

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método analítico para la  
cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema,  
por HPLC y análisis de productos comercializados en el  
Perú**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Henry Paúl Capcha Espinoza  
Giovanna Paola Llanos Rebaza

ASESOR

Norma Angélica Carlos Casas

Lima – Perú

2007

**A DIOS:**

Por su infinita misericordia, por darnos la vida, cuidarnos y hacer posible la realización de este trabajo y poder cumplir nuestros anhelos y la de nuestros queridos padres.

A Él con profundo agradecimiento y amor.

**GIOVANNA y HENRY**

Nuestro sincero agradecimiento a la **Q.F. Norma Carlos Casas** por su generosa dirección, asesoramiento y valiosos consejos en la realización del presente trabajo.

A mis padres: **ARMANDO Y ESPERANZA**

Que me dieron la vida y han estado siempre conmigo en todo momento apoyándome y brindándome todo su amor, gracias por darme una carrera. Los quiero mucho y este trabajo es por ustedes.

A mi hermano: **WILDER**

Gracias por estar conmigo, por tus consejos y tu gran apoyo, te quiero mucho.

A mis sobrinos: **MARÍA FERNANDA, JOSÉ ARMANDO, CARLOS DANIEL**

Por ser estímulo para mi superación y poder brindarles lo mejor, los quiero mucho pequeñitos.

Doy gracias toda mi familia y en especial a mis queridos abuelitos **FLAVIO y JULIA**, y a mi querida tía **MARGARITA** por brindarme su apoyo y consejos en cada momento de mi vida, los quiero mucho.

**GIOVANNA**

Doy gracias a mis padres **CONCEPCIÓN y YOLANDA**

Por su apoyo, confianza y consejos, quienes con su dedicación y sacrificio hicieron posible la culminación de mis estudios.

De manera muy especial a ti mamá, que a pesar de que no estas aquí ahora en estos momentos conmigo, sé que tu alma si lo está y éste era uno de tus sueños, te dedico con todo mi amor este trabajo. Siempre te llevo en mi corazón.

A mis hermanos **JORGE, FRANKLIN, GLADYS, ALÁN, EDUARDO, JHONE, JUAN**

Por su apoyo constante y como estímulo a la superación y progreso para lograr las mejores metas.

Mi gratitud a toda mi familia por su incondicionalidad, aliento y generosidad.

**HENRY**

# AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Farmacéutico S.J. Roxfarma S.A., por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo.

A nuestro gran y querido amigo ELVIS, que estuvo siempre a nuestro lado brindándonos todo su apoyo desinteresado, este trabajo es tanto tuyo como nuestro, lo logramos amigo.

A todos nuestros amigos de trabajo que siempre estuvieron dándonos su apoyo y que hicieron posible la culminación del presente trabajo, en especial a Mariela, Fernando, Dra. Maribel, Dra. Argentina; gracias por todo.

El presente trabajo de Investigación fue sustentado ante el Jurado Evaluador y Calificador nombrado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, conformado por:

Presidente: Q.F. Alfredo Castillo Calle

Miembro: Mg. Delia Whu Whu

Miembro: Dr. Felix Saavedra Nizama

Miembro: Q.F. Armando Rivero Laverde

A quienes expresamos nuestro más sincero agradecimiento por sus valiosos consejos brindados oportunamente.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN – PALABRAS CLAVE

## SUMMARY – KEY WORDS

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. GENERALIDADES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Calidad en la Industria Farmacéutica.....	3
2.1.1 Calidad.....	3
2.1.2 Administración de la Calidad en la Industria Farmacéutica.....	3
2.1.3 Garantía de la Calidad.....	4
2.1.3.1 Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).....	4
2.1.3.2 Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).....	5
2.2 Validación.....	7
2.2.1 Concepto.....	7
2.2.2 Importancia.....	7
2.2.3 Tipos de validación.....	7
2.2.4 Validación de Métodos Analíticos.....	8
a) Importancia.....	9
b) Inicio de una Validación.....	10
c) Plan Maestro de Validación.....	10
d) Documentos de la Validación.....	11
e) Protocolo de Validación.....	12
f) Certificado de Validación.....	12
2.2.5 Desarrollo de un Método Analítico.....	13
2.2.6 Parámetros de Validación de Métodos Analíticos.....	14
2.2.7 Datos requeridos para la Validación de un Método Analítico.....	20
2.3 Análisis Instrumental.....	21
2.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Presión.....	21
2.4. Propiedades Físicas, Químicas y Farmacológicas de los Analitos.....	26
2.4.1 Clotrimazol.....	26
2.4.2 Dexametasona Acetato.....	27
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
3.1 Desarrollo del método analítico .....	29
A. Elección del tipo de cromatografía líquida a utilizar.....	29
B. Elección del detector.....	29

C. Elección de la fase móvil y la fase estacionaria.....	29
D. Técnica analítica desarrollada.....	30
3.2 Validación del método analítico.....	33
3.2.1 Protocolo de Validación.....	33
3.2.2 Desarrollo de los Parámetros de validación.....	36
A. Selectividad.....	36
B. Linealidad.....	44
C. Exactitud.....	47
D. Precisión.....	50
E. Robustez.....	52
3.2.3 Análisis Comparativo.....	52
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Adecuación del Sistema Cromatográfico.....	53
4.2 Selectividad.....	55
4.3 Linealidad.....	56
Analito Clotrimazol.....	56
Analito Dexametasona Acetato.....	63
4.4 Exactitud.....	70
Analito Clotrimazol.....	70
Analito Dexametasona Acetato.....	73
4.5 Precisión.....	77
Analito Clotrimazol.....	77
Analito Dexametasona Acetato.....	81
4.5.1 Repetibilidad.....	85
Analito Clotrimazol.....	85
Analito Dexametasona Acetato.....	88
4.5.2 Precisión intermedia.....	91
Analito Clotrimazol.....	91
Analito Dexametasona Acetato.....	92
4.6 Robustez.....	93
Analito Clotrimazol.....	93
Analito Dexametasona Acetato.....	94
4.7 Análisis Comparativo con otros productos.....	96
<b>V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>100</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>108</b>
<b>VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>112</b>

## RESUMEN

El análisis por HPLC, de productos farmacéuticos son una necesidad y de uso rutinario. Esta técnica evita errores que conllevan a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que la dosis prescrita llegue al paciente en la cantidad apropiada. En la rutina de laboratorio reduce repeticiones analíticas y facilita mayor rapidez en los análisis que adecuadamente validadas dan confiabilidad a los resultados. Las farmacopeas vigentes contemplan en la mayoría de los casos análisis por HPLC para monofármacos o asociaciones de dos o más principios activos por separado lo cual demanda un mayor tiempo de análisis y un mayor costo. La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. La validación de un método analítico es un requisito necesario para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y así asegurar la calidad del medicamento. El presente trabajo plantea el uso de un solo método analítico por HPLC para un producto farmacéutico en presentación de Crema que contiene en su formulación dos principios activos: Clotrimazol y Dexametasona Acetato, los cuales se determinan en un solo análisis, el cual seguidamente fue validado para determinar así la aplicabilidad del método. En la validación del método analítico se evaluaron una serie de parámetros que están indicados en obras oficiales, como son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y robustez. Posteriormente, se elaboró el Protocolo de validación del método de análisis, para lo cual se contó con el diseño experimental y los procedimientos estadísticos, concluyéndose así que el método analítico propuesto es selectivo, lineal, preciso, reproducible y exacto; y de esta manera comprobamos la validez del método analítico desarrollado.

**PALABRAS CLAVE:** Validación, Método Analítico, Cromatografía Líquida de Alta Performance, Dexametasona Acetato, Clotrimazol.

## SUMMARY

The analysis for HPLC of pharmaceutical products is a necessity and of routine use. This technique avoids mistakes that make risk situations to user, guaranteeing that the prescribed dose arrives at the patient in the appropriate amount. In the laboratory routine it reduces analytical repetitions and it facilitates greater rapidity in the analysis that suitably validated give trustworthiness to the results. The effective pharmacopeias contemplate in the most of the cases analysis for HPLC, for monodrugs o associations of two or more actives principles which demands a greater time of analysis and greater cost. The validation is the process established for the obtaining of documented and demonstrative tests that an analysis method is the sufficiently trustworthy and reproducible for produce the result anticipated inside the defined intervals. The validation of an analytical method is a requirement necessary to fulfill the Good Practices Manufacture (BPM) and thus to assure the quality of medicament. The present work shows the use of a single analytical method for HPLC for a pharmaceutical product in cream presentation that contains in its formulation two actives principles: Clotrimazole and Dexamethasone acetate, which are determined in a single analysis, which after was validated to determine thus the applicability of the method. In the validation of analytical method a series of parameters was evaluated that are indicated in official works, as they are: selectivity, linearity, precision, exactitude and robustness. Later, the Protocol of Validation of analysis method was elaborated, for which it counted on the experimental design and the statistical procedures, concluding so the proposed analytical method is selective, linear, precise, reproducible and exact; and this way we verified the validity of developed analytical method.

**KEY WORDS:** Validation, Analytical Method, Chromatography Liquid of High Performance, Dexamethasone Acetate, Clotrimazole.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El análisis por HPLC, de productos farmacéuticos son una necesidad y de uso rutinario. Esta técnica evita errores que conllevan a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que la dosis prescrita llegue al paciente en la cantidad apropiada.

En la rutina de laboratorio reduce repeticiones analíticas y facilita mayor rapidez en los análisis que adecuadamente validadas dan confiabilidad a los resultados. La validación de métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

La validación en si proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer.<sup>7</sup>

Para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) la validación es un requisito indispensable que esta establecido por las agencias reguladoras y libros oficiales. La validación es parte integral del desarrollo de un método de análisis, puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegurar las propiedades de calidad de un producto terminado. La calidad de los resultados analíticos debe estar amparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos.

Conscientes de la importancia del tema, entidades de carácter oficial como la FDA, OMS, USP, ICH además de las farmacopeas europeas consignan a la ineludible necesidad de la validación en procesos analíticos.

Hoy en día la validación es un tema que muestra un interés creciente en la Industria Farmacéutica debido al mayor énfasis que a puesto la industria en años recientes en los temas de Aseguramiento de la Calidad y mejora de la productividad. La validación, por tanto, forma parte importante en un programa de Aseguramiento de la Calidad y es fundamental para una eficiente operación de producción.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

#### 2.1.1 CALIDAD

Según la International Organization for Standardization (ISO):

Es el conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio que le confiere la aptitud de satisfacer las necesidades y las expectativas del cliente. (ISO 8402-1986).

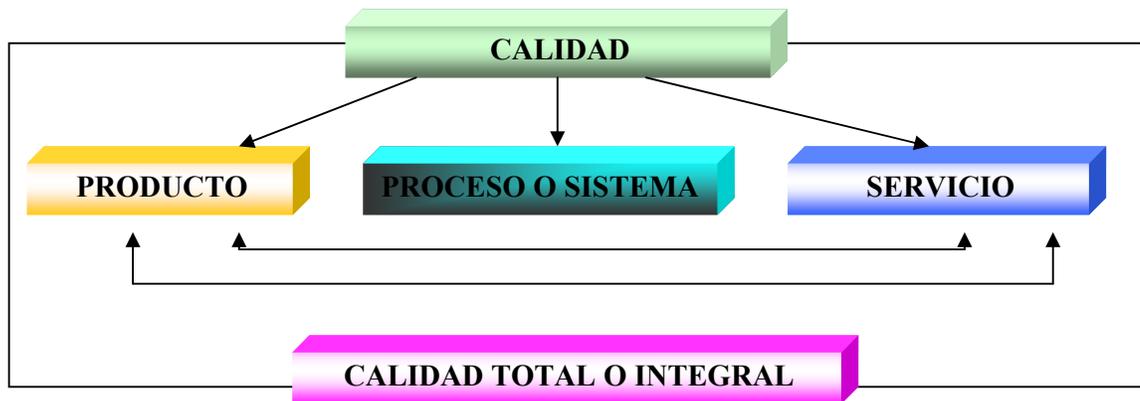


GRÁFICO N° 1 – Integración de calidad (ISO 8402-1986)

#### 2.1.2 ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

En la Industria Farmacéutica, la administración de la calidad se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la Política de la Calidad es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo.

Los elementos básicos de la administración de la calidad son los siguientes:

- a) Sistema de Calidad que comprende la estructura, procedimientos procesos y recursos.

- b) Garantía de la Calidad, concepto que involucra las medidas que se adoptan para asegurar que el producto satisface determinadas condiciones de calidad.

Los conceptos de Garantía de la Calidad, Buenas Prácticas de Manufactura (GMP), Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Control de Calidad, constituyen aspectos de la administración de la calidad y se relacionan entre sí. <sup>(21)</sup>

### **2.1.3 GARANTÍA DE LA CALIDAD**

Es el conjunto de medidas que deben adoptarse con el fin de asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por lo tanto, Garantía de la Calidad incorpora las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y otros conceptos; incluyendo aquellos que van más allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto. <sup>(21)</sup>

#### **2.1.3.1 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (GMP)**

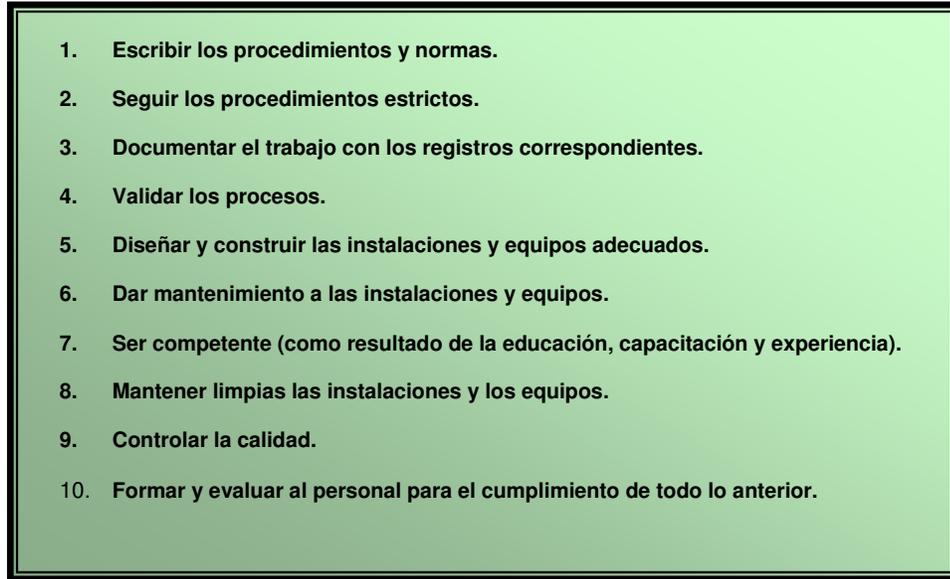
##### **a) Marco Legal**

- Ley general de salud: Ley N° 26842.
- Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Afines: D.S. N° 010-97-S.A.
- Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos: R.M. N° 055-99-SA/DM del 08 de Febrero de 1999.
- Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Cosméticos: R.M. N° 518-99-SA/DM del 20 de Octubre de 1999.

##### **b) Concepto**

Son el conjunto de normas que tanto la Industria Farmacéutica como la Industria Cosmética ponen en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrican, debiendo para ello tomar las medidas necesarias a través de procesos estandarizados.

Las Buenas Prácticas de Manufactura establecen que todas las operaciones, procesos, métodos o técnicas deben ser reguladas o estrictas y deben ser cumplidas y supervisadas por profesionales de diverso grado de titulación, con la suficiente responsabilidad.

- 
1. **Escribir los procedimientos y normas.**
  2. **Seguir los procedimientos estrictos.**
  3. **Documentar el trabajo con los registros correspondientes.**
  4. **Validar los procesos.**
  5. **Diseñar y construir las instalaciones y equipos adecuados.**
  6. **Dar mantenimiento a las instalaciones y equipos.**
  7. **Ser competente (como resultado de la educación, capacitación y experiencia).**
  8. **Mantener limpias las instalaciones y los equipos.**
  9. **Controlar la calidad.**
  10. **Formar y evaluar al personal para el cumplimiento de todo lo anterior.**

**GRÁFICO N° 2** – Los Diez Mandamientos de las GMP

### **2.1.3.2 BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (GLP)**

Son normas y procedimientos de operaciones oficiales considerados como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar sobre la seguridad de un producto. <sup>(2)</sup>

Las Buenas Prácticas de Laboratorio, pretenden asegurar la calidad y validez de los datos de los análisis. Además, facilita el comportamiento adecuado del estudio, promueve su exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos.

