *Linealidad* permite saber si la respuesta es proporcional a la concentración presente de analito. <sup>14-16</sup>

La *Precisión* indica el grado de concordancia que existe entre determinaciones individuales de una muestra homogénea. <sup>15,17</sup> La precisión se puede estimar mediante distintas formas:

- *Repetibilidad del método*: Se refiere a la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un mismo analista al usar los mismos instrumentos y método. <sup>19</sup> Sirve para saber si el método puede llevarse a cabo de manera repetida. <sup>18</sup>
- *Precisión intermedia*: Se determina para saber si el método se mantiene constante en sus respuestas bajo pequeñas variaciones como por ejemplo, de analista o de equipo, día. <sup>17,18</sup>
- *Reproducibilidad*: Su determinación sirve para saber si un mismo analista puede reproducir el método en un lugar diferente. <sup>15</sup>

El *Límite de detección* permite determinar la concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero que no necesariamente es cuantificable. <sup>16,17,19</sup> A su vez, el *Límite de cuantificación* permite determinar la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud. <sup>17,19</sup>

En el caso de la *Exactitud*, sirve para saber si los resultados obtenidos a partir del desarrollo del método y el valor preestablecido de referencia concuerdan. <sup>17</sup>

Determinar la *Tolerancia* permite saber si los resultados se pueden obtener bajo diferentes condiciones, se refiere a factores externos al método. En cambio la *Robustez* resalta la influencia de factores internos del método y define su capacidad para soportar variaciones pequeñas pero deliberadas y seguir siendo factible. <sup>17</sup>

La *Selectividad o especificidad* permite determinar si el método puede medir al analito de forma específica. <sup>19, 20</sup>

## 2.9 Propiedades fisicoquímicas del ketorolaco

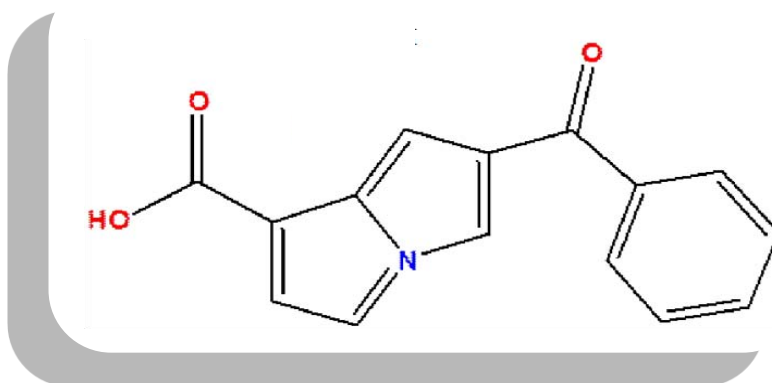


Figura 2. Estructura del ketorolaco

Número de registro CAS: 74103-07-4<sup>22</sup>

Fórmula molecular: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>.<sup>22</sup>

Peso molecular: 376.40 g/mol.<sup>22</sup>

UV máx. (en metanol): 309 nm.<sup>22</sup>

pKa ketorolaco: 3.49 ± 0.02.<sup>22</sup>

### *Propiedades*

Cristales obtenidos a partir de acetato de etilo más éter, cuyo punto de ebullición es 493.181 °C a 760 mmHg, su punto de fusión es de 160-161°, pKa: 3.49 ±0.02, absorción máxima: uv máx. en metanol: 245, 309 nm ( $\epsilon$  7080, 17400) y una densidad de 1.335 g/cm<sup>3</sup>. Los datos de toxicidad son: LD<sub>50</sub> oralmente en ratones: ~200 mg/kg. Es usado como analgésico y anti-inflamatorio.<sup>22,23,24</sup>



## 2.10 Algunos métodos de cuantificación de Ketorolaco.

Al ketorolaco se le ha estudiado usando distintas técnicas y con diferentes muestras. En el caso de la voltametría cíclica y la cromatografía electrocinética micelar se han usado para tabletas, la CLAR en muestra intramuscular y la CCFAE han sido utilizadas en la determinación del ketorolaco trometamina a partir de fluidos biológicos. Si bien ninguno de los métodos mencionados y empleados para cuantificar ketorolaco lo hacen con muestras de este fármaco en matrices sol-gel, por lo menos permiten esbozar una idea que lleve a plantear un método por CLAR que sí lo haga.

Cuadro 3. Cuantificación de ketorolaco.

MÉTODO POR:
Voltametría cíclica <sup>25</sup>
CLAR <sup>26</sup>
CCFAE <sup>27</sup>
Cromatografía electrocinética micelar <sup>28</sup>

## 2.11 Algunas técnicas analíticas utilizadas para cuantificación de analitos en muestras de matrices sol-gel.

Durante la revisión bibliográfica se encontraron algunos ejemplos de técnicas empleadas para cuantificar distintas muestras que se encuentran vinculadas a matrices sol-gel y se enlistan a continuación:

Cuadro 4. Cuantificación de analitos en matrices sol-gel.

TIPO DE MUESTRA	TÉCNICA ANALÍTICA
Complejo ácido de terbio-ácido benzóico <sup>29</sup>	Fluorometría <sup>29</sup>
Células <sup>30</sup>	Microscopía de transmisión electrónica y de fluorescencia, CLAR-UV <sup>30</sup>
Biomoléculas <sup>31</sup>	Electroforesis <sup>31</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En medio de la constante búsqueda de formulaciones farmacéuticas óptimas que aseguren la actividad farmacológica del principio activo dentro del organismo, se ha encontrado una nueva forma de administrar un fármaco de manera constante pero minimizando la cantidad de dosificaciones, se trata de matrices sol-gel que actúan como transporte y protección de fármacos como el ketorolaco, dedicados a disminuir la sensación de dolor actuando como analgésico. Es así, que la aparición de estas novedosas formas farmacéuticas lleva a la constante búsqueda de métodos que permitan controlar las variables presentes en el desarrollo de estas formas farmacéuticas, como por ejemplo, cuantificar la cantidad de activo presente.<sup>1, 32</sup>

Dado que no se ha encontrado en la literatura un método analítico que permita cuantificar ketorolaco en matrices sol-gel, se busca desarrollar las condiciones adecuadas para establecer un método analítico por CLAR para poder cuantificar ketorolaco en dichas matrices.

### 4. OBJETIVOS

*Objetivo general:*

Desarrollar un método analítico que sea específico para la determinación de ketorolaco contenido en matrices sol-gel por medio de CLAR.

*Particulares:*

- Seleccionar las condiciones que permitan el adecuado desarrollo del método analítico propuesto para la determinación de ketorolaco contenido en matrices poliméricas sol-gel.
- Evaluar el método analítico desarrollado mediante la validación del mismo.

## **5. HIPÓTESIS**

El método analítico de CLAR será adecuado para determinar ketorolaco contenido en matrices sol-gel, usando una columna C<sub>18</sub> como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla metanol: agua con un modificador de coleo.

## **6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **6.1 Tipo de estudio**

Experimental, prospectivo, transversal y descriptivo.

### **6.2 Población de estudio**

Ketorolaco en matrices sol-gel.

### **6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:**

Criterios de inclusión: Que el método para cuantificar ketorolaco en matrices sol-gel cumpla con los parámetros de validación.

Criterios de exclusión: Determinaciones que se realicen a pH diferente del que se establezca.

Criterios de eliminación: Que el método tenga poca resolución y baja selectividad.