#### **a) Control de Calidad**

El Control de Calidad es parte de las Buenas Prácticas de Manufactura y comprende el muestreo, especificaciones y ensayos como también a procedimientos de

organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita liberación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria. El control de calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, si no que se debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto.

Los métodos de ensayo deben ser validados. <sup>(21)</sup>

### **b) Normas Correctas del Laboratorio Analítico**

Para validar un método analítico, se requiere en primer lugar, un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan.

La garantía de la calidad de los resultados obtenidos en un laboratorio analítico requiere actuar mediante procedimientos correctos, previamente establecidos, que se definen como normas correctas del laboratorio analítico.

Esta norma incluye, entre otros, los siguientes aspectos:

- Buena organización funcional.
- Personal suficiente y adiestrado.
- Instalaciones adecuadas y suficientes.
- Métodos descritos, disponibles, actualizados y aprobados.
- Equipos y aparatos apropiados, calificados y en buen estado de funcionamiento.
- Procedimientos apropiados para la toma de muestra.
- Utilización de reactivos apropiados y soluciones valoradas idóneas.
- Utilización del material auxiliar (vidrio, etc.) apropiado y en perfectas condiciones para su uso.
- Utilización de patrones y muestras de referencias correctas.
- Verificación – supervisión de los resultados obtenidos y que los registros de los análisis efectuados sean auditables.
- Adecuada información y comunicación de los resultados obtenidos.

- Higiene y seguridad.
- Autoinspección. <sup>(2)(3)</sup>

## **2.2 VALIDACIÓN**

### **2.2.1 CONCEPTO**

La validación se define como el establecimiento de pruebas documentadas que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios de establecimientos (como aire, agua, vapor) y procesos (como el de fabricación, limpieza esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.). <sup>(17)</sup>

### **2.2.2 IMPORTANCIA**

- Asegura que el producto elaborado cumple en forma consistente y repetitiva con sus especificaciones y atributos de calidad.
- Ayuda a cumplir los objetivos de productividad establecidos.
- Permite disminuir los costos de proceso. <sup>(22)</sup>

### **2.2.3 TIPOS DE VALIDACIÓN**

#### **a) Validación Prospectiva**

Es la que se realiza sobre un proceso antes de que sea implementado, el cual puede darse para la fabricación de nuevos productos, cuando hay cambios fundamentales en un proceso o cuando se incorpora un equipo o sistema para uso.

Es la validación que comúnmente se elige porque nos asegura el éxito del proceso antes de su implementación, además que se pueden elegir y controlar las variables a ensayar en el proceso.

#### **b) Validación Retrospectiva**

Es la que se realiza sobre el análisis de ensayos ya elaborados, en la cual se revisa y analiza con métodos estadísticos los parámetros físicos y los resultados analíticos de

por lo menos 10 a 30 consecutivos, no debiendo existir cambios en la formulación, modificaciones sustanciales de equipo o instalaciones, ni cambios en el método de ensayo. El proceso se considera válido si al menos el 95% de los resultados analíticos cumplen con las especificaciones internas y al menos el 90% de los controles de proceso no tienen variaciones significativas. <sup>(18) (22)</sup>

### **c) Validación Simultánea**

Es la que se produce cuando es imposible completar la validación antes de la puesta en el mercado del producto farmacéutico. Se da si sólo se ha producido un limitado número de lotes o si los lotes no se producen frecuentemente o talvés si la fabricación se ha producido con modificaciones y las pruebas demuestran que los parámetros estén conformes. En este caso, se incrementan las pruebas del número de análisis. <sup>(22)</sup>

### **d) Revalidación**

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivo o material empleado originalmente, y se realiza en periodos establecidos. <sup>(2) (22)</sup>

## **2.2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. <sup>(2) (3)</sup>

Con la validación de métodos se demuestra que un método analítico es adecuado para la aplicación previa. Para demostrar que los resultados para una aplicación especial caen dentro de una desviación de medida definida, es preciso comprobar el método. <sup>(14)</sup>

El laboratorio deberá validar:

- Métodos no estandarizados.
- Métodos no diseñados o desarrollados internamente.

- Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados.
- Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y, si es necesario, se debe efectuar una nueva validación.

La validación de métodos analíticos incluye:

- La especificación de los requisitos.
- La determinación de las características de los métodos.
- Una verificación de que se pueden cumplir los requisitos al usar el método.
- Una declaración de su validez. <sup>(18)</sup>

La técnica para determinar el funcionamiento de un método puede ser una de las siguientes o su combinación:

- Calibración con el uso de normas o materiales de referencia.
- Comparación de resultados obtenidos por otro(s) método(s).
- Comparación entre laboratorios.
- Evaluación sistémica de los factores que influyen en los resultados.
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados basados en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

#### **a) IMPORTANCIA**

- Se demuestra que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, ya que la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Se trabaja con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.

- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales (GMP), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto. <sup>(2) (3) (29)</sup>

## **b) INICIO DE UNA VALIDACIÓN**

La validación empieza en la planificación, formalizada usualmente a través de un plan maestro de validación (PMV).

- Esta planificación incluye prever la realización de todas las instancias de calibración, mantenimiento, capacitación, desarrollo de documentos, etc., que corresponda, antes de comenzar con las actividades de validación propiamente dichas. <sup>(18) (22) (29)</sup>

## **c) PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN (PMV)**

Desarrollo planificado y sistemático de todas las actividades relacionadas que atañe al establecimiento en su totalidad y en el que se describe que equipos, sistemas, métodos y procedimientos habrán de validarse y cuando lo serán. En el documento deberá de especificarse la forma de presentación necesaria para cada documento de validación (IQ, OQ, PQ en el caso de equipos y sistemas; validación de procesos; validación de métodos analíticos) e indicar que tipo de información deberá reflejarse en cada momento.

El plan maestro de validación indicará también porque y cuando se efectuarán las revalidaciones, ya sea después de hacerse modificaciones o cambios en la ubicación de equipos o sistemas, cambios de los procesos o equipos usados en la fabricación, o cambios en los métodos de valoración o equipos utilizados en las pruebas.

El orden en que cada parte del establecimiento será validada habrá de especificarse en el plan maestro de validación. <sup>(19) (22)</sup>

### **c1) Contenido**

#### **1. Objetivos**

2. Alcance

3. Responsabilidades

4. Cronograma de trabajo

- Actividad y/o proceso a realizar

- Tipo de validación

- Programación anual

- Fases

Identificación de las necesidades

Elaboración de los protocolos de validación

Realización de las pruebas analíticas

Recopilación de datos

Análisis de los resultados

Conclusiones <sup>(22)</sup>

**d) DOCUMENTOS DE LA VALIDACIÓN**

La documentación es una parte esencial de la validación ya que interviene en todo el proceso. El siguiente esquema resume las fases de que consta una validación. <sup>(2) (3)</sup>



**GRÁFICO N° 3** – Fases de una validación

#### **e) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

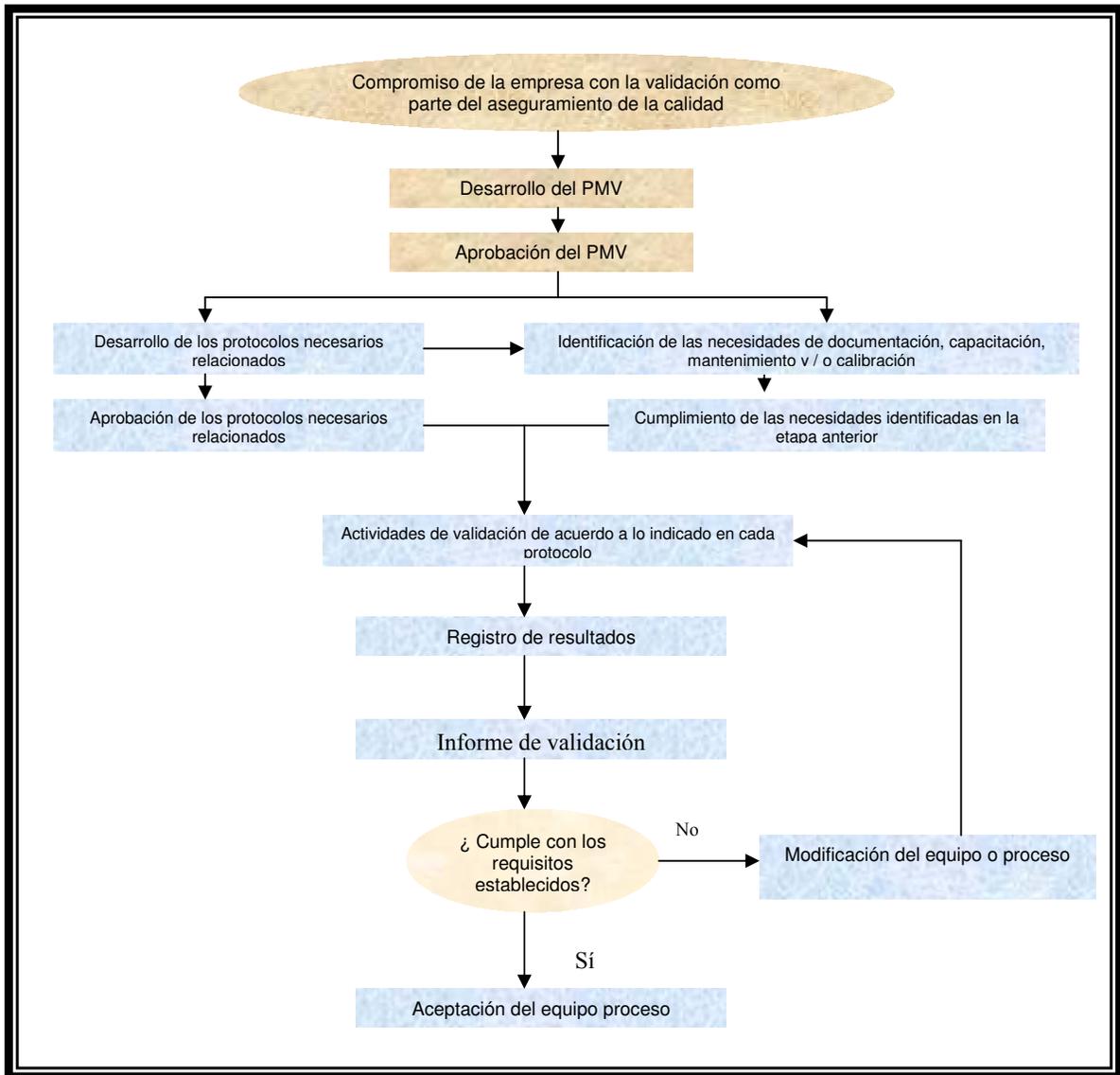
Un protocolo es un conjunto de registros que permiten documentar el proceso de validación, en el se describen los detalles de un estudio integral planificado para investigar el funcionamiento uniforme de un nuevo sistema/equipo, un nuevo procedimiento o la aceptabilidad de un nuevo proceso antes de ejecutarlo. Los protocolos incluyen antecedentes importantes, explican el fundamento lógico y el objetivo del estudio, ofrecen una descripción completa de los procedimientos que habrán de seguirse, fija los parámetros que habrán de medirse, describen como se analizan los resultados y facilita los criterios de aceptación determinados con anterioridad para extraer las conclusiones. Los estudios de validación, los estudios de estabilidad y los estudios clínicos son ejemplos de protocolos escritos para la industria farmacéutica.

Los protocolos de validación son importantes para asegurar que se recaben pruebas documentadas a fin de demostrar que un equipo, un sistema, un proceso o un método analítico se desempeñan uniformemente en conformidad con el nivel especificado. <sup>(17)</sup>

#### **f) CERTIFICADO DE VALIDACIÓN**

El certificado de validación o documento formal de aprobación que emite el laboratorio con los resultados obtenidos para cada parámetro, debe ser firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe.

Los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante todo el tiempo de vida del producto. <sup>(2) (3) (4)</sup>



**GRÁFICO N° 4** – Flujograma de conceptos relacionados con el PMV

## 2.2.5 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en si mismo. No obstante el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

### a) Características de Practicabilidad

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la

muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

#### **b) Características de Idoneidad**

La puesta a punto del método analítico incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

#### **c) Características de Fiabilidad**

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. <sup>(2) (3)</sup>

### **2.2.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en validación son:

#### **a) SELECTIVIDAD**

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de formas inequívocas, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el término ESPECIFICIDAD se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado.

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la

respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

### **b) LINEALIDAD Y RANGO**

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

El RANGO se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.

### **c) PRECISIÓN**

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más – menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los

resultados de ensayo no pueden ser siempre controlados (analistas, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

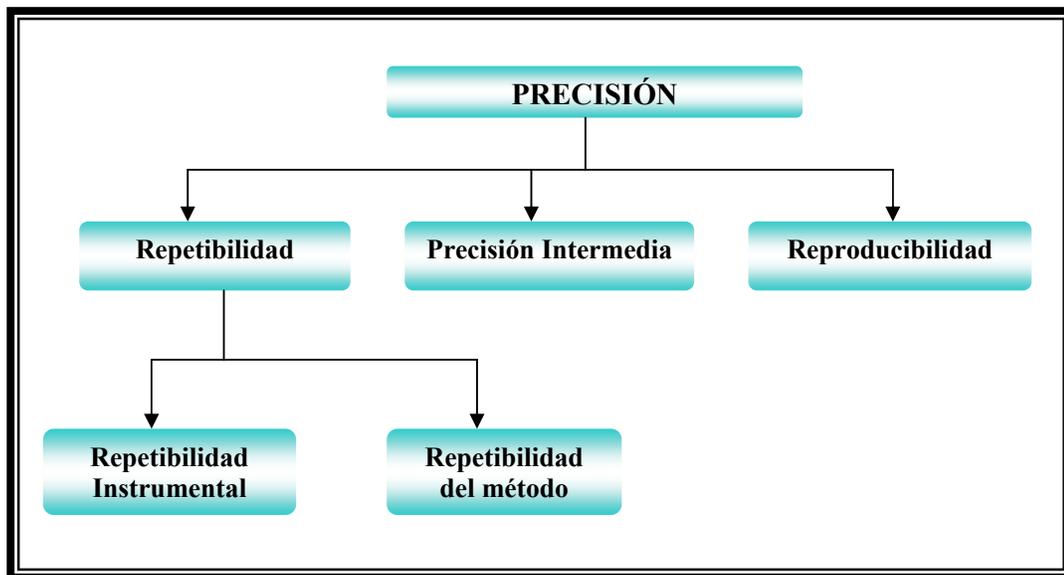


GRÁFICO N° 5 – Precisión y sus diferentes tipos de estudio

### **c.1) Repetibilidad**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.

### **c.2) Precisión Intermedia**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc.

No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente si no que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

### **c.3) Reproducibilidad**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.

La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método. <sup>(2) (3) (28)</sup>

#### **- Factores de variación en el estudio de la precisión.**

<b>Factores</b>	<b>Repetibilidad</b>	<b>Precisión Intermedia</b>	<b>Reproducibilidad</b>
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores (por ejemplo: Columnas, Reactivos, condiciones ambientales)	Igual	Diferente	Diferente
Laboratorio	Igual	Igual	Igual

#### **d) EXACTITUD**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero.

Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión. <sup>(2) (3) (28)</sup>



**GRÁFICO N° 6** – Exactitud y sus diferentes tipos de estudio

#### **e) LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

##### **e1) Límite de Detección (LD)**

Se entiende por límite de detección la mínima cantidad del analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

El límite de detección es por tanto un término sólo cualitativo.

En ambos términos se encuentra un rango de concentraciones en las que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. <sup>(2) (3) (28)</sup>

## **e2) Límite de Cuantificación (LC)**

Se entiende por límite de cuantificación de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

El límite de cuantificación es por lo tanto un término cuantitativo.

## **f) ROBUSTEZ**

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad “estabilidad” durante su empleo en rutina.

Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptible de producirse durante su utilización. <sup>(2)</sup>

<sup>(3)</sup> (28)

## **g) IDONEIDAD DEL SISTEMA**

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) consiste en un conjunto de ensayos que permitan comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización.

En la práctica, podrían equiparse a una calificación del proceso analítico (PQ) o una “revalidación en continuo” ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo, el conjunto del sistema continúa siendo “validado” para el propósito para el que fue concebido. <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup> (28)

## 2.2.7 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Los métodos analíticos descritos varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

**Categoría I.** Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos.

**Categoría II.** Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos de límites.

**Categoría III.** Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de principios activos) de un producto farmacéutico.

**Categoría IV.** Ensayo de identificación de producto farmacéutico.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica.

En la tabla se indica los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías. <sup>(28)</sup>

Características de desempeño Analítico	Ensayos Categoría I	Ensayos Categoría II		Ensayos Categoría III	Ensayos Categoría IV
		Cuantificación	Prueba de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Sí	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No

Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

\* puede requerirse, mientras dependa de la naturaleza de la prueba específica.

## **2.3 ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

### **2.3.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN**

#### **a) Conceptos Generales**

La cromatografía se ha desarrollado para llegar a ser el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas. <sup>(26)</sup>

La HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Presión ha tenido una creciente difusión desde comienzos del 70 y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea este dedicado a la investigación científica básica o aplicada, industrial, biológica o bromatológica. Además, puede emplearse para la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas.

Según define la IUPAC, “La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede ser extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

El propósito de la cromatografía es “separar y cuantificar” analitos en mezclas (por lo general en matrices complejas).

Se basa en la partición de solutos entre dos fases: La fase estacionaria y la fase móvil, la separación ocurre por migración de los analitos en mezclas a diferentes velocidades.

La velocidad de migración está gobernada por diferentes interacciones entre un soluto (conducido por un líquido e movimiento) y el absorbente (sólido o líquido).

La cromatografía es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, en el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad.

En el caso más simple un cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Un gráfico, el cromatograma que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elución)
- Un eluido o eluato, el fluido proveniente de la columna que de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados.

(24)

## **b) Calibración del Equipo HPLC**

Actividad destinada a demostrar que un instrumento de medida produce resultados dentro de los límites de error establecido y comparable a los obtenidos con un sistema de referencia en un rango apropiado de medidas.

La calibración forma parte de la calificación, se aplica a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto en el ámbito modular como del sistema completo.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

- Calificación de la Instalación (IQ)
- Calificación de la Operación (OQ)
- Calificación del Desempeño (PQ)
- Calificación del Mantenimiento (MQ)
- Control de cambios

### **• Calificación de la Instalación (IQ)**

Una vez aprobado el diseño en la calificación del diseño (DQ), se procede a la instalación del sistema. El objetivo de la calificación de la instalación (IQ) es el de verificar las características del equipo y de su instalación, en referencia a las especificaciones técnicas, mediante la realización de una inspección física del diseño.

Debe contener la documentación completa de la instalación con las características técnicas detalladas del equipo y componentes, materiales de construcción, lista de recambios, certificados de materiales y certificados de calibración de los instrumentos del campo.

Se aplica tanto a configuraciones modulares (módulo a módulo) como a sistemas integrados (todo el sistema).

Una vez realizadas las etapas anteriores se redactará el informe de calificación de la instalación (IQ). Si se detectase algún punto posible de mejora (crítico o no crítico)

deberá constar en el informe y en el caso de detectarse algún punto crítico, éste deberá solventarse antes de pasar a la siguiente fase.

• **Calificación de la Operación (OQ)**

El objetivo de esta fase es la verificación del equipo y componentes funcionen adecuadamente (operacionabilidad).

En el protocolo de la calificación operacional se describirán los ensayos a realizar para comprobar la operacionabilidad de los componentes del equipo, por una parte en funcionamiento normal y otra parte en funcionamiento anómalo (comprobación de alarmas). Así mismo y para cada ensayo se definirán los límites de aceptación.

También deberá comprobarse la existencia e idoneidad de los programas indispensables para el correcto funcionamiento del sistema (sino existiesen deberán redactarse): programas de: mantenimiento, control de cambios, control de la documentación, calibración, formación del personal y asegurar que cada uno de los módulos que componen el sistema cromatográfico cumplan las especificaciones de exactitud, precisión, linealidad establecidas.

De esta manera, durante la fase de validación prospectiva de detalle, debe recopilarse una serie de documentación básica indispensable para el correcto funcionamiento del sistema y para iniciar la siguiente fase: La validación del equipo (PQ).

Finalmente se escribirá la información de la calificación operacional, donde se resumirán los resultados de los ensayos de operacionabilidad y se confirmará la existencia de todos y cada uno de los programas y procedimientos indispensables para el correcto funcionamiento del equipo.

Al igual que en el resto de informes de fases anteriores, sí se detectase algún punto posible de mejora (crítico o no crítico) deberá constar en el informe y en el caso de detectarse algún punto crítico, éste deberá solventarse antes de pasar a la validación del equipo (PQ).

- **Calificación del Desempeño (PQ)**

De acuerdo con la Food & Drug Administration (FDA), una vez que los componentes del sistema han sido operacionalmente verificados en función de las especificaciones del proveedor y han sido comprobados, puede iniciarse la validación del sistema (PQ).

El objetivo de esta fase es el de verificar la consistencia y fiabilidad del sistema y piezas de equipo, se demostrará que cada parte realiza la función para la que está destinada, resultando en componentes, materiales, productos y resultados conformes a las especificaciones de calidad.

Deben comprobarse la existencia (o bien deben redactarse) los procedimientos operacionales estándar (SOP's) necesarios para el funcionamiento del sistema.

Estos procedimientos son de: funcionamiento y puesta en marcha del sistema, mantenimiento, métodos analíticos, etc.

Para el ensayo de la calificación de funcionamiento del sistema se emplea una mezcla test, una columna y fase móvil bien caracterizada para evitar interferencias producidas por la química involucrada con cada uno de estos componentes.

- **Calificación del Mantenimiento y Recalificación (MQ)**

Una vez validado el sistema se ha asegurado la confiabilidad o capacidad del sistema. Pero esta confiabilidad está condicionada al riguroso cumplimiento de todos los programas y procedimientos de operación estándar (SOP's) implantados durante el desarrollo de la validación.

Por ello, es necesario continuar con la siguiente fase (MQ), la cual es indispensable para asegurar la consistencia en el futuro de la calidad de los resultados obtenidos, mediante la implantación de un procedimiento de control de proceso del sistema. Este procedimiento debe comprender:

- Plan de control rutinario del sistema.
- Seguimiento y control de los diferentes programas y procedimientos establecidos durante las fases anteriores de la validación.

- Control de incidencias (con relación a averías así como a desviaciones de calidad de los resultados analíticos)
- Control de cambios de la instalación (regulando cuales han de ser validados).

- **Control de cambios**

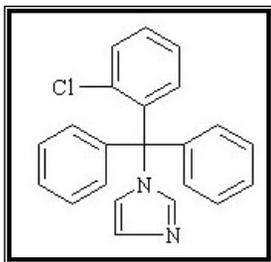
Procedimiento diseñado para evitar invalidar los resultados de una validación, debido a dosificadores o reparaciones de emergencia. Establece un programa para evaluación del impacto de cambios sobre un sistema validado.

## **2.4 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS ANALITOS**

### **2.4.1 CLOTRIMAZOL**

#### **a) PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS**

**Fórmula estructural:**



**Nombre Químico:** 1H-Imidazol, 1-[(2-clorofenil)difenilmetil]

**Fórmula Molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 344,84

**Solubilidad:** Prácticamente insoluble en agua; libremente soluble en metanol, en acetona, en cloroformo, y en alcohol

**Características:** Polvo cristalino blanco a amarillo pálido. Funde a aproximadamente 142 °C, con descomposición.

## b) PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La absorción del clotrimazol es menor de 0.5% después de aplicarlo en la piel intacta; en la vagina es de 3 a 10%, incluso tres días después de administrarlo, persisten a concentraciones fungicidas. La pequeña cantidad que se absorbe es metabolizada en el hígado y excretada por la bilis. En adultos una dosis oral de 200mg genera cifras plasmáticas de 0.2 a 0.35 µg/mL.

El clotrimazol se distribuye en forma de crema, loción y solución al 1%, crema o tabletas vaginales:

Está indicado para el tratamiento tópico de las infecciones dérmicas siguientes:

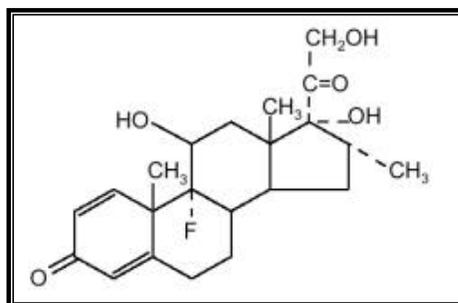
- Candidiasis cutánea (moniliasis), causada por *Candida albicans* (*Monilia albicans*).
- Tinea corporis, Tinea cruris y Tinea pedis, causadas por *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* (*Acrothesium floccosum*), y *Microsporum canis*.
- Tinea versicolor, (Pitiriasis versicolor; “hongo de sol”), causada por *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia furfur*).
- Paronichia, Tinea barbae y Tinea capitis.

No todas las especies de un organismo en particular pueden ser sensibles al Clotrimazol.

### 2.4.2 DEXAMETASONA ACETATO

#### a) PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Fórmula estructural:



**Nombre Químico:** 9-Fluor-11β,17,21-trihidroxi-16α-metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona.

**Formula Molecular:**  $C_{24}H_{31}FO_6$

**Peso Molecular:** 452,51 (Monohidrato) / 434,51 (Anhidro)

**Solubilidad:** Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en metanol, en acetona y dioxano.

**Características:** Polvo blanco a blanco opaco, inodoro.

## **b) PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS**

Dexametasona acetato, es un glucocorticoide de uso tópico, constituye una clase de esteroide sintético, usado como agente antiinflamatorio, antiprurítico y vasoconstrictor periférico. Se difunde a través de las membranas celulares y forma complejos con receptores citoplasmáticos específicos. Estos complejos después de entrar en el núcleo celular se unen al ADN (cromatina) y estimulan la transcripción del ARN<sub>m</sub> (ARN mensajero) y la posterior síntesis de varias enzimas que, se piensa, son los responsables en última instancia de los efectos antiinflamatorios de los corticoides.

La acción emoliente o secante, o el aumento de la absorción transcutánea depende de los excipientes empleados en el preparado. Además, el uso de vendajes oclusivos en zonas extensas o su uso prolongado aumenta la absorción del preparado tópico.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Se realizó de la siguiente manera:

##### **A. ELECCIÓN DEL TIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A UTILIZAR**

Considerando que se trate de una forma farmacéutica con dos principios activos, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

- Peso molecular de cada uno de los principios activos.
- Solubilidad de cada uno de los principios activos.

Cuando el analito tiene peso molecular menor de 2000 daltons el método más usado es el de fase reversa.

##### **B. ELECCIÓN DEL DETECTOR**

Para elegir el tipo de detector y longitud de onda nos basamos en datos bibliográficos <sup>(28)</sup>. Siendo el detector UV el más empleado por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad.

##### **C. ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL Y FASE ESTACIONARIA**

Para elegir la fase móvil y fase estacionaria se tuvo en cuenta los siguientes factores:

- Solubilidad de los principios activos
- Compatibilidad de la fase móvil – muestra – detector

Se trabajó inicialmente con una mezcla de metanol y buffer fosfato en una proporción de 70:30 respectivamente y una columna octadecilsilano (RP-18) con la que no se obtuvo una buena separación entre los componentes de la muestra y el principio activo dexametasona acetato, posteriormente se modificó la proporción a 60:40 respectivamente obteniéndose una buena separación entre los componentes de la muestra y el principio activo dexametasona acetato, pero nos enfrentamos a otro inconveniente que el principio activo clotrimazol eluye a un mayor tiempo de retención

(Figura 1) y que además el pH de la fase móvil es muy básico, siendo éste muy alto y perjudicial para la columna.

Por tal motivo se hicieron diferentes pruebas a distintos pH, llegando a determinar que a pH  $4,8 \pm 0,1$  se obtiene la separación adecuada; corrigiéndose así los inconvenientes antes mencionados (Figura 2), pero observándose que el pico de clotrimazol presenta un factor de cola elevado.

Para mejorar éste último inconveniente se cambió la fase estacionaria a una columna RP-Selec B (Figura 3).

Con todo lo mencionado anteriormente se determinó las condiciones finales del método cromatográfico no evidenciándose ninguna interferencia entre los principios activos, compuesto relacionado y fase móvil.

#### **D. TÉCNICA ANALÍTICA DESARROLLADA**

##### **Condiciones cromatográficas:**

Columna:	LiChrospher® 60 RP-Selec B de 4,0-mm x 12,5-cm que contiene un empaque de 5 µm
Guarda Columna:	LiChrospher® 60 RP-Selec B de 4,0-mm x 4,0-cm que contiene un empaque de 5 µm
Sistema:	Isocrático
Fase Móvil:	Solución Buffer de fosfato: Metanol (40:60) ajustado a pH $4,8 \pm 0,1$
Flujo:	1,0 mL / minuto
Volumen de Inyección:	20 µL
Longitud de Onda:	254 nm
Temperatura:	ambiente

##### **Preparación de la Fase Móvil:**

*- Preparación de la Solución Buffer de fosfato*

Disolver 4,35 g de fosfato de potasio dibásico en agua hasta producir 1000 mL de solución.

*- Fase móvil*

Preparar una mezcla de metanol y solución de fosfato de potasio dibásico (60:40), ajustar a pH  $4,8 \pm 0,1$  con ácido fosfórico, filtrar a través de membrana de  $0,5 \mu\text{m}$  o fina porosidad y desgasificar.

**Preparación de las Soluciones de Trabajo:**

*Preparación de la solución estándar mixto de referencia (concentración final: Clotrimazol 0,4mg/mL y Dexametasona 0,018 mg/mL)*

Transferir 22,5 mg de Dexametasona acetato RS, exactamente pesado, a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol, sonicar por 2 minutos, dejar equilibrar a temperatura ambiente, completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 20 mg de clotrimazol RS, exactamente pesados, a otro matraz aforado de 50 mL, adicionar 20 mL de metanol y 2,0 mL de la solución estándar anterior, completar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de  $0,5\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

*Preparación de la solución muestra (concentración final: Clotrimazol 0,4mg/mL y Dexametasona 0,018 mg/mL)*

Transferir 2,0 g de crema ( $\pm 0,8$  mg de Dexametasona y  $\pm 20$  mg de Clotrimazol), exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol, colocar en Baño María a  $60^\circ\text{C}$  por 2 minutos agitando constantemente sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de  $0,5\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

### **Especificaciones**

Clotrimazol: Cantidad declarada: 1 g /100 g

- Límites: 0,90 g / 100 g - 1,10 g / 100 g  
(90,0% - 110,0%)

Dexametasona acetato equiv. a Dexametasona: Cantidad declarada 0,04 g / 100 g

- Límites: 0,036 g / 100 g – 0,044 g / 100 g  
(90,0% - 110,0%)

### **Cálculos**

Los cálculos que se aplicaron para la determinación de los principios activos en la muestra se realizaron siguiendo la fórmula tal cual se detalla:

$$(g /100 g) \text{ Clotrimazol} = \frac{A_{mp} \times W_{st} \times P_{st} \times 50 \times 100}{A_{st} \quad 50 \quad 100 \quad W_{mp}}$$

$$(g /100 g) \text{ Dexametasona} = \frac{A_{mp} \times W_{st} \times 2 \times P_{st} \times 392,4 \times 50 \times 100}{A_{st} \quad 50 \quad 50 \quad 100 \quad 434,5 \quad W_{mp}}$$

Donde:

$A_{mp}$ : Área bajo la curva del pico de Clotrimazol o Dexametasona acetato, obtenida con la solución muestra problema.

$A_{st}$ : Área promedio bajo la curva del pico de Clotrimazol o Dexametasona acetato, obtenida con la solución estándar de referencia.

$W_{st}$ : Peso de Clotrimazol o Dexametasona acetato estándar de referencia, expresado en gramos.

$P_{st}$ : Potencia de Clotrimazol o Dexametasona acetato estándar de referencia, expresado en porcentaje de droga tal cual.

$W_{mp}$ : Peso de muestra problema a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  expresado en gramos.

392,4: Peso molecular de Dexametasona.

434,5: Peso molecular de Dexametasona acetato.

### **3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Se desarrolló a validación del método analítico siguiendo estrictamente el Procedimiento de Operación Estándar (SOP) del Laboratorio Farmacéutico S.J. Roxfarma S.A.

#### **3.2.1 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

##### **a) OBJETIVO**

Establecer las pautas a seguir para el análisis cuantitativo de Clotrimazol y Dexametasona en crema, por HPLC; obteniendo pruebas documentadas que demuestren la fiabilidad del método y así producir resultados dentro de los intervalos definidos.