## 6.4 Variables

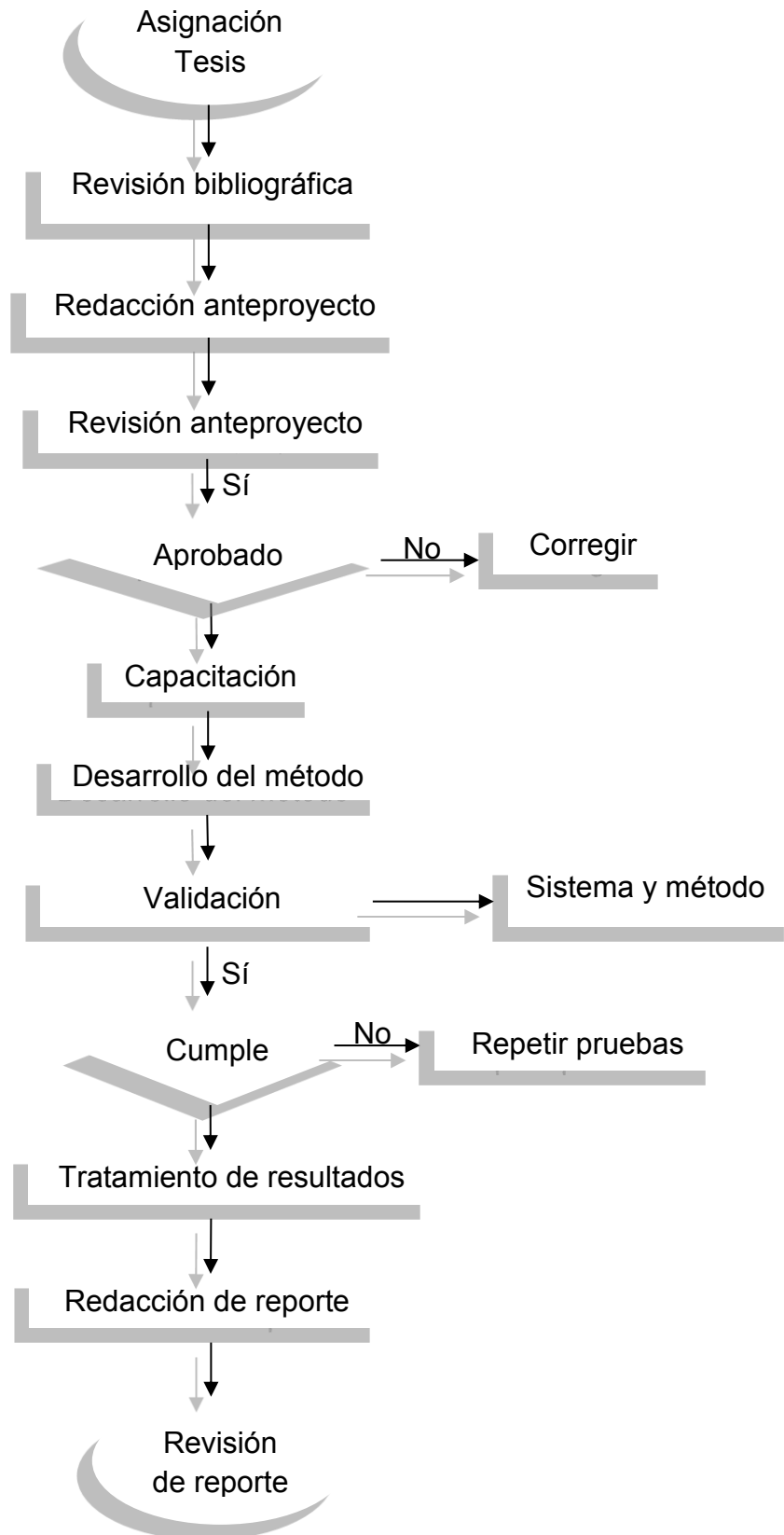
- Fase móvil
- Fase estacionaria
- Temperatura
- pH del medio
- Velocidad de flujo
- Variables de respuesta:
  - Tiempos de retención, área bajo la curva del pico cromatográfico.

## 6.5 Cuadro 5. Materiales y métodos

MATERIAL	EQUIPO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pipetas graduadas de 5 y 10 mL</li><li>• Pipetas volumétricas</li><li>• Bureta de</li><li>• Matraces volumétricos de 10 y 200 mL.</li><li>• Vasos de precipitados de 10, 250, 600, 1000 mL.</li><li>• Probetas de 50, 100 y 1000 mL.</li><li>• Columna cromatográfica Thermo Scientific</li><li>• Frascos reservorios de 1000 mL</li><li>• Viales de vidrio de 1,5 mL</li><li>• Filtrador MILLIPORE con filtro de nylon</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cromatógrafo de líquidos de alta resolución VARIAN ProStar:<ul style="list-style-type: none"><li>- Inyector Varian Modelo M410 No. De serie 50321</li><li>- Bomba Varian ProStar Modelo 240 No. De serie 00871</li><li>- detector Varian ProStar Modelo 325 No. De serie 005093</li></ul></li><li>• Balanza analítica OHAUS Explorer Pro EP214</li><li>• Equipo de filtración MILLIPORE</li><li>• Sonicador VWR modelo 75D</li><li>• Bomba de vacío GAST</li><li>• Campana de extracción</li><li>• Sistema operativo Windows XP</li><li>• Software Galaxy</li><li>• Microbalanza Mettler M75</li></ul>

## 6.6 Método

## 6.7 Diagrama de flujo



## 7 METODOLOGÍA

### 7.1 Desarrollo del método analítico

Para comenzar la parte experimental del proyecto se llevó a cabo un barrido de la muestra analítica para encontrar la longitud de onda máxima a la que absorbe el ketorolaco en el espectrofotómetro de UV, para ello se usó metanol: agua (50:50).

Además se buscó un estándar interno con estructura química similar a la del ketorolaco que permitiera la cuantificación de ésta última y que no interfiriera en la cuantificación del analito.

Para ello, se prepararon muestras de analito y el estándar interno propuesto, de manera que se obtuviera una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada una al ser inyectadas en el cromatógrafo.

#### Fase móvil

La fase móvil comprende una mezcla de disolvente orgánico y de un disolvente acuoso, en este caso se trata de metanol (MeOH) y solución amortiguadora de fosfatos 0.01M a pH3 como disolvente acuoso.

#### Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.01M a pH3

Para una solución de 600 mL se pesaron 100.98 mg de fosfato monobásico de potasio y 915.6 mg de fosfato dibásico de potasio, se llevaron a un vaso de precipitados de 1L, se adicionaron 600 mL de agua desionizada y 0.02 mL de ácido fosfórico con agitación continua. Una vez concluida la preparación de esta solución se añadieron 0.6 mL de dietilamina.

#### Preparación de la fase móvil

Una vez que se hubo reparado la solución amortiguadora de fosfatos 0.01M a pH3, esta al igual que el MeOH, se filtró y desgasificó. Cada una se colocó en su respectivo reservorio que se conectó al equipo de CLAR.

## 7.2 Validación del sistema

### Adecuabilidad

Se analizaron 6 inyecciones de una misma muestra de concentración conocida, la cual se preparó de la siguiente manera:

Se preparó una solución de concentración 100  $\mu\text{g/mL}$  (la cual corresponde al nivel del 100%) con fase móvil.

A continuación se calculó el coeficiente de variación C.V. para la respuesta expresada de estas 6 inyecciones, el cual no debió exceder el 2%.

### Linealidad y precisión

Para esta etapa, se trabajó con seis niveles diferentes de concentración (20, 60, 100, 140, 180 y 220  $\mu\text{g/mL}$ ) por sextuplicado cada uno. De manera que se prepararon soluciones stock tanto para ketorolaco como para indometacina y de cada uno de ellos se tomaron los volúmenes necesarios para preparar cada nivel según se muestra en el Cuadro 6.

#### Preparación de las soluciones stock

*Ketorolaco:* Se pesaron 50 mg de ketorolaco que se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron aproximadamente 25 mL de fase móvil y se sonicó la solución por 5 minutos. A continuación se llevó al aforo con fase móvil y se agitó.

*Indometacina:* Se pesaron 200 mg de indometacina que se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron aproximadamente 25 mL de fase móvil y se sonicó la solución por 5 minutos. A continuación se llevó al aforo con fase móvil y se agitó.

## Preparación de la muestra

A partir de las soluciones stock anteriores, se tomaron los volúmenes mostrados en el Cuadro 6 para preparar cada serie de diluciones para cada nivel de concentración.

Cuadro 6. Preparación de los niveles de concentración.