##### **b) RESPONSABLES**

Elaborado: Analistas

Revisado: Jefe de Control de Calidad

Aprobado: Director Técnico

##### **c) EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

Se contaron con equipos y materiales debidamente calibrados y/o calificados.

Los reactivos que se usaron, fueron de alta pureza, especificados para Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

##### **\* Equipos:**

- Balanza Analítica Chyo JK-200. Rango: 0 – 200 g; Precisión:  $\pm 0.1$  mg.
- Bomba de Vacío Buchi.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) Merck Hitachi LaChrom, equipado con los siguientes módulos:

Interfase D700, Bomba L-7100, Inyector automático, Horno de columna L-7350, Detector UV-VIS, Unidad de Control en Proceso (CPU), Monitor, Teclado.

- Baño Ultrasonido Branson 3510R -DHT.
- Potenciómetro Beckman PHI 310.

**\* Materiales:**

- Beakers de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL
- Espátulas
- Filtros de 0.5  $\mu$ m
- Matraz aforados de 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Papel metálico
- Papel Glacine
- Papel parafina
- Papel toalla
- Pera de goma
- Pipetas graduadas de 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL y 5 mL
- Pissetas
- Probetas graduadas de 100 mL, 250 mL y 500 mL
- Viales

**\* Reactivos:**

- Ácido fosfórico, grado P.A.
- Agua, grado HPLC
- Fosfato de potasio dibásico, grado P.A.
- Metanol, grado HPLC

**d) ESTÁNDARES DE REFERENCIA**

CARACTERÍSTICAS	CLOTRIMAZOL	DEXAMETASONA
		ACETATO
- Potencia	100,00 (t/c)	99,99 (t/c)
- Lote	20050905	DAC50703
- Fecha de fabricación	2005/09	2005/10
- Fecha de vencimiento	2009/09	2010/07
- Proveedor	Buckton Scott South America S.A.C.	Vía Química S.R.L.
- Origen	China	China
- Análisis	MP – 489/05	MP – 462/05

**e) ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

Este proceso se realizó inyectando sucesivamente la solución estándar mixto de referencia, con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema: bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos, conforme a la técnica de análisis:

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
<b>REPETIBILIDAD</b>	
-Tiempo de retención	RSD < 2,0 %
-Áreas	RSD < 2,0 %
<b>PARÁMETROS COMATOGRÁFICOS</b>	
Platos teóricos	Mínimo 1000
Factor de cola	Máximo 2,0
Resolución	Mínimo 5

**f) PARÁMETROS DESARROLLADOS**

<b>PRUEBAS EFECTUADAS</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>
<b>LINEALIDAD</b>	
Recta de regresión	$y = bx + a$
Coeficiente de correlación (r)	$\geq 0,995$
Coeficiente de determinación ( $r^2$ ):	$\geq 0,990$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f):	$\leq 5,0\%$
Coeficiente de variación de la pendiente ( $s^2b$ ):	$\leq 2,0\%$
<b>PRECISIÓN</b>	
<b>Repetibilidad</b>	
Coeficiente de variación (CV)	$\leq 3,0\%$
<b>Precisión Intermedia</b>	
Coeficiente de variación (CV)	$\leq 5,0\%$
<b>EXACTITUD</b>	
Porcentaje de recuperación $t_{exp}$	97,0% - 103,0% $< t_{tablas}$ para $p=0.05$
<b>SELECTIVIDAD</b>	
Lectura del placebo	$\leq 0,5\%$ de la lectura del analito
<b>ROBUSTEZ</b>	
Los resultados no deben variar significativamente al alterar una de las condiciones del sistema.	

**3.2.2 DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

**A. SELECTIVIDAD**

Mediante este parámetro se determinó la capacidad del método analítico de medir el contenido de Clotrimazol + Dexametasona acetato sin interferencia de parte de los excipientes presentes o de posibles productos de degradación de los principios activos.

- El volumen de inyección que se utilizó fue de 20  $\mu$ L.
- Se realizó una inyección por cada muestra.
- El tiempo de corrida por cada inyección fue de 25 minutos.

La preparación de las muestras, así como la concentración de cada una de las soluciones que se usaron son las que se indican a continuación:

<b>MUESTRAS QUE SE INYECTARON</b>	<b>CONCENTRACIÓN UTILIZADA</b>
Metanol	Tal cual
Buffer fosfato	Tal cual
Agua	Tal cual
Fase Móvil	Tal cual
Clotrimazol estándar	0,4mg/mL
Clotrimazol compuesto relacionado	0,4mg/mL
Dexametasona acetato estándar	0,016mg/mL
Dexametasona acetato estándar degradado 1	0,016mg/mL
Dexametasona acetato estándar degradado 2	0,016mg/mL
Dexametasona acetato estándar degradado 3	0,016mg/mL
Dexametasona acetato estándar degradado 4	0,016mg/mL
Dexametasona acetato estándar degradado 5	0,016mg/mL
Metilparabeno	0,2mg/mL
Propilparabeno	0,2mg/mL
Propilenglicol	0,2mg/mL
Polisorbato 80	0,2mg/mL
Ceteareth 25	0,2mg/mL
Ceteareth 6 + Alcohol Estearílico	0,2mg/mL
Alcohol Bencílico	0,2mg/mL
Alcohol Cetoestearílico	0,2mg/mL
Miristato de Isopropilo	0,025mL/mL
Aceite Mineral	0,025mL/mL
Placebo reciente	0,04g/mL
Placebo degradado	0,04g/mL
Producto terminado	0,04g/mL

## **PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

### **a. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RETENCIÓN:**

La determinación del tiempo de retención tanto de Clotrimazol como Dexametasona acetato, se realizó inyectando estándares de referencia por separado, para identificar cada uno de ellos. Posteriormente se inyectaron muestras consecutivas del estándar mixto de referencia, para comprobar si los tiempos de retención de cada uno coinciden.

Luego se inyectaron todos los excipientes que componen la fórmula maestra, verificando de esta manera si hubo o no interferencias, con los tiempos de retención de los dos analitos.

### **Soluciones Estándar de Referencia:**

#### **Clotrimazol RS:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Clotrimazol RS a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

#### **Dexametasona acetato RS:**

Se transfirieron 22,5 mg de Dexametasona acetato RS a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

#### **Estándar mixto + Compuesto Relacionado A:**

Se transfirieron aproximadamente 22,5 mg de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol, sonicar por 2 minutos, dejar equilibrar a temperatura ambiente, completar a volumen con metanol HPLC y mezclar.

Se transfirió 20 mg de compuesto relacionado A en un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y completó a volumen con metanol HPLC y mezclar.

Luego se transfirió 20 mg de clotrimazol RS, exactamente pesados a otro matraz aforado de 50 mL, se adicionó 20 mL de metanol HPLC, 2 mL de la solución de dexametasona acetato RS y 2 mL de la solución compuesto relacionado A; completar a volumen con metanol HPLC y mezclar. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

#### **Excipientes de la fórmula maestra:**

##### **Metilparabeno:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Metilparabeno, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5-µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

##### **Propilparabeno:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Propilparabeno, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5-µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

##### **Propilenglicol:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Propilenglicol, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de

esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Polisorbato 80:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Polisorbato 80, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Ceteareth 25:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Ceteareth 25, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Ceteareth 6 + Alcohol Estearílico:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Ceteareth 6 + Alcohol Estearílico, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Alcohol Bencílico:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Alcohol Bencílico, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Alcohol Cetoestearílico:**

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Alcohol Cetoestearílico, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró

una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Miristato de Isopropilo:**

Se transfirieron 2,5 mL de Miristato de Isopropilo, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Aceite Mineral:**

Se transfirieron 2,5 mL de Aceite Mineral, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**b. DETERMINACIÓN DE PICOS DE EXCIPIENTES EN EL PLACEBO**

Se determinó inyectando la solución placebo.

**Placebo reciente:**

Se transfirieron 2,0 g de placebo reciente a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos agitando constantemente sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5 $\mu\text{m}$  o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**c. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN**

De los dos principios activos, para el caso del Clotrimazol se contó con su compuesto relacionado A y para el caso de la Dexametasona acetato por no contar con su posible producto de degradación se sometió a una degradación forzada (tratamiento con hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno, luz UV y calor).

Asimismo el placebo se sometió a degradación forzada con la finalidad de comprobar si se degradaba algún excipiente.

## **1. TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO AL 20%**

### **Dexametasona acetato estándar degradado 1**

Se transfirieron 22,5 mg de Dexametasona acetato RS a un beaker de 100 mL, se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 20% y 5 mL de agua, se llevó a baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

## **2. TRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO QP**

### **Dexametasona acetato estándar degradado 2**

Se transfirieron 22,5 mg de Dexametasona acetato RS a un beaker de 100 mL, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico QP y 5 mL de agua, se llevó a baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

## **3. TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO 10 Volúmenes**

### **Dexametasona acetato estándar degradado 3**

Se transfirieron 22,5 mg de Dexametasona acetato RS a un beaker de 100 mL, se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno 10 volúmenes y 5 mL de agua, se llevó a

baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

#### **4. TRATAMIENTO CON LUZ UV**

##### **Dexametasona acetato estándar degradado 4**

Se transfirió una cantidad de Dexametasona acetato RS (aproximadamente 1 g), a una placa petri y se expuso a la luz ultravioleta 254 nm por 30 minutos. Se transfirieron 22,5 mg de Dexametasona acetato RS expuesto, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

#### **5. TRATAMIENTO CON CALOR**

##### **Dexametasona acetato estándar degradado 4**

Se transfirió 22,5 mg de Dexametasona acetato RS a un beaker de 100 mL, se adicionó 50 mL de agua y llevar a baño de vapor por 2 horas, y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con metanol HPLC y se mezcló.

Se transfirió 2 mL de la solución anterior, exactamente medidos, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**Placebo Degradado:**

Se transfirió una cantidad de placebo reciente a un beaker de 100 mL hasta exactamente la graduación de 50 mL, se llevó a baño de vapor por 2 horas y se dejó enfriar.

Se pesó 2,0 g de placebo degradado y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos agitando constantemente sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**d. DETERMINACIÓN DE PICOS Y TIEMPOS DE RETENCIÓN EN MUESTRA**

**Producto Terminado:**

Transferir 2,0 g de crema exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos agitando constantemente sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

**B. LINEALIDAD**

La linealidad se determinó empleando estándares de referencia, en un rango de cinco concentraciones (33,3%; 66,6%; 100%; 133,3%; 166,6%), siendo el 100% la concentración final de 0,04 g / mL de Clotrimazol y 0,018 g/mL de Dexametasona acetato, que corresponden a la concentración final de la muestra en el ensayo.

**PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:**

Se prepararon tres soluciones madres a partir de las cuales se realizaron las soluciones de lectura.

Por cada solución madre se realizó cinco diluciones; obteniéndose 15 determinaciones cada una.

### **PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES:**

#### **Solución Madre Mixta 1:**

Se transfirió 0,3833 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3348 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución.

#### **Solución Madre Mixta 2:**

Se transfirió 0,3722 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3322 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución.

#### **Solución Madre Mixta 3:**

Se transfirió 0,3817 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3351 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución.

### **PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LECTURA:**

**Soluciones al 33,3% (0,1332mg/mL Clotrimazol y 0,00599mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 1,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 66,6% (0,2664mg/mL Clotrimazol y 0,01188mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 2,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 100% (0,4mg/mL Clotrimazol y 0,018mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 3,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 133,3% (0,5332mg/mL Clotrimazol y 0,02394mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 4,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 166,6% (0,664mg/mL Clotrimazol y 0,02988mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 5,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- $\mu$ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

- Cada solución de lectura se inyectó por triplicado, obteniéndose un total de 45 determinaciones por analito. Los cromatogramas que evidencian los resultados se muestran, con la finalidad de respaldar lo antecedido.

**C. EXACTITUD**

**PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

Se prepararon tres soluciones madres, a partir de las cuales se realizaron las soluciones de lectura dentro del rango a estudiar (33,3%; 100%; 166,6%), obteniéndose 9 determinaciones por cada solución de lectura.

Asimismo se preparó el placebo con todos los excipientes, excepto los analitos a determinar. Sobre dicho placebo se añadieron cantidades conocidas de los dos analitos a determinar en los tres niveles de concentración.

**PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES**

**Solución Madre Mixta 1:**

Se transfirió 0,3835 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3380 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución.

**Solución Madre Mixta 2:**

Se transfirió 0,3729 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3353 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución.

**Solución Madre Mixta 3:**

Se transfirió 0,3824 g de Dexametasona acetato RS, a un matraz aforado de 50 mL, se disolvió y se completo a volumen con metanol HPLC, se mezcló.

Se transfirió 0,3376 g de Clotrimazol RS a otro matraz aforado de 50 mL, se disolvió con metanol HPLC, y se añadió 2 mL de la solución anterior y se completó a volumen con metanol HPLC, luego se homogenizó la solución

**PREPARACIÓN DEL PLACEBO**

El placebo se preparó siguiendo las instrucciones de fabricación del producto farmacéutico piloto, se añadieron todos los excipientes a excepción de los principios activos.

**PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LECTURA**

**Soluciones al 33,3% (0,1332mg/mL Clotrimazol y 0,00599mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 1,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL, se adicionó aproximadamente 0,6 g del placebo, adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos agitando constantemente, sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción

de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 100% (0,4mg/mL Clotrimazol y 0,018mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 3,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL, se adicionó aproximadamente 2,0 g del placebo, adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos agitando constantemente sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

**Soluciones al 166,6% (0,664mg/mL Clotrimazol y 0,02988mg/mL Dexametasona acetato):**

Se transfirió 5,0 mL de la Solución Madre Mixto 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL, se adicionó aproximadamente 3,3 g del placebo, y se completó a volumen con fase metanol HPLC, se homogenizó la solución. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5-µm o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre mixta 2 y 3.

- El ensayo de recuperación se realizó inyectando por triplicado las soluciones de lectura para cada nivel, obteniéndose 27 determinaciones por cada analito.
- Los analitos se determinaron en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calculo la recuperación.

## **D. PRECISIÓN**

### **PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

El estudio de la precisión se realizó siguiendo el método analítico desarrollado para el producto. Se realizaron 3 precisiones, las cuales fueron desarrolladas en días diferentes, y cada precisión fue realizada a 3 niveles de concentración (50%, 100%, 150%) tomadas dentro del rango de linealidad y por triplicado.

Además los ensayos de precisión se realizaron utilizando las muestras del lote piloto y dos soluciones estándar mixto de referencia, para dos niveles de concentración tomados dentro del rango de la linealidad, cada solución de estándar y muestra se inyectó por triplicado.

#### **Preparación de la fase móvil:**

*Solución fosfato dibásico:* disolver 4,35g de fosfato de potasio dibásico en agua hasta producir 1000mL de solución.

Preparar una mezcla de metanol y solución de fosfato de potasio dibásico (60:40), ajustar a pH  $4,8 \pm 0,1$  con ácido fosfórico, filtrar a través de la membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  o fina porosidad, y desgasificar.

#### **Preparación de las soluciones de trabajo**

##### Preparación del estándar mixto de referencia:

Transferir 22,5mg de dexametasona acetato RS, exactamente pesados, a una fiola de 50mL adicionar 25mL de metanol HPLC, sonicar por 10 minutos, dejar equilibrar a temperatura ambiente. Completar a volumen con metanol HPLC y mezclar. Transferir 20mg de Clotrimazol RS, exactamente pesados a otro matraz aforado de 50mL, adicionar 20mL de metanol HPLC y 2.0mL de la solución estándar anterior, completar a volumen con metanol HPLC y mezclar. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de  $0,5\mu\text{m}$  o fina porosidad, descartando los primeros 10mL del filtrado.

##### Preparación de la solución muestra:

\* Al 50%:

Transferir 1,0g de la crema (0,4 mg de Dexametasona y 10 mg de Clotrimazol), exactamente pesados a un matraz aforado de 50mL, adicionar 25mL de metanol, colocar en Baño María a 60°C por 2 minutos, agitando constantemente, sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad, descartando los primeros 10mL del filtrado.

\* AI 100%:

Transferir 2,0g de la crema (0,8 mg de Dexametasona y 20mg de clotrimazol), exactamente pesados a un matraz aforado de 50mL, adicionar 25mL de metanol HPLC, colocar en baño María a 60°C por 2 minutos, agitando constantemente, sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5µm o fina porosidad, descartando los primeros 10mL del filtrado.