Nivel	Vol. Ketorolaco (mL)	Concentración Ketorolaco ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vol. Indometacina (mL)	Concentración del std ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen final (mL) (aforo)
1	0.2	20	0.1	40	10
2	0.6	60	0.1	40	10
3	1	100	0.1	40	10
4	1.4	140	0.1	40	10
5	1.8	180	0.1	40	10
6	2.2	220	0.1	40	10

Una vez se transfirieron los volúmenes indicados de ketorolaco y de indometacina en cada matraz volumétrico de 10 mL, se procedió a aforar con fase móvil. Se agitaron las soluciones y se llevaron a los respectivos viales para que fueran inyectadas en el equipo de CLAR.

En seguida, para la linealidad se calculó el cociente del área bajo la curva (ABC) de la muestra y el ABC del estándar como respuesta y se calculó su relación con la concentración de la muestra a cada nivel. Así, también se calculó el valor de la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación  $r^2$ , el cual debía ser superior a 0.98.

Para la precisión del sistema, se analizaron seis muestras a la misma concentración equivalente al 100%, preparadas según se indica en el Cuadro 6, y se calculó el coeficiente de variación que debió cumplir con C.V. < 2%.



### 7.3 Validación del método analítico

#### Linealidad del método

Se trabajó con 5 niveles de concentración (60, 80, 100, 120 y 140  $\mu\text{g/mL}$ ) por sextuplicado, para cada uno de ellos se realizaron pesadas independientes, que se mezclaron con placebo (en peso y composición correspondiente a la concentración que representa el 100% que son 100  $\mu\text{g/mL}$ ), se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se adicionó 0.1 mL de estándar interno equivalente a 40  $\mu\text{g/mL}$ , se adicionaron aproximadamente 5 mL de fase móvil y se sonicó la solución por 5 minutos y se llevó al aforo con fase móvil. Se agitaron las soluciones y se trasvasaron a viales para realizar la inyección de las muestras. Lo siguiente fue determinar  $r^2$ , la cual debió ser mayor a 0.98 y  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ .

#### Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Preparación de las soluciones stock.

*Ketorolaco:* Se pesaron 5 mg de ketorolaco que se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron aproximadamente 25 mL de fase móvil y se sonicó la solución por 5 minutos. A continuación se llevó al aforo con fase móvil y se agitó.

*Indometacina:* Se pesaron 20 mg de indometacina que se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron aproximadamente 25 mL de fase móvil y se sonicó la solución por 5 minutos. A continuación se llevó al aforo con fase móvil y se agitó.

Preparación de la muestra

A partir de las soluciones stock anteriores, se tomaron los volúmenes mostrados en el Cuadro 7 para preparar cada serie de diluciones para cada nivel de concentración con el estándar adicionado.

Cuadro 7. Preparación de los niveles de concentración para LD y LC.

Nivel	Vol. Ketorolaco (mL)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vol. Indometacina (mL)	Concentración del std. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen final (mL) (aforo)
1	0.25	2.5	1.0	40	10
2	0.5	5	1.0	40	10
3	1.0	10	1.0	40	10
4	1.5	15	1.0	40	10

Una vez se transfirieron los volúmenes indicados de ketorolaco y de indometacina en cada matraz volumétrico de 10 mL, se procedió a aforar con fase móvil. Se agitaron las soluciones y se llevaron a los respectivos viales para que fueran inyectadas en el equipo de CLAR.

#### Exactitud

Se inyectaron muestras a tres concentraciones por sextuplicado cada una y se prepararon según el procedimiento utilizado en el punto 7.3.1 para concentraciones de 80, 100, 120  $\mu\text{g/mL}$ , se determinó el porcentaje de recobro y el C. V. a cada nivel de concentración.

#### Estabilidad de la muestra analítica

Se determinó la respuesta de muestras a tres condiciones diferentes por triplicado y a una misma concentración referente al 100%. Su preparación se llevó a cabo según el apartado 7.2.2.2 Cuadro 6. Lo siguiente fue determinar el valor de F con los valores obtenidos, de manera que debía cumplirse que  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ .

Las condiciones de almacenamiento fueron las siguientes:

- a)  $-20^{\circ}\text{C}$
- b)  $3^{\circ}\text{C}$
- c)  $22^{\circ}\text{C}$

### Precisión intermedia

Se evaluó la precisión del método a partir de los resultados obtenidos a efecto de dos factores *analistas* y *días*. Esto es, dos analistas en dos días distintos analizaron seis muestras pesadas de manera independiente y a la misma concentración cada uno, usando siempre el mismo cromatógrafo y la misma columna. Los resultados se tabularon para su fácil análisis según el Cuadro 7.

La concentración de trabajo fue la que representa el 100%, es decir, 100  $\mu\text{g/mL}$  y su preparación consiste en la que se describe en el punto 7.3.1.

Una vez reunidos los datos se llevó a cabo el cálculo del contenido y porcentaje de recobro de cada una de las muestras, así como el  $\text{C.V.}_{\text{Total}}$  para realizar el análisis de varianza de los datos.

### Robustez

Se evaluó la respuesta obtenida del análisis de muestras preparadas por triplicado y según el Cuadro 6 del apartado 7.2.2.2 a una concentración correspondiente al 100%. El estudio se realizó considerando:

- a) Las condiciones originales de estudio.
- b) Cambio de columna.
- c) Cambio en la marca del disolvente orgánico.

## **7.4 Aplicación del método analítico en matrices sol-gel**

Se inyectaron muestras a tres condiciones diferentes por triplicado cada una y se prepararon según el procedimiento utilizado en el punto 7.3.1 para evaluarlas y determinar la condición de análisis más adecuada de extracción del fármaco en matrices de sol-gel para el posterior análisis en CLAR.

Las condiciones fueron las siguientes:

- a) A temperatura del laboratorio y usando en la primera dilución solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 y en la segunda para aforar, fase móvil que contiene la solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3. Con sonicación por 1h.
- b) A temperatura del laboratorio y usando sólo fase móvil. Con sonicación por 1h.
- c) A 40°C y usando en la primera dilución solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 y en la segunda para aforar, la solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3. Con sonicación por 1h.

Una vez establecido y validado el método analítico, se procedió a realizar pruebas en las matrices de sol-gel proporcionadas por el equipo del Laboratorio de Investigación Farmacéutica, 2.3366 g de matriz de sol-gel contenían 150 mg de activo. De modo que se preparó una solución que contenía teóricamente 1 mg de ketorolaco en un matraz volumétrico de 100 mL donde se llevó a volumen con mezcla de metanol: solución amortiguadora a pH y proporción que se indica en cada uno de los incisos anteriores, después se transfirió un volumen de 1 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL para llegar a una concentración de 100 µg, la cual se sonicó durante una hora.

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Desarrollo del método analítico

Se realizó el barrido en el espectrofotómetro de uv para la muestra de ketorolaco, encontrándose que la longitud de máxima absorción en el espectro es de 300 nm, cerca del valor reportado para ketorolaco a 309 nm UV máx. Conocer el dato de la máxima absorción del analito permitió ajustar el método durante el desarrollo del mismo para asegurar que se detecta la máxima cantidad presente del analito en la muestra durante su elución, emitiendo una respuesta que pueda ser cuantificable con buena resolución y eficiencia.

En cuanto a la búsqueda de un estándar interno, se revisó un listado de estándares con los que contaba el Laboratorio de Investigación Farmacéutica y se buscó aquel estándar que contara con una estructura molecular parecida a la de ketorolaco con el fin de que su parecido se viera reflejado en el tiempo de retención cercano pero no igual al del analito, que también absorbiera energía en el espectro de uv, y que la intensidad de la respuesta emitida por el estándar fuera parecida a la del analito. De manera que se encontró a la indometacina adecuada para este fin.

Respecto a la fase móvil y su proporción, primero para la parte orgánica de la fase se buscó un disolvente en el que el analito fuera soluble y permitiera su elución por lo que se decidió usar metanol, debido al pKa de ketorolaco para la parte acuosa de la fase se utilizó una solución amortiguadora y se eligió usar sales de fosfato en una concentración 0.01M en su preparación ya que no presentan señal que interfiera con la del analito.