\* AI 150%

Transferir 3,0 g de la crema (1,2 mg de Dexametasona y 30 mg de Clotrimazol), exactamente pesados a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol HPLC, colocar en baño María a 60°C por 2 minutos, agitando constantemente, sonicar por 2 minutos, enfriar sobre agua helada, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol HPLC. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5 µm o fina porosidad, descartando los primeros 10mL del filtrado.

**Cálculos:**

Se inyectó los estándares mixtos de referencia, cada muestra por triplicado, a las áreas obtenidas se le aplicó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de principios activos en la muestra.

$$(\text{g} / 100 \text{ g}) \text{ Clotrimazol} = \frac{A_{\text{mp}} \times W_{\text{st}} \times P_{\text{st}} \times 50 \times 100}{A_{\text{st}} \quad 50 \quad 100 \quad W_{\text{mp}}}$$

$$(\text{g /100 g}) \text{ Dexametasona} = \frac{A_{\text{mp}} \times W_{\text{st}} \times 2 \times P_{\text{st}} \times 392,4 \times 50 \times 100}{A_{\text{st}} \quad 50 \quad 50 \quad 100 \quad 434,5 \quad W_{\text{mp}}}$$

Donde:

$A_{\text{mp}}$ : Área bajo la curva del pico de Clotrimazol o Dexametasona acetato, obtenida con la solución muestra problema.

$A_{\text{st}}$ : Área promedio bajo la curva del pico de Clotrimazol o Dexametasona acetato, obtenida con la solución estándar de referencia.

$W_{\text{st}}$ : Peso de Clotrimazol o Dexametasona acetato estándar de referencia, expresado en gramos.

$P_{\text{st}}$ : Potencia de Clotrimazol o Dexametasona acetato estándar de referencia, expresado en porcentaje de droga tal cual.

$W_{\text{mp}}$ : Peso de muestra problema a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  expresado en gramos.

## **E. ROBUSTEZ**

La Robustez se realizó variando el factor pH de la fase móvil en un  $\pm 0,5$  del valor establecido en la Técnica desarrollada.

Para el ensayo a cada nivel del valor de pH de la fase móvil se utilizó dos soluciones estándar mixto de referencia, para dos niveles de concentración dentro del rango de la linealidad y 3 muestras del lote piloto, cada solución estándar y muestra se inyectó por triplicado.

### **3.2.3 ANÁLISIS COMPARATIVO**

El estudio del análisis comparativo se realizó siguiendo el método analítico desarrollado para el producto; se trabajó con muestras de 2 laboratorios diferentes.

Para el análisis de cada producto se prepararon 3 muestras y se utilizó 2 soluciones estándar mixto de referencia para dos niveles de concentración tomados dentro del rango de la linealidad. Cada solución estándar y muestra se inyectó por triplicado.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

**TABLA N° 1: RESULTADOS PARA CLOTRIMAZOL**

	<b>RT</b>	<b>ÁREA</b>	<b>N</b>	<b>ASYM</b>	<b>RES</b>
1	12.42	747158	3684	0.86	9.17
2	12.43	751915	3675	0.86	9.17
3	12.42	748694	3668	0.86	9.18
4	12.42	748665	3679	0.87	9.18
5	12.42	751163	3660	0.85	9.18
<b>Σ</b>	62.11	3747595	18366	4.30	45.88
<b>X</b>	12.42	749519	3673	0.86	9.18

$\Sigma$  = Sumatoria

**X** = Promedio

**TABLA N° 2: RESULTADOS PARA DEXAMETASONA ACETATO**

	<b>RT</b>	<b>ÁREA</b>	<b>N</b>	<b>ASYM</b>	<b>RES</b>
1	5.76	587103	1319	0.94	9.17
2	5.76	587752	1324	0.94	9.17
3	5.75	585465	1324	0.95	9.18
4	5.76	585097	1329	0.95	9.18
5	5.76	585143	1332	0.94	9.18
<b>Σ</b>	28.79	2930560	6628	4.72	45.88
<b>X</b>	5.76	586152	1326	0.94	9.18

$\Sigma$  = Sumatoria

**X** = Promedio

**RT** : Tiempo de retención  
**N** : Número de platos teóricos  
**ASYM** : Factor de asimetría de cola  
**RES** : Resolución

**TABLA N° 3: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

PARÁMETRO DE ADECUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	
		CLOTRIMAZOL	DEXAMETASONA ACETATO
<b>REPETIBILIDAD</b>			
-Tiempo de retención	RSD < 2,0 %	0,02%	0,07%
-Áreas	RSD < 2,0 %	0,26	0,21
<b>PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS</b>			
Platos teóricos	Mínimo 1000	3660	1332
Factor de cola	Máximo 2,0	0,86	0,94
Resolución	Mínimo 5	9,18	

## 4.2 SELECTIVIDAD

**TABLA N° 4 – TIEMPOS DE RETENCIÓN DEL ESTÁNDAR, EXCIPIENTES, PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN, PLACEBO, MUESTRAS.**

MUESTRA	TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos)																		
	0'	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'	15'	16'	17'	18'
Dexametasona acetato estándar						5,47													
Clotrimazol estándar													12,61						
Dexametasona acetato HCl QP							6,13												
Dexametasona acetato NaOH 20%							6,12												
Dexametasona acetato H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 Vol.							6,13												
Dexametasona acetato luz UV							6,12												
Dexametasona acetato calor							6,20												
Clotrimazol compuesto relacionado A																			18,51
Placebo reciente	0,97	1,29	1,87	2,28		4,48													
Placebo degradado	0,97	1,29	1,87	2,28		4,48													
Producto terminado																			
Metanol	0,97																		
Buffer fosfato																			
Agua																			
Fase móvil																			
Metilparabeno				2,28															
Propilparabeno						4,48													
Propilenglicol	0,97																		
Polisorbato 80	0,97																		
Cetearth 25	0,97																		
Cetearth 6 + Alcohol estearílico	0,97																		
Alcohol cetoestearílico	0,97																		
alcohol bencílico		1,87	2,28																
Miristato de Isopropilo		1,29																	
Aceite mineral	0,97																		

**INTERPRETACIÓN:** Los tiempos de retención tanto de los excipientes como de los productos de degradación no interfieren con los tiempos de retención de la Dexametasona acetato y Clotrimazol. Por lo tanto el método es selectivo.

### 4.3 LINEALIDAD

➤ **ANALITO CLOTRIMAZOL**

**TABLA N° 5 – PESO DE LAS SOLUCIONES MADRES Y CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

**Soluciones Madre:**

Sol. Madre	Peso Teórico	Peso Real	Factor	Concentración	Dilución
	(g)	(g)	Dilución	(g/mL)	
M1	0.4000	0.3348	0.02	6.6960000	(mL)
M2	0.4000	0.3322	0.02	6.6440000	50
M3	0.4000	0.3351	0.02	6.7020000	

**TABLA N° 6 – CONCENTRACIÓN DEL ESTÁNDAR vs RESPUESTA**

Concentración (%)	Numero de Réplicas	Concentración (mg/mL)	Área Promedio
33.3 %	1	0.13392000	252988
	2	0.13288000	249461
	3	0.13404000	250138
66.6 %	1	0.26784000	503158
	2	0.26576000	500720
	3	0.26808000	502499
100 %	1	0.40176000	749507
	2	0.39864000	748630
	3	0.40212000	755238
133.3 %	1	0.53568000	1002112
	2	0.53152000	991504
	3	0.53616000	1001866
166.6 %	1	0.66960000	1248936
	2	0.66440000	1239913
	3	0.67020000	1253509

## A. DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIONALIDAD Y DE LA LINEALIDAD

### A1. RECTA DE REGRESIÓN LINEAL

**TABLA N° 7 - RESULTADOS Y CÁLCULOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LINEALIDAD**

x (g/mL)	y (Área)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	
0.13392000	252988	33880	0.01793457	64002928144	
0.13288000	249461	33148	0.01765709	62230790521	
0.13404000	250138	33528	0.01796672	62569019044	
0.26784000	503158	134766	0.07173827	253167972964	
0.26576000	500720	133071	0.07062838	250720518400	
0.26808000	502499	134710	0.07186689	252505245001	
0.40176000	749507	301122	0.16141110	561760743049	
0.39864000	748630	298434	0.15891385	560446876900	
0.40212000	755238	303696	0.16170049	570384436644	
0.53568000	1002112	536812	0.28695306	1004229127951	
0.53152000	991504	527004	0.28251351	983080182016	
0.53616000	1001866	537160	0.28746755	1003735481956	
0.66960000	1248936	836288	0.44836416	1559841132096	
0.66440000	1239913	823798	0.44142736	1537384247569	
0.67020000	1253509	840102	0.44916804	1571285647918	
<b>Σ</b>	6.01260000	11250180	5507520	2.94571103	10297344350173
<b>P</b>	0.40084000	750012			

**Σ = Sumatoria; P = Promedio**

**x** = Concentración (variable independiente, no sujeta a errores indeterminados).

**y** = Área (variable dependiente, sujeta a errores indeterminados).

**Fórmula para hallar b:**

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = 1863256$$

**Fórmula para hallar a:**

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 3144$$

**Ecuación:**

$$y = bx + a$$

$$y = 1863256 x + 3144$$

## **B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL**

### **a) COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)**

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

$$r = 0.999987$$

En las tablas de r, para n-2 grados de libertad (en este caso 15-2 = 13), el valor obtenido 0.999987 supone una correlación positiva. Con una probabilidad superior al 99,9 % (significativa al uno por mil) ya que  $r(13, 0,001) = 0,760$ .

### **b) COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r<sup>2</sup>)**

$$r^2 = 0.999974$$

La variable independiente explica un 99,99 % de la varianza total de y.

**c) TEST DE LINEALIDAD**

- **Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f)**

**TABLA N° 8 - RESULTADOS Y CÁLCULOS OBTENIDOS DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA**

x (g/mL)	y (A)	f (y/x)	Promedio	s	s <sup>2</sup>
0.13392000	252988	1889098	1877528	11478	131742458
0.13288000	249461	1877340			
0.13404000	250138	1866144			
0.26784000	503158	1878577	1879040	4851	23534294
0.26576000	500720	1884106			
0.26808000	502499	1874437			
0.40176000	749507	1865559	1873887	7212	52020017.61
0.39864000	748630	1877960			
0.40212000	755238	1878141			
0.53568000	1002112	1870729	1868246	2676	7159282
0.53152000	991504	1865412			
0.53616000	1001866	1868595			
0.66960000	1248936	1865197	1867254	2730	7451630.189
0.66440000	1239913	1866215			
0.67020000	1253509	1870351			

**Media de f:**

$$f = 1873191$$

**Desviación estándar de f:**

$$s_f = 7481$$

**Coeficiente de variación de f:**

$$(s_f/f) \times 100 = 0.40$$

En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación superiores al 5,0% indican falta de linealidad.

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$ , significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados

**Test de Cochran**

$$G_{tabla} (\alpha=0,05; k=5; n=3) = 0.6838$$

$$G_{exp} = \frac{s^2_{m\acute{a}x}}{s^2_1+s^2_2+s^2_3+s^2_4+s^2_5} = \frac{131742458}{221907682} = 0.5937$$

- **Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula: b = 0)**

**TABLA N° 9 – TEST DE LINEALIDAD DE LA PENDIENTE b**

<b><u>Varianza</u></b>			
$s^2_{y,x} = \frac{\Sigma y^2 - \frac{a \Sigma y - b \Sigma xy}{n-2}}{n-2}$	= 3737269	$s_{y,x} = 1933$	
$s^2_b = \frac{s^2_{y,x}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$	= 6977457	$s_b = 2641$	$s_b \text{ rel. (\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 0.14$
<b><u>Límites de confianza</u></b>			
$b \pm t_{s_b} = 1863256 \pm 2.160 \times 2641$			
$b \pm t_{s_b} = 1863256 \pm 5705$	(Entre 1857551 y 1868961)		
El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P = 0,05 (intervalo de confianza del 95 %).			
<b><u>Test de t</u></b>			
$t_{exp} = \frac{ b }{s_b} = \frac{1863256}{2641} = 705.381$			
$t_{exp} > t_{tablas}$ incluso para P = 0,001 (0,1 %).			
Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser b ≠ 0 es muy elevada, superior al 99,9 %.			
Si fuera b = 0 significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.			

**d) TEST DE PROPORCIONALIDAD**

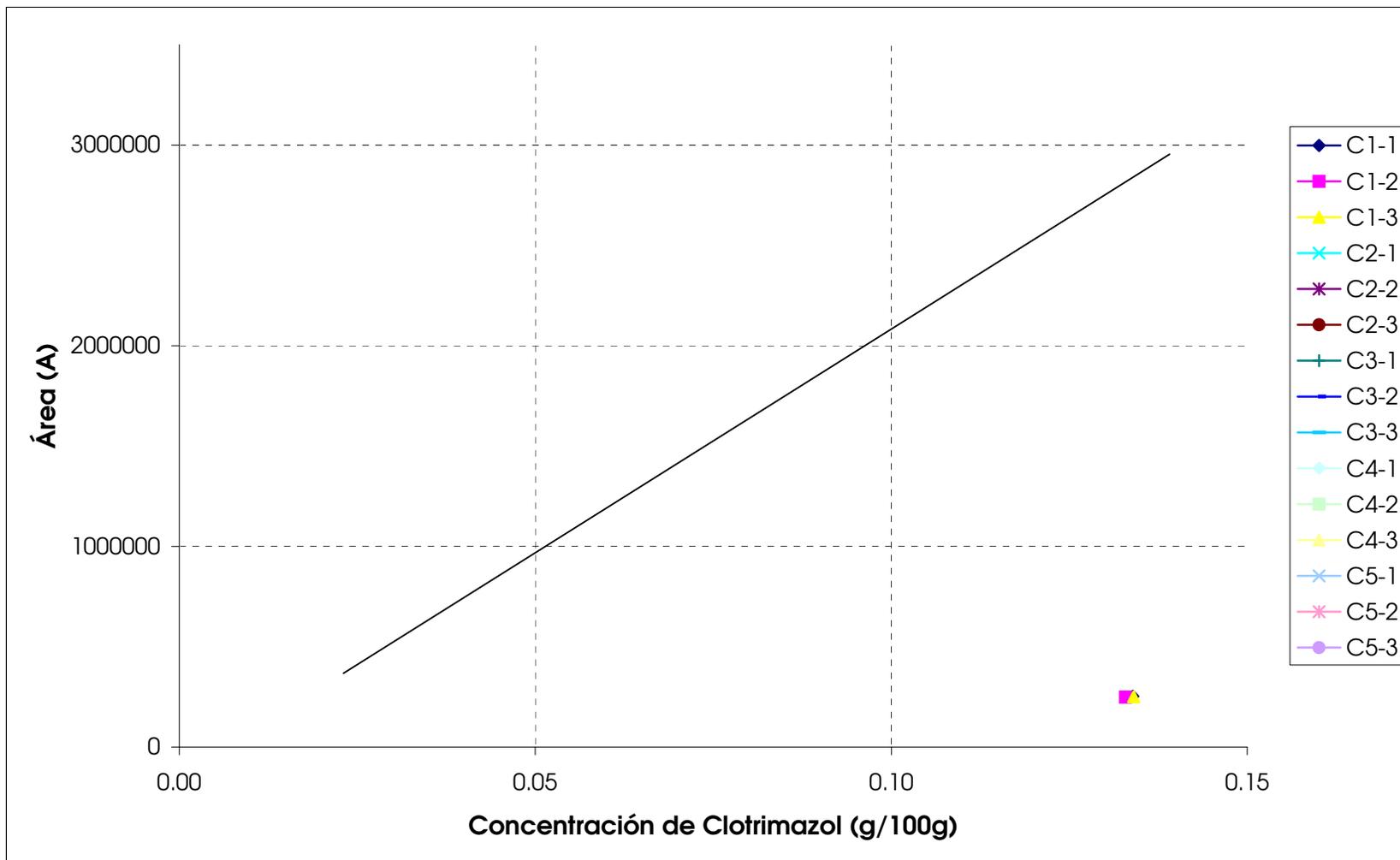
- **Significación estadística de la varianza del término independiente a (Hipótesis nula: a = 0)**

**TABLA N° 10 – TÉRMINO INDEPENDIENTE Y TEST DE PROPORCIONALIDAD**

<b><u>Varianza</u></b>			
$s_a^2$	=	$s_b^2 \frac{\sum X^2}{n}$	= 1370238
			$s_a = 1171$
			<b><math>s_a</math> rel. (%)</b>
			= $\frac{s_a \times 100}{a} = 37.23$
<b><u>Límites de confianza</u></b>			
a	±	t s <sub>a</sub>	= 3144 ± 2.160 x 1171
a	±	t s <sub>a</sub>	= 3144 ± 2529 (Entre 615 y 5673)
Como estos límites no incluyen el cero (0), el método analítico presenta sesgo, es decir, no se cumple la condición de proporcionalidad.			
El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P=0,05 (intervalo de confianza del 95 %).			
<b><u>Test de t</u></b>			
$t_{exp}$	=	$\frac{ a }{s_a}$	= $\frac{3144}{1171} = 2.686$
$t_{exp}$	>	$t_{tablas}$	
Este valor indica que la probabilidad de ser a ≠ 0 es elevada.			
Si a = 0, significa que la recta pasa por el origen de las coordenadas.			