Se realizó la inyección de muestras con ketorolaco a concentración conocida usando diferentes proporciones hasta que se encontró la proporción que permitiera eluir a la muestra, y con la que el pico se mirara mejor resuelto. Obteniéndose que la fase móvil se fija en metanol:solución amortiguadora de fosfatos pH3. Debido a que durante las pruebas se obtienen picos cromatográficos con coleo (Ver Figura 3a), se decidió adicionar dietilamina a la fase móvil (en la solución acuosa), que permitió eliminar el coleo debido a que al encontrarse en la fase móvil, eluyó y recubrió la superficie de la columna evitando que el analito se viera muy retenido por la fase estacionaria y provocase el coleo. (Ver Figura 3b):

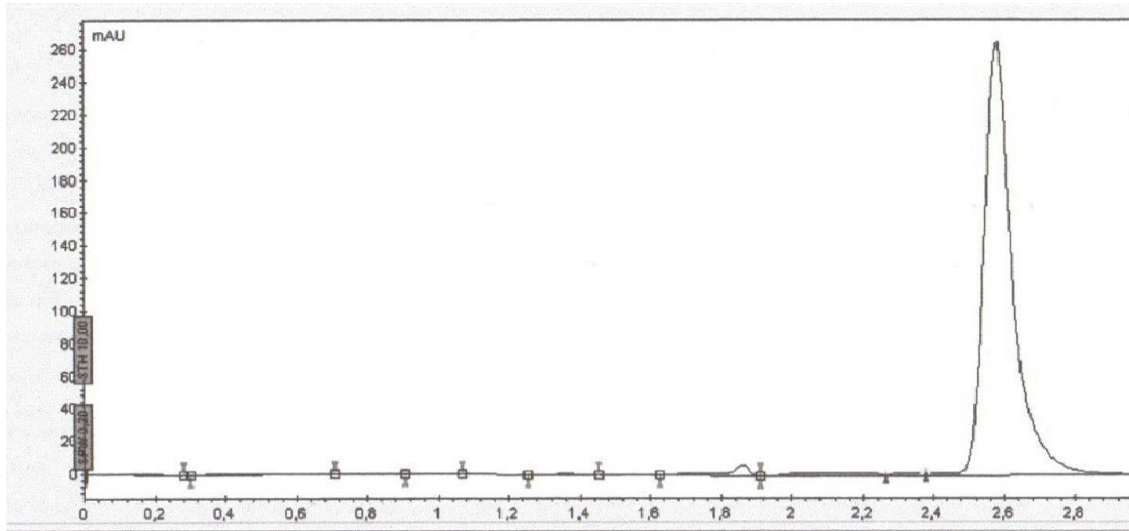


Figura 3a. Cromatograma de ketorolaco con coleo.

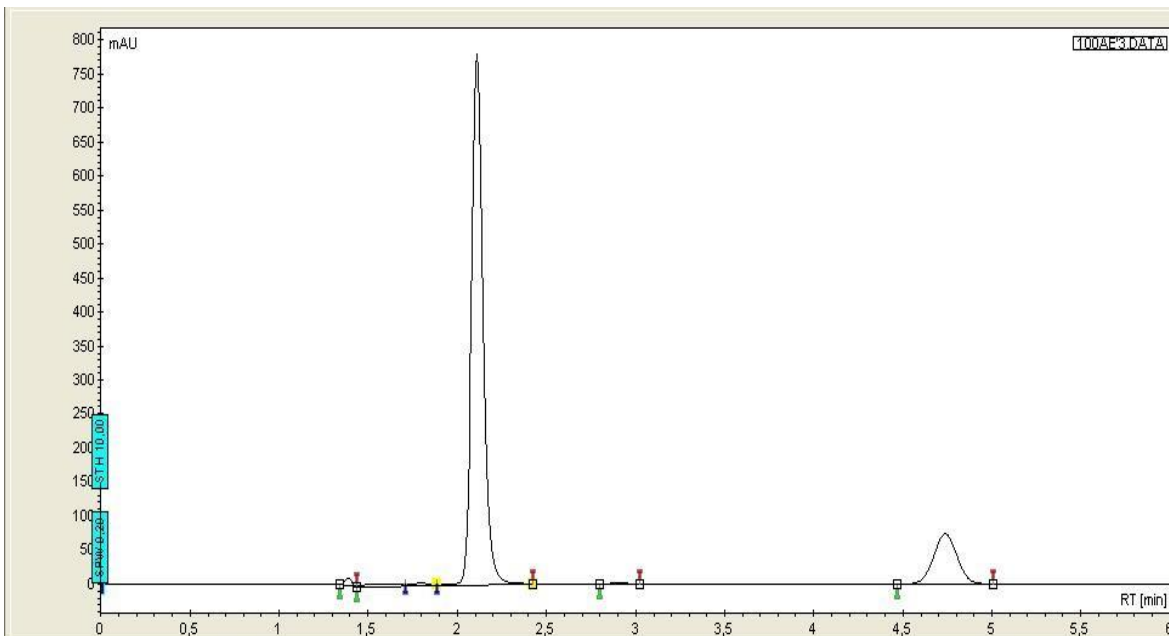


Figura 3b. Cromatograma de ketorolaco e indometacina en fase móvil.

El analito tiene un tiempo de retención  $t_r$  de 2.12 minutos, indometacina de 4.65 minutos. Usando fase móvil compuesta de metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3 en proporción 70:30 (con 0.6 mL de dietilamina).

El tiempo de retención que muestra el estándar interno resulta adecuado para el análisis por ser cercano, es decir, hay buena separación por lo que no se

traslapan señales e indica la selectividad del método respecto al analito al poder distinguir entre ambas sustancias. El  $t_r$  del estándar interno permitió delimitar el tiempo de análisis, el cual es adecuado si se toma en cuenta el tiempo total de corrida durante la validación o el análisis de más de una muestra.

## 8.2 Validación del sistema

### Adecuabilidad

Con la inyección por sextuplicado de una misma solución al 100% de ketorolaco se obtuvieron los siguientes datos:

Cuadro 8. Datos experimentales para la adecuabilidad del sistema.

$ABC_m$	$T_r$	$ABC_{STD}$	$TRE_{STD}$	$k'$	$As$	$NPT$
<b>PROMEDIO</b>						
3489.15	2.13	677.85	4.66	0.31	1.15	5369.79
<b>C.V.</b>						
0.63	0.71	1.08	1.00	3.53	2.75	1.23

Cuadro 9. Resultados de Adecuabilidad del sistema.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Asimetría	1.15
Selectividad	2.52
NPT	5369.78

Con los datos del ABC de las seis inyecciones se determinó:

Cuadro 10. Datos de adecuabilidad.

<b>n =</b>	6
<b><math>\Sigma y =</math></b>	20934.9
<b><math>\bar{y} =</math></b>	3489.15
<b>S =</b>	21.96
<b>C.V. =</b>	0.63

Como se pudo observar en el Cuadro 10, de acuerdo con lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP por sus siglas en inglés), para las seis inyecciones realizadas se tiene que cumplen con los requisitos de precisión ya que se obtuvo un coeficiente de variación (C.V.) menor al 2%, se obtuvo buena eficiencia en la separación de la muestra pues el número de platos teóricos es mayor a 2000, la asimetría del pico se encuentra cerca de la unidad, muy cerca de la simetría para un pico perfecto, lo que nos asegura que el sistema cromatográfico no interfiere con la simetría y definición del pico resultante durante la elución de la muestra.

### Linealidad

Basado en la hipótesis:

$$H_0: F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$$

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

Si  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ , entonces hay relación lineal entre la propiedad medida y la cantidad a la que corresponde. Por lo tanto  $H_0$  se acepta.

Pero si  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ , entonces no hay tal relación y  $H_0$  se rechaza.



Cuadro 11. Análisis de varianza para la regresión usando F de Fisher.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	$F_{\text{calculada}}$
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	MCR / MCER
Error de regresión	n-2	SCER	MCER = SCER / n-2	

Cuadro 12. Análisis de varianza para los datos de regresión usando F de Fisher.

Fuente	gl	SC	MC	$F_{\text{calculada}}$
Regresión	1	431.84	431.84	25877.05
Error de regresión	34	0.57	0.02	

$$F_{\text{tablas}} = 4.1300$$

Cuadro 13. Resultados de precisión y linealidad del sistema.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple
Coefficiente de variación	< 2%	1.11%	SÍ
Coefficiente de determinación	> 0.98	0.99	SÍ
F	$F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$	25877.05	SÍ

El cumplimiento de estos parámetros confirma la precisión con que opera el sistema de medición. Usando los datos de la razón de las áreas bajo la curva ABC contra la concentración a cada nivel se obtuvo la siguiente gráfica.

### Linealidad del sistema

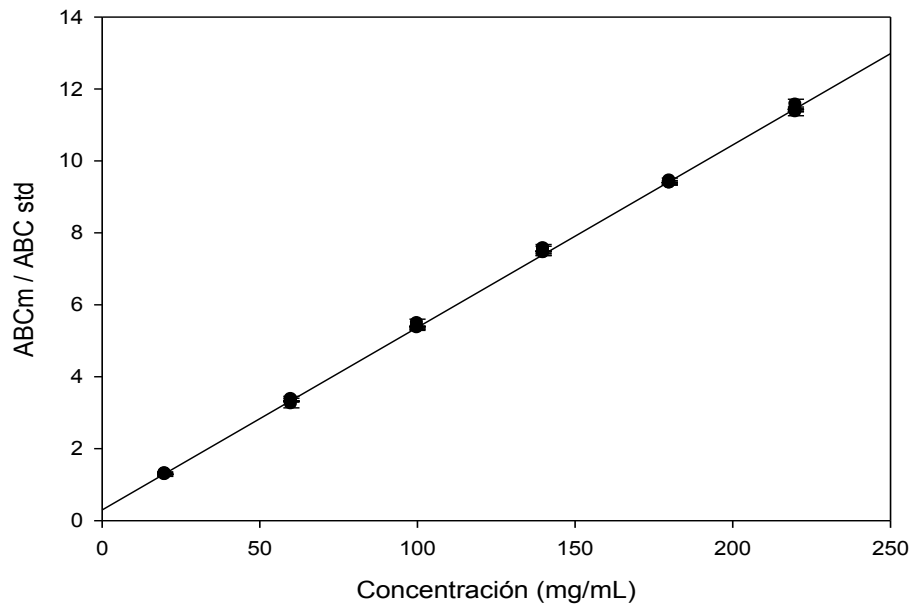


Figura 4. Ecuación y curva para el sistema de medición.

Al resultar que  $r^2$  es mayor a 0.98 y que  $F_{calculada} > F_{tablas}$  con  $25877.05 > 4.13$ ,  $H_0$  se acepta entonces, hay relación lineal entre la propiedad medida y la cantidad a la que corresponde.

### 8.3 Validación del método

#### Linealidad

Con los datos obtenidos durante esta prueba, se realizó el análisis de varianza y cálculo el valor de F, el cual se comparó con el valor de  $F_{tablas}$ . Las fórmulas para el cálculo de gl, SC, MC y F se pueden observar en el Cuadro 11.

Se trabajó bajo el supuesto de que:

$$H_0: F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$$

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

Si  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ , entonces hay relación lineal entre la propiedad medida y la cantidad a la que corresponde. Por lo tanto  $H_0$  se acepta.

Pero si  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ , entonces no hay tal relación y  $H_0$  se rechaza.

Con los datos de masa o cantidad adicionada y las ABC de cada nivel de concentración se calculó lo siguiente.

Cuadro 14. ANAdeVA para los datos de linealidad del método analítico.

Fuente	GI	SC	MC	$F_{\text{calculada}}$
Regresión	1	49300117.72	49300117.72	
Error de regresión	28	662961.62	23677.20	2082.18
Total	29	49963079.34		

$$F_{\text{tablas}} = 4.19$$

Cuadro 15. Resultados de la prueba de linealidad.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple
Coefficiente de variación	< 2%	1.28%	Sí
Coefficiente de determinación	> 0.98	0.98	Sí
F	$F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$	2082.18	Sí

Al resultar  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$  con  $2082.1768 > 4.1960$ ,  $H_0$  se acepta y entonces se dice que hay relación lineal significativa entre la propiedad medida y la cantidad a la que corresponde. Por lo que se considera hay linealidad en el método analítico.

## Linealidad del Método

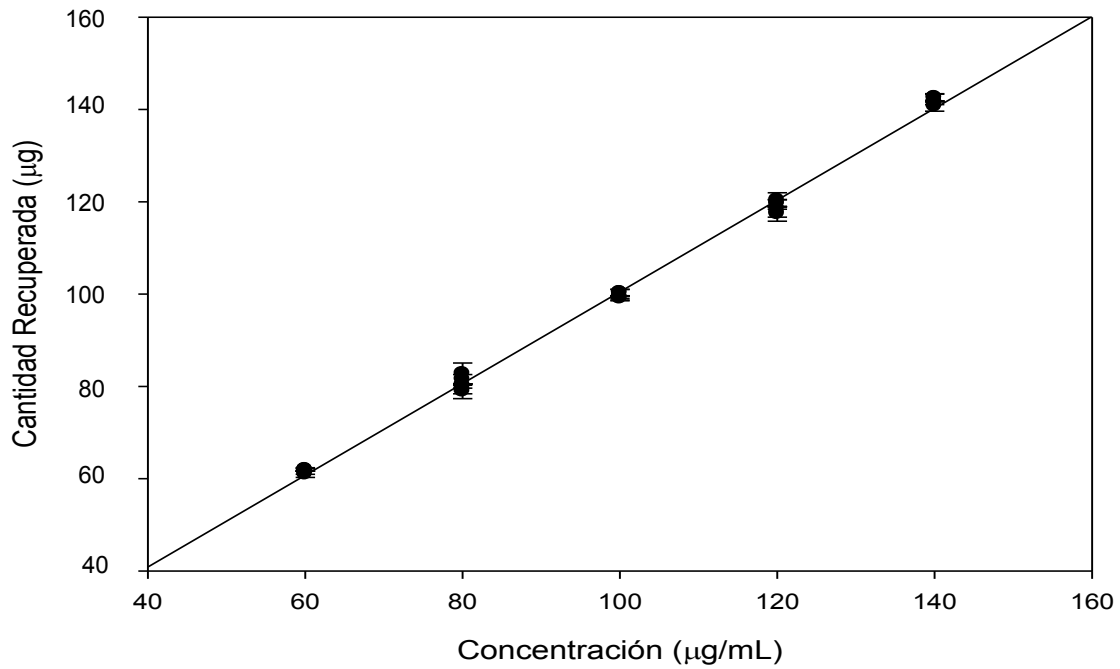


Figura 5. Ecuación y curva para el método analítico.

## Exactitud

Para la determinación de la exactitud del método analítico, se propuso lo siguiente:

$$H_0: F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$$

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

Siguiendo el siguiente formato del Cuadro 16 y con los datos obtenidos durante la prueba se realizaron los cálculos para el análisis de varianza de dichos datos y el llenado del cuadro 17.

Cuadro16. Formato para el ANADEVa de los datos de exactitud.

Fuente	gl	SC	MC	F <sub>calculada</sub>
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	MCR / MCER
Error de regresión	n-2	SCER	MCER = SCER / n-2	
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCFA	MCFA = SCFA / g.l. FA	MCFA / MCEP
Error puro	t(r-1)	ACEP	MCEP = SCEP / g.l. EP	

Cuadro 17. ANADEVa de los datos de la prueba de exactitud para el método analítico.

Fuente	gl	SC	MC	F <sub>calculada</sub>
Regresión	1	2335137.71	2335137.71	27090.42
Error de regresión	28	2413.54	86.19	
Falta de ajuste	3	32268559.79	10756186.59	8.33
Error puro	25	32266146.25	1290645.85	

Con los datos del ABC

Cuadro 18. Datos para la exactitud del método analítico.