### C. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RECTA DE REGRESIÓN

GRÁFICO N° 6 - REPRESENTACIÓN GRÁFICA



➤ **ANALITO DEXAMETASONA ACETATO**

**TABLA N° 11 – PESO DE LAS SOLUCIONES MADRES Y CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

**Soluciones Madre:**

<b>Sol. Madre</b>	<b>Peso Teórico (g)</b>	<b>Peso Real (g)</b>	<b>Factor Dilución</b>	<b>Concentración (g / mL)</b>	<b>Dilución</b>
M1	0.0180	0.3833	0.0008	0.3066093	(mL)
M2	0.0180	0.3722	0.0008	0.2977302	1250
M3	0.0180	0.3817	0.0008	0.3053295	

**TABLA N° 12 – CONCENTRACIÓN DEL ESTÁNDAR vs RESPUESTA**

<b>Concentración (%)</b>	<b>Numero de Réplicas</b>	<b>Concentración (mg / mL)</b>	<b>Área Promedio</b>
33.3 %	1	0.00553901	197715
	2	0.00537860	191959
	3	0.00551589	196137
66.6 %	1	0.01107802	395264
	2	0.01075721	382609
	3	0.01103177	390599
100 %	1	0.01661703	585235
	2	0.01613581	575174
	3	0.01654766	592342
133.3 %	1	0.02215604	786092
	2	0.02151442	757855
	3	0.02206355	778758
166.6 %	1	0.02769504	977394
	2	0.02689302	949086
	3	0.02757944	974704

## A. DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIONALIDAD Y DE LA LINEALIDAD

### A1. RECTA DE REGRESIÓN LINEAL

**TABLA N° 13 - RESULTADOS Y CALCULOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LINEALIDAD**

x (g/mL)	y (Área)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	
0.00553959	197715	1095	0.00003069	39091221225	
0.00537914	191959	1033	0.00002894	36848257681	
0.00551644	196137	1082	0.00003043	38469722769	
0.01107913	395264	4379	0.00012275	156233629696	
0.01075828	382609	4116	0.00011574	146389646881	
0.01103288	390599	4309	0.00012172	152567578801	
0.01661869	585235	9726	0.00027618	342500005225	
0.01613743	575174	9282	0.00026042	330825130276	
0.01654932	592342	9803	0.00027388	350868650109	
0.02215825	786092	17418	0.00049099	617940108455	
0.02151657	757855	16306	0.00046296	574344201025	
0.02206576	778758	17184	0.00048690	606464022564	
0.02769781	977394	27072	0.00076717	955299031236	
0.02689571	949086	25526	0.00072338	900764235396	
0.02758220	974704	26884	0.00076078	950048537354	
<b>Σ</b>	0.24652720	8730923	175216	0.00495292	6198653978693
<b>P</b>	0.01643515	582062			

**Σ = Sumatoria; P = Promedio**

**x** = Concentración (variable independiente, no sujeta a errores indeterminados).

**y** = Área (variable dependiente, sujeta a errores indeterminados).

**Fórmula para hallar b:**

$$b = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sum(x-x)^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = 35199939$$

**Fórmula para hallar a:**

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 3545$$

**Ecuación:**

$$y = bx + a$$

$y = 35199939 x + 3545$
-------------------------

## **B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL**

### **a) COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)**

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

$$r = 0.999958$$

En las tablas de  $r$ , para  $n-2$  grados de libertad (en este caso  $15-2 = 13$ ), el valor obtenido 0.999958 supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 % (significativa al uno por mil) ya que  $r(13, 0,001) = 0,760$ .

### **b) COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN ( $r^2$ )**

$$r^2 = 0.999917$$

La variable independiente explica un 99,99 % de la varianza total de  $y$ .

**c) TEST DE LINEALIDAD**

- **Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)**

**TABLA N° 14 - RESULTADOS Y CÁLCULOS OBTENIDOS DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA.**

x (g/mL)	y (A)	f (y/x)	Promedio	s	s <sup>2</sup>
0.00553959	197715	35691270	35644027	77152	5952382258
0.00537914	191959	35685816			
0.00551644	196137	35554996			
0.01107913	395264	35676448	35547922	137356	18866555231
0.01075828	382609	35564142			
0.01103288	390599	35403177			
0.01661869	585235	35215471	35550070	299354	89613005903
0.01613743	575174	35642231			
0.01654932	592342	35792508			
0.02215825	786092	35476252	35330258	131280	17234389415
0.02151657	757855	35221924			
0.02206576	778758	35292598			
0.02769781	977394	35287772	35304524	29134	848791677.8
0.02689571	949086	35287635			
0.02758220	974704	35338165			

**Media de f:**

$$f = 35475360$$

**Desviación estándar de f:**

$$s_f = 195235$$

**Coefficiente de variación de f:**

$$(s_f/f) \times 100 = 0.55$$

En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación superiores al 5,0 % indican falta de linealidad.

**Test de Cochran**

$$G_{\text{tabla}} (\alpha=0,05; k=5; n=3) = 0.6838$$

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{máx}}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3 + s^2_4 + s^2_5} = \frac{89613005903}{132515124484} = 0.6762$$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$ , significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados

- **Significación estadística de la varianza de la pendiente b (Hipótesis nula: b = 0)**

**TABLA N° 15 – TEST DE LINEALIDAD DE LA PENDIENTE b**

<b>Varianza</b>			
$s^2_{y,x}$	$= \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2}$	$= 7143933$	$s_{y,x} = 2673$
$s^2_b$	$= \frac{s^2_{y,x}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$	$= 7927076829$	$s_b = 89034$ <b><math>s_b</math> rel. (%)</b> $= \frac{s_b \times 100}{b} = 0.25$
<b>Límites de confianza</b>			
b	$\pm t s_b$	$= 35199939 \pm 2.160 \times 890344$	
b	$\pm t s_b$	$= 35199939 \pm 192313$	(Entre 35007626 y 35392252)
El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P=0,05 (intervalo de confianza del 95 %).			
<b>Test de t</b>			
$t_{exp}$	$= \frac{ b }{s_b}$	$= \frac{35199939}{89034}$	$= 395.353$
$t_{exp}$	$> t_{tablas}$	incluso para P = 0,001 (0,1 %).	
Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser b ≠ 0 es muy elevada, superior al 99,9 %.			
Si fuera b = 0 significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.			

**d) TEST DE PROPORCIONALIDAD**

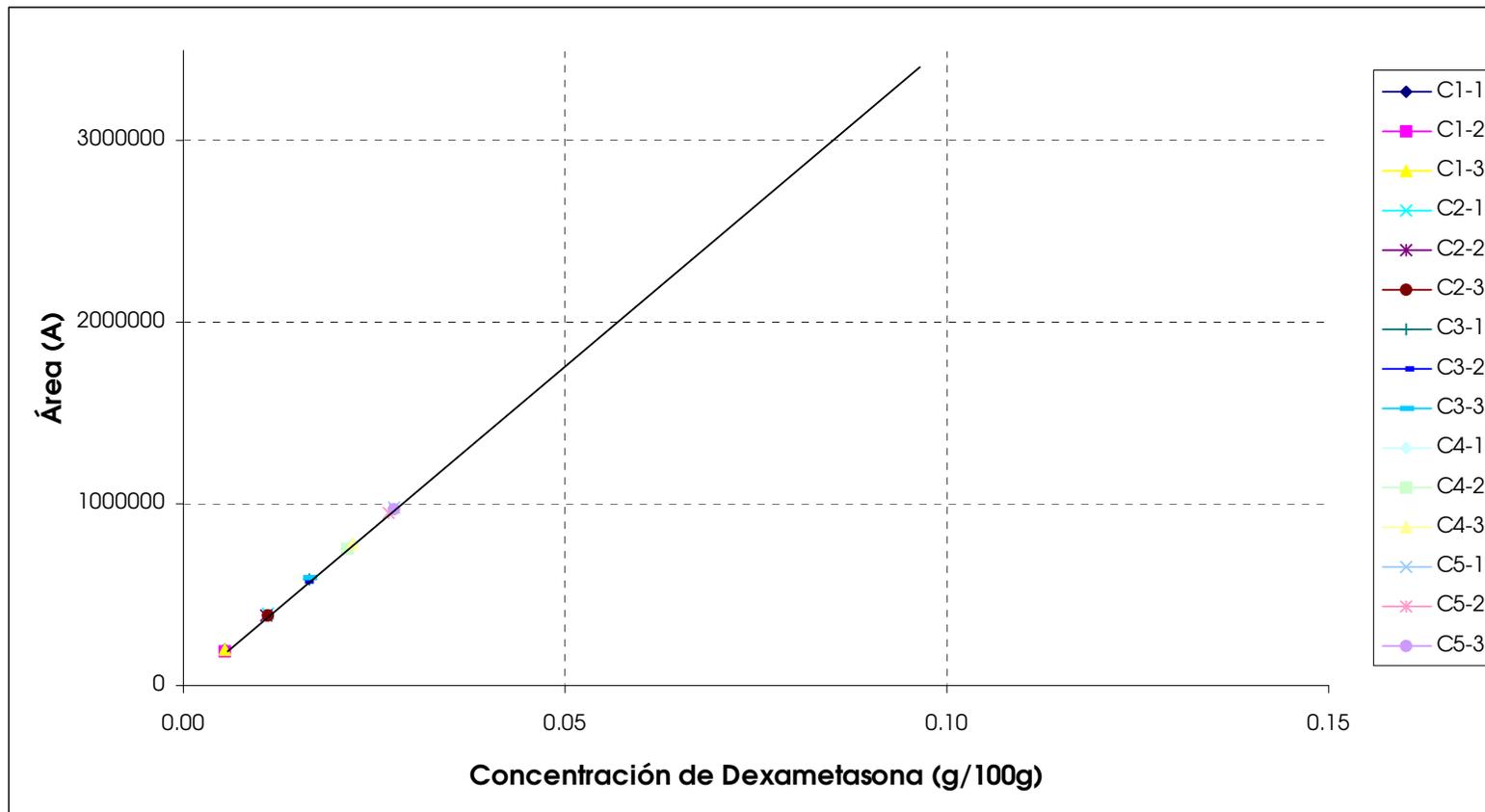
- **Significación estadística de la varianza del término independiente a (Hipótesis nula: a = 0)**

**TABLA N° 16 – TÉRMINO INDEPENDIENTE Y TEST DE PROPORCIONALIDAD**

<b><u>Varianza</u></b>			
$s_a^2$	=	$s_b^2 \frac{\sum X^2}{n}$	= 2617477
			$s_a = 1618$
			<b><math>s_a</math> rel. (%)</b>
			= $\frac{s_a \times 100}{a} = 45.63$
<b><u>Límites de confianza</u></b>			
a	±	$t s_a$	= 3545 ± 2.160 x 1618
a	±	$t s_a$	= 3545 ± 3495 (Entre 50 y 7040)
Como estos límites no incluyen el cero (0), el método analítico presenta sesgo, es decir, no se cumple la condición de proporcionalidad.			
El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P=0,05 (intervalo de confianza del 95 %).			
<b><u>Test de t</u></b>			
$t_{exp}$	=	$\frac{ a }{s_a}$	= $\frac{3545}{1618} = 2.191$
$t_{exp}$	>	$t_{tablas}$	
Este valor indica que la probabilidad de ser a ≠ 0 es elevada.			
Si a = 0, significa que la recta pasa por el origen de las coordenadas.			

### C. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RECTA DE REGRESIÓN

GRÁFICO N° 7 - REPRESENTACIÓN GRÁFICA



#### 4.4 EXACTITUD

##### ➤ ANALITO CLOTRIMAZOL

**TABLA N° 17 - PESO DE LAS SOLUCIONES MADRES Y CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

**Soluciones Madre:**

Sol. Madre	Peso Teórico (g)	Peso Real (g)	Factor Dilución	Concentración (g/mL)	Dilución
M1	0.4000	0.3380	0.02	6.7600000	(mL)
M2	0.4000	0.3353	0.02	6.7060000	50
M3	0.4000	0.3376	0.02	6.7520000	

**TABLA N° 18 - CONCENTRACIÓN DEL ESTANDAR vs RESPUESTA**

Concentración (%)	Numero de Réplicas	ESTÁNDAR		ESTÁNDAR + PLACEBO	
		Concentración (%)	Área Promedio	Concentración (%)	Área Promedio
33.3 %	1	33.80	-----	33.82	255230
	2	33.53	-----	33.77	254857
	3	33.76	-----	33.66	254016
100 %	1	101.40	-----	101.57	760183
	2	100.59	-----	100.38	751258
	3	101.28	-----	102.02	763527
166.6 %	1	169.00	-----	171.16	1278788
	2	167.65	-----	168.31	1257556
	3	168.80	-----	170.04	1270455

**Ecuación de la Recta:**

$$y = bx + a$$

<b>y</b>	=	Área
<b>b</b>	=	1863256
<b>x</b>	=	Concentración
<b>a</b>	=	3144

##### ❖ SOLUCION MADRE 1:

**TABLA N° 19 - DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES CONOCIDAS DIFERENTES DE LA SOLUCIÓN MADRE 1**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s <sup>2</sup>
33.80	33.87	33.82	0.05	33.82 ± 0.05	0.00
	33.83				
	33.77				
101.40	101.69	101.57	0.23	101.57 ± 0.23	0.05
	101.72				
	101.31				
169.00	170.59	171.16	0.56	171.16 ± 0.56	0.31
	171.18				
	171.70				

**Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}x}}{S^2_1 + S^2_2 + S^2_3} = \frac{0.31}{0.36} = 0.8611$$

$G_{tabla} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
33.80	100.21	100.07
	100.08	
	99.92	
101.40	100.29	100.17
	100.32	
	99.91	
169.00	100.94	101.28
	101.29	
	101.60	
	100.51	
	0.67	
	0.67	

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.51| \sqrt{9}}{0.67} = 2.279$$

$t_{tabla} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$

Al ser  $t_{exp} < t_{tabla}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

**❖ SOLUCIÓN MADRE 2:**

**TABLA N° 20 - DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 2**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s <sup>2</sup>
33.53	33.71	33.77	0.06	33.77 ± 0.06	0.00
	33.83				
	33.77				
100.59	100.40	100.38	0.28	100.38 ± 0.28	0.08
	100.65				
	100.09				
167.65	168.05	168.32	0.32	168.32 ± 0.32	0.11
	168.22				
	168.68				

**Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}x}}{S^2_1 + S^2_2 + S^2_3} = \frac{0.11}{0.19} = 0.5789$$

$$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

### **Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
33.53	100.55	100.73
	100.91	
	100.72	
100.59	99.81	99.79
	100.06	
	99.50	
167.65	100.24	100.40
	100.34	
	100.61	
		100.30
		0.48
		0.47

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.30| \sqrt{9}}{0.47} = 1.923$$

$$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

### **❖ SOLUCIÓN MADRE 3:**

#### **TABLA N° 21 - DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 3**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s <sup>2</sup>
33.76	33.82	33.66	0.37	33.66 ± 0.37	0.14
	33.24				
	33.92				
101.28	101.71	102.02	0.39	102.02 ± 0.39	0.15
	101.89				
	102.46				
168.80	170.04	170.04	0.07	170.04 ± 0.07	0.00
	169.97				
	170.11				

### **Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.15}{0.29} = 0.5172$$

$$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
33.76	100.18	99.70
	98.45	
	100.49	
101.28	100.43	100.73
	100.61	
	101.17	
168.80	100.74	100.73
	100.69	
	100.77	
	100.39	
	0.59	
	0.59	

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.39| \sqrt{9}}{0.59} = 1.982$$

$t_{tabla}$  (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306

Al ser  $t_{exp} < t_{tabla}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