Concentración (µg/mL)	% recobro (Promedio)	C.V.
60	99.52	1.72
80	99.50	1.87
100	99.51	1.14
120	99.51	1.02
140	99.50	0.63

En cuanto a los intervalos de confianza para la pendiente  $m$  y para la ordenada al origen  $b$  se obtuvo:

$$I.C.M = 0.9949 \pm 0.0118$$

$$I.C.B = 0.1878 \pm 12.2936$$

Dado que el intervalo de confianza para la pendiente abarca a 1 y el intervalo de confianza para la ordenada al origen abarca al 0, se considera que el método carece de error sistemático consistente y constante.

El coeficiente de determinación  $r^2$  es mayor a 0.98 y el valor de  $F_{calculada}$  resultó mayor al valor de  $F_{tablas}$ , se dice entonces que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la recuperada por lo que se establece la exactitud del método.

### Límite de detección y límite de cuantificación

Bajo la hipótesis de que:

$$H_0: t_{calculada} < t_{tablas}$$

$$H_a: t_{calculada} > t_{tablas}$$

A partir de una solución stock que contenía ketorolaco, se realizaron series de diluciones para determinar la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificado con exactitud y precisión, para ello se valió de la *t de Student*.

Se calculó el valor de t de la siguiente forma:

$$t_{calculada} = \frac{V.T. - \bar{y}}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Cuadro 19. Valores experimentales para cada dilución.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio ABC m	Promedio ABC std	Promedio ABC (m/std)	DS ABC (m/std)	Promedio %Recobro
15	581.55	689.26	0.84	0.03	100.00
10	397.63	692.60	0.57	0.02	100.00
5	223.83	693.91	0.32	0.03	100.12
2.5	110.95	690.80	0.16	0.02	99.44

Considerando que el valor de  $t_{\text{tablas}}$  se reporta al 95% de confianza y  $n-1$  grados de libertad se realizó la comparación de este valor con respecto a lo obtenido experimentalmente, resultando que:

Cuadro 20. Criterio de aceptación y resultados para el LC.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	$ABC_{\text{teórica}}$	$ABC_{\text{promedio}}$	Criterio de aceptación	$ t_{\text{calculada}} $	$t_{\text{tablas}}$	Cumple
15	0.8299	0.8437	$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tablas}}$	1.0074	2.98	Si
10	0.5532	0.5739		2.0020		Sí
5	0.3223	0.3226		0.0301		Sí
2.5	0.1611	0.1602		0.0763		Sí

Al obtener un valor absoluto de  $t_{\text{calculada}}$  menor al de  $t_{\text{tablas}}$  se establece que la mínima cantidad de analito cuantificable con exactitud y precisión aceptable bajo las condiciones de operación establecidas en el método es de  $2.5 \mu\text{g/mL}$ .

### Repetibilidad

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple
C.V.	< 2%	1.4116	Sí

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la Comisión internacional de Armonización (International Conference on Harmonisation – ICH), la repetibilidad debe llevarse a cabo con un mínimo de seis determinaciones a una concentración del 100%.<sup>33</sup> Dado que el resultado cumple con el criterio de aceptación, se establece que el método es repetible.

## Precisión intermedia

Con el supuesto de que:

Analista:

H0:  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ . El método es reproducible por ambos analistas.

Ha:  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ . El método no es reproducible por ambos analistas.

Día:

H0:  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ . El método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Ha:  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ . El método no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Se utilizó el siguiente formato para realizar el análisis de varianza de los datos obtenidos durante la prueba.

Cuadro 22. Formato para el ANAdeVA de los datos de precisión intermedia.

Fuente de variación	GI	SC	MC	$F_{\text{calculada}}$
Analista	a-1	$SCA_i$	$MCA_i = SCA_i / a-1$	$FA_i = MCA_i / MCE_{k(ij)}$
Día	a(d-1)	$SCD_{j(i)}$	$MCD_{j(i)} = SCD_{j(i)} / [a(d-1)]$	$FD_{j(i)} = MCD_{j(i)} / MCE_{k(ij)}$
Error experimental	ad(k-1)	$SCE_{k(ij)}$	$MCE_{k(ij)} = SCE_{k(ij)} / [ad(k-1)]$	

Cuadro 23. ANAdeVA de los datos para la determinación de precisión intermedia.

Fuente	Producto Simbólico	gl	SC	CM	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{tablas}}$
ANALISTA	a-1	1	2.47	2.47	2.26	4.35
DIA	ad-a	2	3.33	1.66	1.52	3.49
ERROR	adk-ad	20	21.85	1.09		



Dado que durante el análisis de varianza se obtuvo que los valores calculados de  $F$  son menores a los de las  $F_{\text{tablas}}$  se establece por tanto que hay reproducibilidad del método y que se puede llevar a cabo por analistas diferentes y en distintos días por cada uno sin afectar los resultados.

### Estabilidad de la muestra analítica

Se eligieron tres condiciones de almacenamiento para estudiar su efecto sobre la estabilidad de la muestra analítica, considerando las condiciones a las cuales puede almacenarse la muestra analítica dentro del LIF antes de ser analizadas nuevamente. Se determinó el tiempo en que la muestra podría permanecer en almacenamiento dentro de cada condición y por tanto el tiempo en que puede ser conservada sin que se modifique la respuesta durante el análisis una vez se extraiga la muestra del refrigerador, congelador o anaquel.

El análisis de los datos se realizó bajo la hipótesis de que:

$H_0$ :  $F_{\text{calculada}} < F_{\text{tablas}}$ . No hay diferencias significativas entre los resultados de la muestra analítica y las diferentes condiciones de almacenamiento de la misma.

$H_a$ :  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$ . Hay diferencias significativas entre los resultados de la muestra analítica y las diferentes condiciones de almacenamiento de la misma.

Cuadro 24. Resultados de la prueba de estabilidad para ketorolaco.

Condición (°C)	Criterio de aceptación	$F_{\text{calculada}}$	Cumple
-20	$F_{\text{calculada}} \leq F_{\text{tablas}}$ ( $F_{\text{tablas}} = 5.14$ )	3.2195	SÍ
3		2.2125	SÍ
22		3.8857	SÍ

Debido a que el valor de  $F_{calculada}$  resultó ser menor al valor de  $F_{tablas}$  se infiere no hay diferencias significativas entre los resultados de la muestra analítica y las diferentes condiciones de almacenamiento de la misma.

### Robustez

Para saber si el método era robusto se estudió la respuesta de muestras analizadas con diferente marca de disolvente orgánico (metanol) y con diferente columna.

Características de las columnas:

- Columna cromatográfica 1: Thermo Scientific Hypersil Gold 4.6 mm ID x 250 mm (5 $\mu$ m)
- Columna 2: Agilent Eclipse XDB-C18. 4.6 mm ID x 250 mm (5 $\mu$ m) 80°A.

Marca de metanol:

- Honeywell
- J. T. Baker

Con base en estas condiciones, se planteó:

$H_0: t_{efecto} < t_{tablas}$ . No hay efecto significativo de la variable sobre la respuesta.

$H_a: t_{efecto} > t_{tablas}$ . Hay efecto significativo de la variable sobre la respuesta.

Los resultados obtenidos se expresan en el siguiente cuadro:

Cuadro 25. Resultados de la prueba de robustez del método.

Variable	Criterio de aceptación	$t_{calculada}$	Cumple
Disolvente	$t_{calculada} \leq t_{tablas}$ ( $t_{tablas} = 1.94$ )	0.14	Sí
Columna		0.01	Sí

Al encontrar que el valor para la  $t_{\text{efecto}}$  resultó menor al valor estipulado para  $t_{\text{tablas}}$  para cada una de las variables, se infiere entonces que ninguna de éstas tiene efecto significativo sobre la respuesta, y que por lo tanto es posible usar ambos disolventes y/o columnas, siempre y cuando los mismos conserven sus características originales.