➤ **ANALITO DEXAMETASONA ACETATO**

**TABLA N° 22 - PESO DE LAS SOLUCIONES MADRES Y CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

**Soluciones Madre:**

Sol. Madre	Peso Teórico (g)	Peso Real (g)	Factor Dilución	Concentración (mg/mL)	Dilución
M1	0.1000	0.3835	0.0008	0.3067693	(mL)
M2	0.1000	0.3729	0.0008	0.2982902	1250
M3	0.1000	0.3824	0.0008	0.3058894	

**TABLA N° 23 – CONCENTRACIÓN DEL ESTÁNDAR vs RESPUESTA**

Concentración (%)	Numero de Réplicas	ESTÁNDAR		ESTÁNDAR + PLACEBO	
		Concentración (%)	Área Promedio	Concentración (%)	Área Promedio
33.3 %	1	30.79	-----	30.74	198314
	2	29.94	-----	30.14	194533
	3	30.70	-----	30.62	197539
100 %	1	92.36	-----	92.92	592293
	2	89.81	-----	89.65	571547
	3	92.10	-----	92.90	592142
166.6 %	1	153.94	-----	156.80	997026
	2	149.69	-----	150.51	957166
	3	153.50	-----	154.78	984203

❖ **SOLUCIÓN MADRE 1:**

**TABLA N° 24 - DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES CONOCIDAS DIFERENTES DE LA SOLUCIÓN MADRE 1**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s <sup>2</sup>
30.79	30.63 30.85 30.74	30.74	0.11	30.74 ± 0.11	0.01
92.36	92.66 92.81 93.29	92.92	0.33	92.92 ± 0.33	0.11
153.94	156.05 156.70 157.65	156.80	0.80	156.80 ± 0.80	0.64

**Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.64}{0.76} = 0.8421$$

$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
30.79	99.48	99.84
	100.20	
	99.84	
92.36	100.32	100.60
	100.48	
	101.00	
153.94	101.37	101.86
	101.79	
	102.41	
	100.77	
	1.02	
	1.01	

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.77|}{\frac{1.01}{\sqrt{9}}} = 2.282$$

$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

❖ **SOLUCIÓN MADRE 2:**

**TABLA N° 25 - DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 2**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s		s <sup>2</sup>
29.94	29.96 30.14 30.32	30.14	0.18	30.14	± 0.18	0.03
89.81	89.57 89.77 89.60	89.65	0.10	89.65	± 0.10	0.01
149.69	150.05 150.49 151.05	150.53	0.50	150.53	± 0.50	0.25

**Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.25}{0.29} = 0.8621$$

$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
29.94	100.09	100.69
	100.69	
	101.29	
89.81	99.74	99.82
	99.95	
	99.76	
149.69	100.24	100.56
	100.54	
	100.91	
	100.36	
	0.47	
	0.47	

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.36| \sqrt{9}}{0.47} = 2.273$$

$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

❖ **SOLUCIÓN MADRE 3:**

**TABLA N° 26 – DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 3**

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s		s <sup>2</sup>
30.70	30.57	30.62	0.15	30.62	± 0.15	0.02
	30.50					
	30.79					
92.10	92.13	92.90	0.75	92.90	± 0.75	0.57
	92.94					
	93.63					
153.50	154.49	154.78	0.29	154.78	± 0.29	0.08
	154.77					
	155.07					

**Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):**

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.57}{0.67} = 0.8507$$

$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

**Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):**

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
30.70	99.57	99.73
	99.34	
	100.28	
-	100.03	100.87
	92.10	
	101.66	
153.50	100.64	100.83
	100.83	
	101.02	
	100.48	
	0.64	
	0.64	

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.48| \sqrt{9}}{0.64} = 2.226$$

$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

**4.5 PRECISIÓN**

➤ **ANALITO CLOTRIMAZOL**

**PRECISIÓN 1:**

**Pesos de los estándares y muestras:**

	<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>	0.0224
<b>Estándar 2</b>	0.0324

		<b>Analista A1</b>	<b>Analista A2</b>	<b>Analista A3</b>
50%	M1	1.3176	0.9845	0.9612
	M2	1.1186	0.9835	1.1312
	M3	1.1010	0.9847	1.0217
100%	M1	2.0174	2.2079	2.0307
	M2	2.3569	1.9560	1.9217
	M3	2.0805	1.9968	1.9781
150%	M1	3.0477	2.9652	2.9963
	M2	3.1976	2.9628	2.9608
	M3	3.0054	3.0856	2.9530

**Resultados de los estándares:**

<b>Estándar St</b>	<b>Numero de Inyecciones</b>	<b>Área por Inyección</b>	<b>Estadística</b>		
St1	1	800718	X	=	802179.333
	2	805236	DE	=	2647.99874
	3	800584	DER	=	0.33010059
St2	1	1166890	X	=	1167400.33
	2	1168997	DE	=	1412.42782
	3	1166314	DER	=	0.12098916

**PRECISIÓN 2:**

**Pesos de los estándares y muestras:**

	<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>	0.0199
<b>Estándar 2</b>	0.0301

		<b>Analista A1</b>	<b>Analista A2</b>	<b>Analista A3</b>
50%	M1	1.0370	0.9919	1.1435
	M2	1.1737	0.9593	1.2522
	M3	1.1405	1.0609	0.9929
100%	M1	2.0968	2.0366	2.2612
	M2	2.2920	1.9330	2.0425
	M3	2.1751	1.9384	2.1835
150%	M1	3.1474	2.9526	2.9577
	M2	3.0883	3.0947	3.1021
	M3	3.1716	3.2872	2.9487

**Resultados de los estándares:**

<b>Estándar St</b>	<b>Numero de Inyecciones</b>	<b>Área por Inyección</b>	<b>Estadística</b>		
St1	1	717254	X	=	719223.667
	2	720168	DE	=	1706.26209
	3	720249	DER	=	0.23723664
St2	1	1095671	X	=	1099869.33
	2	1097665	DE	=	5633.79218
	3	1106272	DER	=	0.51222377

**PRECISIÓN 3:**

**Pesos de los estándares y muestras:**

	<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>	0.0177
<b>Estándar 2</b>	0.0312

		<b>Analista A1</b>	<b>Analista A2</b>	<b>Analista A3</b>
50%	M1	0.9804	0.9864	1.0087
	M2	0.9816	1.0588	1.0335
	M3	0.9237	1.0031	1.0503
100%	M1	1.9029	1.7989	1.8020
	M2	1.7424	1.7343	1.8960
	M3	1.7053	1.7503	1.8951
150%	M1	2.9773	3.0136	3.0340
	M2	2.9974	3.0213	3.0336
	M3	3.0042	3.0590	3.0176

**Resultados de los estándares:**

<b>Estándar St</b>	<b>Numero de Inyecciones</b>	<b>Área por Inyección</b>	<b>Estadística</b>		
St1	1	635136	X	=	635065
	2	637002	DE	=	1973.45813
	3	633057	DER	=	0.310749
St2	1	1105273	X	=	1109633
	2	1111813	DE	=	3775.87076
	3	1111813	DER	=	0.34028104

**TABLA N° 27 - RESULTADOS DE LA PRECISIÓN 1, 2, 3 CON LOS DIFERENTES ANALISTAS**

Concentración (%)	Muestras M	PRECISIÓN 1 (Día 1)			PRECISIÓN 2 (Día 2)			PRECISIÓN 3 (Día 3)		
		Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 1	Analista 2	Analista 3
50%	M1	102.40	102.51	102.83	101.93	101.62	101.83	102.52	102.02	103.00
	M2	102.76	101.99	103.28	102.70	101.78	102.20	102.65	102.08	102.37
	M3	102.33	102.81	102.79	102.57	101.22	101.86	103.52	102.09	102.29
	<b>X</b>	<b>102.50</b>	<b>102.44</b>	<b>102.97</b>	<b>102.40</b>	<b>101.54</b>	<b>101.96</b>	<b>102.90</b>	<b>102.06</b>	<b>102.55</b>
	<b>DE</b>	<b>0.23</b>	<b>0.41</b>	<b>0.27</b>	<b>0.41</b>	<b>0.29</b>	<b>0.20</b>	<b>0.54</b>	<b>0.04</b>	<b>0.39</b>
	<b>DER</b>	<b>0.23</b>	<b>0.40</b>	<b>0.26</b>	<b>0.40</b>	<b>0.28</b>	<b>0.20</b>	<b>0.53</b>	<b>0.04</b>	<b>0.38</b>
100%	M1	102.80	103.63	103.30	102.75	101.60	103.03	102.62	101.79	102.85
	M2	101.94	103.12	102.87	101.57	102.02	101.88	102.41	103.39	102.94
	M3	102.31	102.93	102.71	103.29	101.69	102.24	101.64	102.40	102.46
	<b>X</b>	<b>102.35</b>	<b>103.23</b>	<b>102.96</b>	<b>102.54</b>	<b>101.77</b>	<b>102.38</b>	<b>102.22</b>	<b>102.53</b>	<b>102.75</b>
	<b>DE</b>	<b>0.43</b>	<b>0.36</b>	<b>0.31</b>	<b>0.88</b>	<b>0.22</b>	<b>0.59</b>	<b>0.52</b>	<b>0.81</b>	<b>0.25</b>
	<b>DER</b>	<b>0.42</b>	<b>0.35</b>	<b>0.30</b>	<b>0.86</b>	<b>0.21</b>	<b>0.58</b>	<b>0.51</b>	<b>0.79</b>	<b>0.24</b>
150%	M1	102.62	101.95	102.73	101.99	101.87	102.50	102.52	102.64	103.20
	M2	102.66	102.14	102.69	101.73	101.45	102.55	103.30	101.99	101.97
	M3	102.45	102.23	102.12	101.96	101.50	102.63	101.91	102.49	102.60
	<b>X</b>	<b>102.58</b>	<b>102.11</b>	<b>102.51</b>	<b>101.89</b>	<b>101.60</b>	<b>102.56</b>	<b>102.57</b>	<b>102.37</b>	<b>102.59</b>
	<b>DE</b>	<b>0.11</b>	<b>0.14</b>	<b>0.34</b>	<b>0.14</b>	<b>0.23</b>	<b>0.06</b>	<b>0.69</b>	<b>0.34</b>	<b>0.61</b>
	<b>DER</b>	<b>0.11</b>	<b>0.14</b>	<b>0.33</b>	<b>0.14</b>	<b>0.22</b>	<b>0.06</b>	<b>0.68</b>	<b>0.33</b>	<b>0.60</b>





**PRECISIÓN 3:**

**Pesos de los estándares y muestras:**

	<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>	0.0186
<b>Estándar 2</b>	0.0338
<b>F. Dilución</b>	0.01

**Peso Molecular 1 (Base)**                      392.47  
**Peso Molecular 2 (Sal)**                      434.50

		<b>Analista</b>	<b>Analista</b>	<b>Analista</b>
		<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>
50%	M1	0.9804	0.9864	1.0087
	M2	0.9816	1.0588	1.0335
	M3	0.9237	1.0031	1.0503
100%	M1	1.9029	1.7989	1.8020
	M2	1.7424	1.7343	1.8960
	M3	1.7053	1.7503	1.8951
150%	M1	2.9773	3.0136	3.0340
	M2	2.9974	3.0213	3.0336
	M3	3.0042	3.0590	3.0176

**Resultados de los estándares:**

<b>Estándar</b>	<b>Numero de</b>	<b>Área por</b>	<b>Estadística</b>
<b>St</b>	<b>Inyecciones</b>	<b>Inyección</b>	
St1	1	470028	X = 472456.667
	2	471155	DE = 3279.34023
	3	476187	DER = 0.69410392
St2	1	865562	X = 865314
	2	865190	DE = 214.7743
	3	865190	DER = 0.02482039

**TABLA N° 28 - RESULTADOS DE LA PRECISIÓN 1, 2, 3 CON LOS DIFERENTES ANALISTAS**

Concentración (%)	Muestras M	PRECISIÓN 1 (Día 1)			PRECISIÓN 2 (Día 2)			PRECISIÓN 3 (Día 3)		
		Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 1	Analista 2	Analista 3
50%	M1	105.81	106.52	106.11	107.64	106.95	108.31	105.92	104.85	106.54
	M2	105.85	106.90	107.54	107.20	107.72	107.66	105.25	106.44	105.14
	M3	107.33	105.39	108.58	108.50	107.36	106.89	105.14	107.27	106.12
	<b>X</b>	<b>106.33</b>	<b>106.27</b>	<b>107.41</b>	<b>107.78</b>	<b>107.34</b>	<b>107.62</b>	<b>105.44</b>	<b>106.19</b>	<b>105.93</b>
	<b>DE</b>	<b>0.87</b>	<b>0.79</b>	<b>1.24</b>	<b>0.66</b>	<b>0.39</b>	<b>0.71</b>	<b>0.42</b>	<b>1.23</b>	<b>0.72</b>
	<b>DER</b>	<b>0.81</b>	<b>0.74</b>	<b>1.15</b>	<b>0.61</b>	<b>0.36</b>	<b>0.66</b>	<b>0.40</b>	<b>1.16</b>	<b>0.68</b>
100%	M1	107.32	106.57	107.13	107.00	107.41	107.84	106.40	105.60	107.10
	M2	105.96	106.61	107.39	106.59	106.67	105.38	106.69	105.97	107.52
	M3	106.71	107.39	106.68	108.15	106.70	107.46	106.25	107.55	106.20
	<b>X</b>	<b>106.66</b>	<b>106.86</b>	<b>107.07</b>	<b>107.25</b>	<b>106.93</b>	<b>106.89</b>	<b>106.45</b>	<b>106.37</b>	<b>106.94</b>
	<b>DE</b>	<b>0.68</b>	<b>0.46</b>	<b>0.36</b>	<b>0.81</b>	<b>0.42</b>	<b>1.32</b>	<b>0.22</b>	<b>1.04</b>	<b>0.67</b>
	<b>DER</b>	<b>0.64</b>	<b>0.43</b>	<b>0.34</b>	<b>0.75</b>	<b>0.39</b>	<b>1.24</b>	<b>0.21</b>	<b>0.97</b>	<b>0.63</b>
150%	M1	106.00	105.86	106.25	106.51	106.85	107.83	106.65	105.45	107.71
	M2	104.75	106.56	106.72	105.21	105.50	108.66	103.65	104.64	106.08
	M3	106.73	108.22	107.54	108.02	106.59	108.22	104.70	106.97	106.59
	<b>X</b>	<b>105.83</b>	<b>106.88</b>	<b>106.84</b>	<b>106.58</b>	<b>106.31</b>	<b>108.24</b>	<b>105.00</b>	<b>105.69</b>	<b>106.79</b>
	<b>DE</b>	<b>1.00</b>	<b>1.21</b>	<b>0.65</b>	<b>1.41</b>	<b>0.72</b>	<b>0.42</b>	<b>1.52</b>	<b>1.18</b>	<b>0.83</b>
	<b>DER</b>	<b>0.95</b>	<b>1.13</b>	<b>0.61</b>	<b>1.32</b>	<b>0.67</b>	<b>0.38</b>	<b>1.45</b>	<b>1.12</b>	<b>0.78</b>

#### 4.5.1 REPETIBILIDAD

##### ➤ ANALITO CLOTRIMAZOL

##### REPETIBILIDAD A1:

**TABLA N° 29 - EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANALISTA 1 EN LAS MISMAS CONDICIONES OPERATIVAS.**

**Analista:** Analista 1 (A1)

##### Resultados:

	Concentración (%)		
	D1	D2	D3
<b>M1</b>	102.50	102.40	102.90
<b>M2</b>	102.35	102.54	102.22
<b>M3</b>	102.58	101.89	102.57
<b>X</b>	102.48	102.28	102.56
<b>DE</b>	0.12	0.34	0.34
<b>DER</b>	0.11	0.33	0.33

##### Límite de Confianza Individual (95 %):

$x \pm ts$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Ind. D1</b>	=	102.48	±	4.303	X	0.12
<b>LC Ind. D1</b>	=	102.48	±	0.50		
<b>LC Ind. D1</b>	=	101.97	-	102.98		
<b>LC Ind. D2</b>	=	102.28	±	4.303	X	0.34
<b>LC Ind. D2</b>	=	102.28	±	1.47		
<b>LC Ind. D2</b>	=	100.80	-	103.75		
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.56	±	4.303	x	0.34
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.56	±	1.46		
<b>LC Ind. D3</b>	=	101.10	-	104.03		