### 8.3 Aplicación del método analítico en matrices sol-gel

Como se indica en el numeral 7.4 se prepararon muestras para ser analizadas en las condiciones que cada inciso menciona dando como resultando lo siguiente:

- Para las condiciones del inciso a y b se obtiene:

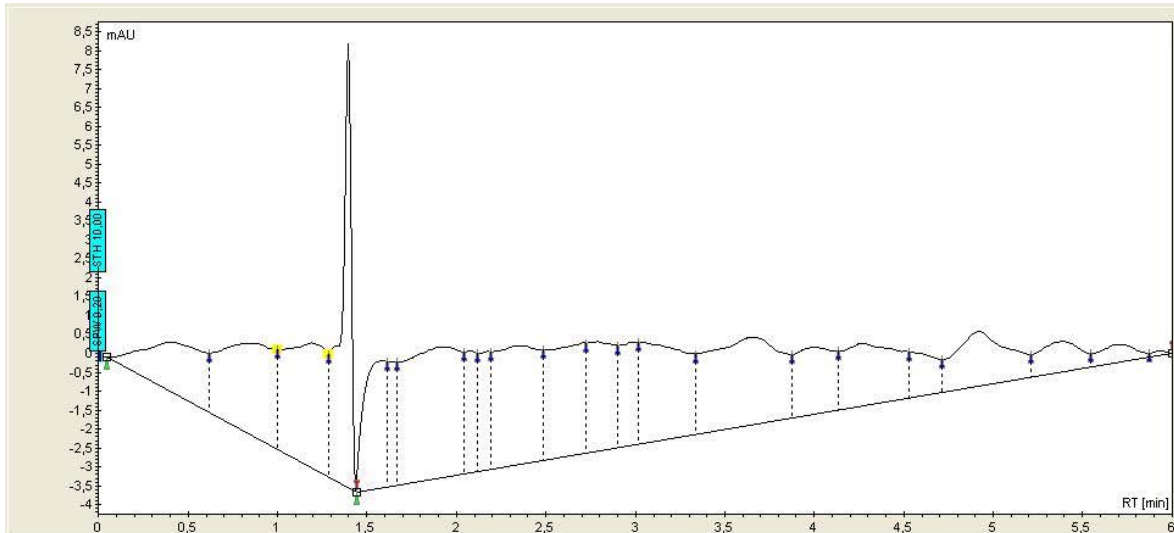


Figura 6. Cromatograma correspondiente a las condiciones del inciso a.

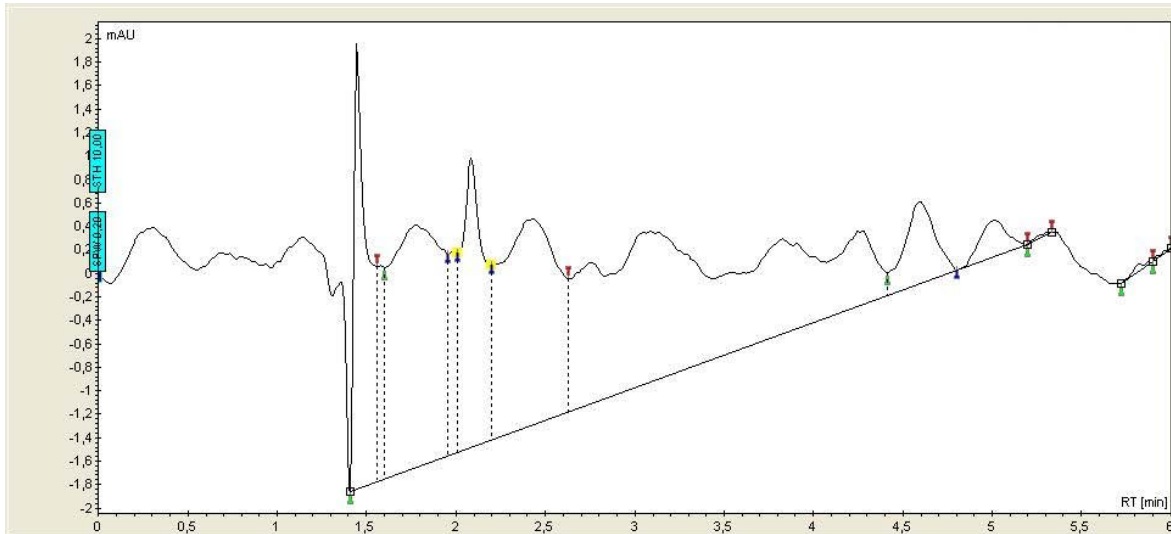


Figura 7. Cromatograma correspondiente a las condiciones del inciso b.

Bajo estas condiciones no hay liberación del fármaco por lo que no se observa respuesta cromatográfica.

- En el caso de las condiciones del inciso c, se obtiene el siguiente cromatograma:

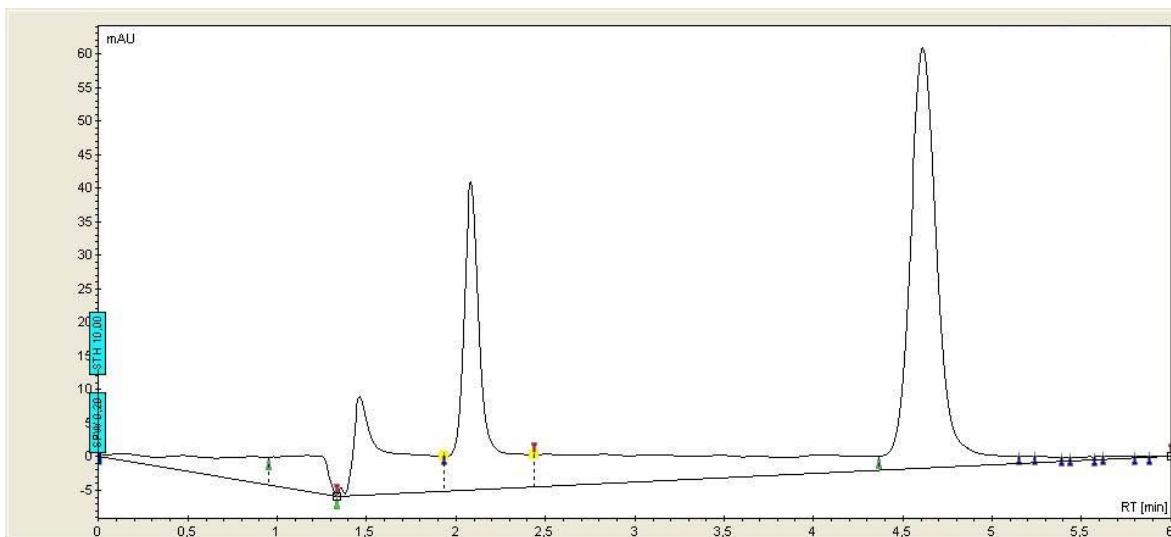


Figura 8. Cromatograma correspondiente al inciso c, a 40°C y usando en la primera dilución solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 y en la segunda para llevar a volumen, la solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 3. Con sonicación por 1h.

Las condiciones en que fue tratada la muestra permitieron la liberación del fármaco y su posterior análisis dado que se obtiene respuesta cromatográfica cuantificable. Dicha respuesta cromatográfica corresponde a una concentración de 9.82  $\mu\text{g/mL}$ .

## 9. CONCLUSIONES

El objetivo establecido fue alcanzado, ya que el método analítico de CLAR desarrollado y propuesto es óptimo para la cuantificación de ketorolaco contenido en matrices de sol-gel y que cumple con las especificaciones de validación establecidas.<sup>36,37,38,39,40</sup>

El método ha demostrado ser adecuado para la cuantificación de ketorolaco contenido ya en la matriz sol-gel y la matriz como tal no interfiere en la cuantificación del analito, por lo que se puede inferir a partir de estos resultados, que tanto la temperatura como el pH afectan la liberación del fármaco, ya que para las condiciones de estudio, que son a temperatura ambiente, es decir del laboratorio y con pH3 que confiere la solución amortiguadora, la cantidad de fármaco cuantificado es nula y a 40°C es posible la liberación de fármaco.

## REFERENCIAS

1. Gennaro A. Remington Farmacia. 20 ed. Tomo 1. La Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003.
2. Gismera M, Quintana M, Da Silva P. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución. Madrid: Ediciones UAM; 2009.
3. Scott Raymond P.W. Liquid chromatography for the analyst. New York: Marcel Dekker; 1994.
4. Scott Raymond P.W. Liquid Chromatography Column Theory. India: John Wiley & Sons; 1991.
5. García A, Yusá D. HPLC Fundamental. España: Editorial Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
6. Ahuja S, Rasmussen H. HPLC method development for pharmaceuticals. Vol. 8: Separation science and technology. Italia: Elsevier; 2007.
7. Weston A, Brown P. HPLC and CE: Principles and practice. EUA: Academic Press; 1997.
8. Harris Daniel C. Exploring chemical analysis. 4 ed. New York: Freeman and Company; 2009.
9. Kazakevich Y, Lohr R. HPLC for pharmaceutical scientists. USA: John Wiley & Sons; 2007.
10. Dong M. Modern HPLC for practicing scientists. EUA: Wiley-Interscience; 2006.
11. Sadek P. The HPLC solvent guide. EUA: John Wiley & Sons, 1996.
12. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4 ed. Great Britain: John Wiley & Sons; 2004.
13. Snyder LR, Kirkland JJ. Introduction to modern liquid chromatography. 2 ed. USA: John Wiley & Sons, 1979.
14. Rubinson K. A., Rubinson J. F. Análisis instrumental. Madrid: Prentice Hall; 2001.
15. Haider I. Validation standard operating process: A step-by-step guide for achieving compliance in the pharmaceutical, medical device and biotech industries. EUA: CRC Press; 2002.
16. Valcárcel M, Ríos A. La calidad en los laboratorios químicos. España: Reverté; 1992.
17. Sánchez R. J. Francisco, Mora G. J. L. Alfredo, Hernández A. V. Jesús. Validación de métodos analíticos. México: UNAM, FES Zaragoza; 2006.
18. Sierra Alonso I, Pérez Quintanilla D, Gómez Ruiz S, Morante Zarcero S. Análisis instrumental. España: Netbiblo; 2010.
19. Morante Zarcero S, Sierra I, del Hierro Morales I. Ciencias experimentales y tecnología: Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su

- aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos; 2007.
20. Harris D. Análisis químico cuantitativo. 3 ed. España: Reverté; 2007.
  21. NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, publicada en el Diario oficial de la Federación (Oct. 16, 2005).
  22. The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. (monografía en CD-ROM). Budavari S. 13 ed. New Jersey: Merck & Co.; 2001.
  23. Florez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología humana. 5a ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
  24. Martindale. Guía complete de consulta farmacoterapéutica. 34 ed. España: Pharmaceutical Press; 2005.
  25. Sturm JC, Canelo H, Nufiez-Vergara LJ, Squella JA. Voltammetric study of ketorolac and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals. Talanta [publicación periódica en línea] 1997 citado 2012 jun 08]; 44: [8 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
  26. Pérez-Urizar J, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G, Hong E, González C, Martínez J, et al. Analgesic efficacy and bioavailability of ketorolac in postoperative pain: a probability analysis. Arch Med Res [publicación periódica en línea] 2000 [citado 2012 jun 08]; 31: [6 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
  27. K Devarajan P, Gore S, Chavan S. HPTLC determination of ketorolac tromethamine. J Phar and Bio Anal [publicación periódica en línea] 2000 [citado 2012 jun 08]; 22: [5 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
  28. L Orlandini S, Fanali S, Furlanetto S, Marras AM, Pinzauti S. Micellar electrokinetic chromatography for the simultaneous determination of ketorolac tromethamine and its impurities multivariate optimization and validation. J Chrom A [publicación periódica en línea] 2004 [citado 2012 jun 08]; 1032: [11 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
  29. Fu L, Meng Q, Zhang H, Wang S, Yang K, Ni J. In situ synthesis of terbium-benzoic acid complex in sol-gel derived silica by a two-step sol-gel method. J Phy and Chem Sol [publicación periódica en línea] 2000 [citado 2012 jun 08]; 61: [5 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
  30. Meunier CF, Dandoy P, Su Bao-Lian. Encapsulation of cells within silica matrixes: towards a new advance in the conception of living hybrid materials. J Col Int Sci [publicación periódica en línea] 2010 [citado 2012 jun 08]; 342: [15 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>



31. Starosvetsky J, Starosvetsky E, Armon R. Electrophoretic applications of sol-gel matrices. *Cer Int* [publicación periódica en línea] 2007 may 7 [citado 2012 jun 08]; 34: [6 pantallas]. Se consigue en:  
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article.html>
32. Aulton ME. *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. 2 ed. España: Elsevier- Churchill Livingstone; 2004.
33. *Advances in Chromatography*. Vol 50: United States of America: CRC Press; 2012.
34. SSA.NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos, publicada en el Diario oficial de la Federación el 20 de agosto de 2003.
35. Center of Drug Evaluation and Research. *Guidance of validation of Chromatographic Methods*. CDER, 1994.
36. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. *Guía de validación de métodos analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; 2002.
37. Text of validation analytical procedures Q2(R1). In *International Conference on Harmonization of Technical (ICH)*; 1996; USA.
38. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Décima edición, editor. México: Secretaría de Salud Pública; 2010.
39. Pharmacopoeia Convention, Inc. *United States Pharmacopoeia 30/National Formulary 25* Rockville, M.D.: Pharmacopoeia Convention, Inc.; 2007.
40. Pharmacopoeia Convention, Inc. *United States Pharmacopoeia 36/National Formulary 31* Rockville, M.D.: Pharmacopoeia Convention, Inc.; 2013.

## APÉNDICE

### GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Constante de distribución ( $K_D$ )** es la repartición que se hace del soluto entre ambas fases, la estacionaria y la móvil.<sup>2</sup>

**Eficiencia ( $N$ )** es un parámetro específico de la columna y se define como  $N$  o el número de platos teóricos.<sup>2</sup>

**Factor de capacidad o retención ( $k'$ )** describe la cantidad de soluto que se distribuye en cada fase.<sup>2</sup>

**Línea base** es la señal de la fase móvil y algunas veces de impurezas que transmite el detector de manera constante.<sup>2</sup>

**Resolución** es la medida de la capacidad que tiene una columna para separar a un analito de otro de modo que evidencie la mitad de la distancia entre sus centros (picos).<sup>2, 8, 10</sup>

**Respuesta** es la señal emitida que es proporcional a la variación de la cantidad de masa del soluto o analito.<sup>2</sup>

**Ruido de fondo** es la alteración de la línea base que no tiene relación con los componentes de la muestra.<sup>2</sup>

**Selectividad** se expresa como la diferencia que existe entre los tiempos o los volúmenes de retención de dos picos resultantes, comprobando su separación.<sup>8</sup>

**Sensibilidad** se define como la intensidad de la señal cuando se detectan cambios en la cantidad de masa del soluto o analito.<sup>2</sup>

**Tiempo muerto ( $t_M$ )** es aquel que transcurre entre el momento de la inyección y el momento en que sale de la columna una sustancia que no reacciona con la fase estacionaria y que por ende corre con la fase móvil.<sup>2</sup>

**Tiempo de retención ( $t_R$ )** es el tiempo promedio que tardan moléculas iguales en pasar por el sistema.<sup>2</sup>

**Tiempo de retención corregido ( $t_S$ )** es el tiempo en que una sustancia se mantiene en la fase estacionaria.<sup>2</sup>

**Volumen muerto ( $V_M$ )** entonces, se refiere al volumen de la fase móvil que sí se queda en la fase estacionaria.<sup>2</sup>

**Volumen de retención ( $V_R$ )** es el volumen de fase móvil que debe atravesar la columna para que pueda eluir una sustancia dada.<sup>2</sup>