##### Límite de Confianza de la Media (95 %):

$x \pm ts/\sqrt{n}$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Med. D1</b>	=	102.48	±	4.303	x	0.12	/	1.73
<b>LC Med. D1</b>	=	102.48	±	0.29				
<b>LC Med. D1</b>	=	102.19	-	102.77				
<b>LC Med. D2</b>	=	102.28	±	4.303	x	0.34	/	1.73
<b>LC Med. D2</b>	=	102.28	±	0.85				
<b>LC Med. D2</b>	=	101.43	-	103.13				
<b>LC Med. D3</b>	=	102.56	±	4.303	x	0.34	/	1.73
<b>LC Med. D3</b>	=	102.56	±	0.84				
<b>LC Med. D3</b>	=	101.72	-	103.41				

**x** = Promedio

**s** = Desviación estándar

**t** = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

**cv** = Coeficiente de variación

**n** = Número de determinaciones

**REPETIBILIDAD A2:**

**TABLA N° 30 - EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANALISTA 2 EN LAS MISMAS CONDICIONES OPERATIVAS.**

**Analista:** Analista 2 (A2)

**Resultados:**

	Concentración (%)		
	D1	D2	D3
<b>M1</b>	102.44	101.54	102.06
<b>M2</b>	103.23	101.77	102.53
<b>M3</b>	102.11	101.60	102.37
<b>X</b>	102.59	101.64	102.32
<b>DE</b>	0.58	0.12	0.24
<b>DER</b>	0.56	0.12	0.23

**Límite de Confianza Individual (95 %):**

$x \pm ts$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Ind. D1</b>	=	102.59	±	4.303	x	0.58
<b>LC Ind. D1</b>	=	102.59	±	2.48		
<b>LC Ind. D1</b>	=	100.12	-	105.07		
<b>LC Ind. D2</b>	=	101.64	±	4.303	x	0.12
<b>LC Ind. D2</b>	=	101.64	±	0.51		
<b>LC Ind. D2</b>	=	101.12	-	102.15		
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.32	±	4.303	x	0.24
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.32	±	1.03		
<b>LC Ind. D3</b>	=	101.29	-	103.35		

**Límite de Confianza de la Media (95 %):**

$x \pm ts/\sqrt{n}$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Med. D1</b>	=	102.59	±	4.303	x	0.58	/	1.73
<b>LC Med. D1</b>	=	102.59	±	1.43				
<b>LC Med. D1</b>	=	101.16	-	104.02				
<b>LC Med. D2</b>	=	101.64	±	4.303	x	0.12	/	1.73
<b>LC Med. D2</b>	=	101.64	±	0.30				
<b>LC Med. D2</b>	=	101.34	-	101.93				
<b>LC Med. D3</b>	=	102.32	±	4.303	x	0.24	/	1.73
<b>LC Med. D3</b>	=	102.32	±	0.59				
<b>LC Med. D3</b>	=	101.73	-	102.91				

**x** = Promedio

**s** = Desviación estándar

**t** = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

**cv** = Coeficiente de variación

**n** = Número de determinaciones

**REPETIBILIDAD A3:**

**TABLA N° 31 - EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANALISTA 3 EN LAS MISMAS CONDICIONES OPERATIVAS.**

**Analista:** Analista 3 (A3)

**Resultados:**

	Concentración (%)		
	D1	D2	D3
<b>M1</b>	102.97	101.96	102.55
<b>M2</b>	102.96	102.38	102.75
<b>M3</b>	102.51	102.56	102.59
<b>x</b>	102.81	102.30	102.63
<b>s</b>	0.26	0.31	0.11
<b>cv</b>	0.26	0.30	0.10

**Límite de Confianza Individual (95 %):**

$x \pm ts$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Ind. D1</b>	=	102.81	±	4.303
<b>LC Ind. D1</b>	=	102.81	±	1.13
<b>LC Ind. D1</b>	=	101.68	-	103.94
<b>LC Ind. D2</b>	=	102.30	±	4.303
<b>LC Ind. D2</b>	=	102.30	±	1.32
<b>LC Ind. D2</b>	=	100.98	-	103.62
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.63	±	4.303
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.63	±	0.46
<b>LC Ind. D3</b>	=	102.17	-	103.09

x      0.26  
x      0.31  
x      0.11

**Límite de Confianza de la Media (95 %):**

$x \pm ts/\sqrt{n}$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Med. D1</b>	=	102.81	±	4.303	x	0.26	/	1.73
<b>LC Med. D1</b>	=	102.81	±	0.65				
<b>LC Med. D1</b>	=	102.16	-	102.81				
<b>LC Med. D2</b>	=	102.30	±	4.303	x	0.31	/	1.73
<b>LC Med. D2</b>	=	102.30	±	0.76				
<b>LC Med. D2</b>	=	101.54	-	103.06				
<b>LC Med. D3</b>	=	102.63	±	4.303	x	0.11	/	1.73
<b>LC Med. D3</b>	=	102.63	±	0.26				
<b>LC Med. D3</b>	=	102.37	-	102.89				

**x** = Promedio

**s** = Desviación estándar

**t** = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

**cv** = Coeficiente de variación

**n** = Número de determinaciones



**REPETIBILIDAD A2:**

**TABLA N° 33 - EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANALISTA 2 EN LAS MISMAS CONDICIONES OPERATIVAS.**

**Analista:** Analista 2 (A2)

**Resultados:**

	D1	D2	D3
<b>M1</b>	106.27	107.34	106.19
<b>M2</b>	106.86	106.93	106.37
<b>M3</b>	106.88	106.31	105.69
<b>X</b>	106.67	106.86	106.08
<b>DE</b>	0.35	0.52	0.35
<b>DER</b>	0.32	0.49	0.33

**Límite de Confianza Individual (95 %):**

$x \pm ts$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Ind. D1</b>	=	106.67	±	4.303	x	0.35
<b>LC Ind. D1</b>	=	106.67	±	1.49		
<b>LC Ind. D1</b>	=	105.18	-	108.16		
<b>LC Ind. D2</b>	=	106.86	±	4.303	x	0.52
<b>LC Ind. D2</b>	=	106.86	±	2.23		
<b>LC Ind. D2</b>	=	104.63	-	109.09		
<b>LC Ind. D3</b>	=	106.08	±	4.303	x	0.35
<b>LC Ind. D3</b>	=	106.08	±	1.52		
<b>LC Ind. D3</b>	=	104.57	-	107.60		

**Límite de Confianza de la Media (95 %):**

$x \pm ts/\sqrt{n}$        $t = 4.303$  (P=0.05)  
n= 3

<b>LC Med. D1</b>	=	106.67	±	4.303	x	0.35	/	1.73
<b>LC Med. D1</b>	=	106.67	±	0.86				
<b>LC Med. D1</b>	=	105.81	-	107.53				
<b>LC Med. D2</b>	=	106.86	±	4.303	x	0.52	/	1.73
<b>LC Med. D2</b>	=	106.86	±	1.29				
<b>LC Med. D2</b>	=	105.57	-	108.15				
<b>LC Med. D3</b>	=	106.08	±	4.303	x	0.35	/	1.73
<b>LC Med. D3</b>	=	106.08	±	0.88				
<b>LC Med. D3</b>	=	105.21	-	106.96				

**x** = Promedio

**s** = Desviación estándar

**t** = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

**cv** = Coeficiente de variación

**n** = Número de determinaciones

**REPETIBILIDAD A3:**

**TABLA N° 34 - EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANALISTA 3 EN LAS MISMAS CONDICIONES OPERATIVAS.**

**Analista:** Analista 3 (A3)

**Resultados:**

	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>M1</b>	107.41	107.62	105.93
<b>M2</b>	107.07	106.89	106.94
<b>M3</b>	106.84	108.24	106.79
<b>X</b>	107.11	107.58	106.55
<b>S</b>	0.29	0.68	0.55
<b>Cv</b>	0.27	0.63	0.51

**Límite de Confianza Individual (95 %):**

				$x \pm ts$	$t = 4.303$	$(P=0.05)$
					$n = 3$	
<b>LC Ind. D1</b>	=	107.11	±	4.303	x	0.29
<b>LC Ind. D1</b>	=	107.11	±	1.23		
<b>LC Ind. D1</b>	=	105.87	-	108.34		
<b>LC Ind. D2</b>	=	107.58	±	4.303	x	0.68
<b>LC Ind. D2</b>	=	107.58	±	2.91		
<b>LC Ind. D2</b>	=	104.68	-	110.49		
<b>LC Ind. D3</b>	=	106.55	±	4.303	x	0.55
<b>LC Ind. D3</b>	=	106.55	±	2.35		
<b>LC Ind. D3</b>	=	104.21	-	108.90		

**Límite de Confianza de la Media (95 %):**

				$x \pm ts/\sqrt{n}$	$t = 4.303$	$(P=0.05)$
					$n = 3$	
<b>LC Med. D1</b>	=	107.11	±	4.303	x	0.29 / 1.73
<b>LC Med. D1</b>	=	107.11	±	0.71		
<b>LC Med. D1</b>	=	106.39	-	107.11		
<b>LC Med. D2</b>	=	107.58	±	4.303	x	0.68 / 1.73
<b>LC Med. D2</b>	=	107.58	±	1.68		
<b>LC Med. D2</b>	=	105.90	-	109.26		
<b>LC Med. D3</b>	=	106.55	±	4.303	x	0.55 / 1.73
<b>LC Med. D3</b>	=	106.55	±	1.35		
<b>LC Med. D3</b>	=	105.20	-	107.91		

**x** = Promedio

**s** = Desviación estándar

**t** = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

**cv** = Coeficiente de variación

**n** = Número de determinaciones





#### 4.6 ROBUSTEZ

➤ **ANALITO CLOTRIMAZOL**

**TABLA N° 37 - ROBUSTEZ A pH: 5,3**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

		<b>Pesos (g)</b>			<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>		0.0147	<b>Muestra</b>	M1	2.1269
<b>Estándar 2</b>		0.0310		M2	1.8962
				M3	1.8397

**Resultados de los estándares y las muestras:**

<b>Estándar St</b>	<b>Numero de Inyecciones</b>	<b>Área por Inyección</b>	<b>Estadística</b>
St1	1	531626	X = 534549.333
	2	537861	DE = 3135.5874
	3	534161	DER = 0.58658522
St2	1	1125398	X = 1123370.67
	2	1121635	DE = 1898.3794
	3	1123079	DER = 0.16898958

<b>Muestras M</b>	<b>Numero de Inyecciones</b>	<b>Área por Inyección</b>	<b>Estadística</b>	<b>Porcentaje St1</b>	<b>Porcentaje St2</b>
M1	1	795193	X = 792743	102.497881	102.8546567
	2	791329	DE = 2130.16337		102.6762689
	3	791707	DER = 0.26870794		
M2	1	710013	X = 710334.333	103.016836	103.375418
	2	712116	DE = 1644.71345		103.1961269
	3	708874	DER = 0.23154075		
M3	1	686537	X = 686982	102.689938	103.0473823
	2	686527	DE = 779.438901		102.8686602
	3	687882	DER = 0.11345842		

**TABLA N° 38 - ROBUSTEZ A pH: 4,3**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

		<b>Pesos (g)</b>			<b>Pesos (g)</b>
<b>Estándar 1</b>		0.0147	<b>Muestra</b>	M1	2.1345
<b>Estándar 2</b>		0.0310		M2	1.8894
				M3	1.8218

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	524361	X = 525827
	2	526218	DE = 1314.85018
	3	526902	DER = 0.25005376
St2	1	1114933	X = 1113294.67
	2	1118299	DE = 5993.85138
	3	1106652	DER = 0.53838858

Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
M1	1	778917	X = 779023.333	102.030205	101.6262433
	2	778453	DE = 630.263701		101.8282242
	3	779700	DER = 0.08090434		
M2	1	685401	X = 687976.333	101.794436	101.3914077
	2	690034	DE = 2359.48222		101.5929218
	3	688494	DER = 0.34295979		
M3	1	658079	X = 661564.667	101.518702	101.1167656
	2	660311	DE = 4253.40056		101.3177339
	3	666304	DER = 0.64293043		

**TABLA N° 39- RESULTADOS OBTENIDOS CON AMBOS pH**

PARÁMETRO	M1		M2		M3		Promedio		DE	DER
	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%		
pH: 4,3	1.0183	101.83	1.0159	101.59	1.0132	101.32	1.0158	101.58	0.2551	0.2511
pH: 5,3	1.0268	102.68	1.0320	103.20	1.0287	102.87	1.0292	102.92	0.2631	0.2556
Condiciones Normales de Trabajo	1.0235	102.35	1.0194	101.94	1.0231	102.31	1.0235	102.35	0.4314	0.4215
							<b>PROMEDIO</b>	102.28		
							<b>DE</b>	0.6725		
							<b>DER</b>	0.6575		

➤ **ANALITO DEXAMETASONA ACETATO**

**TABLA N° 40 - ROBUSTEZ A pH: 5,3**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

	Pesos (g)		Pesos (g)
<b>Estándar 1</b>	0.0176	<b>Muestra</b>	M1 2.1269
<b>Estándar 2</b>	0.0286		M2 1.8962
			M3 1.8397
<b>Peso Molecular 1 (Base)</b>			392.47
<b>Peso Molecular 2 (Sal)</b>			434.50

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	434696	X = 436074.667
	2	436616	DE = 1203.09822
	3	436912	DER = 0.27589271
St2	1	706970	X = 705495.333
	2	702074	DE = 2972.34543
	3	707442	DER = 0.42131327

Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística		Porcentaje St <sub>1</sub>	Porcentaje St <sub>2</sub>
M1	1	621997	X =	620096.333	105.649385	106.1175095
	2	619365	DE =	1660.53044		105.883447
	3	618927	DER =	0.26778588		
M2	1	558504	X =	557609	106.561546	107.0337125
	2	556700	DE =	902.081482		106.7976291
	3	557623	DER =	0.16177671		
M3	1	535824	X =	536259	105.628829	106.0968628
	2	536937	DE =	594.961343		105.8628459
	3	536016	DER =	0.11094664		

**TABLA N° 41 - ROBUSTEZ A pH: 4,3**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

	Pesos (g)
<b>Estándar 1</b>	0.0176
<b>Estándar 2</b>	0.0286

		Pesos (g)
Muestra	M1	2.1345
	M2	1.8894
	M3	1.8218

<b>Peso Molecular 1 (Base)</b>	392.47
<b>Peso Molecular 2 (Sal)</b>	434.50

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	438624	X = 439993.667
	2	440066	DE = 1334.97054
	3	441291	DER = 0.30340676
St2	1	710794	X = 709699.667
	2	713102	DE = 4061.61598
	3	705203	DER = 0.57230067

Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
M1	1	629926	X = 627645	105.605667	106.3928432
	2	625771	DE = 2107.18841		105.9992554
	3	627238	DER = 0.33572934		
M2	1	549329	X = 550707.667	104.680677	105.4609581
	2	552532	DE = 1647.35131		105.0708176
	3	550262	DER = 0.29913353		
M3	1	526789	X = 529129.667	104.311148	105.0886746
	2	527402	DE = 3536.58654		104.6999114
	3	533198	DER = 0.66837805		

**TABLA N° 42 – RESULTADOS OBTENIDOS CON AMBOS pH**

PARÁMETRO	M1		M2		M3		Promedio		DE	DER
	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%		
pH: 4,3	0.0424	106.00	0.0420	105.07	0.0419	104.70	1.0526	105.26	0.6698	0.6364
pH: 5,3	0.0424	105.88	0.0427	106.80	0.0423	105.86	1.0618	106.18	0.5370	0.5058
Condiciones Normales de Trabajo	0.0427	106.69	0.0421	105.33	0.0424	106.08	1.0725	106.03	0.6812	0.6424
							<b>PROMEDIO</b>	105.82		
							<b>DE</b>	0.4936		
							<b>DER</b>	0.4664		

#### 4.7 ANÁLISIS COMPARATIVOS CON OTROS PRODUCTOS

**TABLA N° 43 – PESOS Y ÁREAS DEL ANALITO CLOTRIMAZOL EN EL PRODUCTO NOTIZOL**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

	Pesos (g)		Analista
<b>Estándar 1</b>	0.0177	Notizol	M1 1.7830
<b>Estándar 2</b>	0.0312		M2 1.7500
			M3 1.8005

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	635136	X = 635065
	2	637002	DE = 1973.45813
	3	633057	DER = 0.310749
St2	1	1105273	X = 1109633
	2	1111813	DE = 3775.87076
	3	1111813	DER = 0.34028104

Productos Similares	Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
Notizol	M1	1	638493	X = 637127	99.5932156	100.4731219
		2	637974	DE = 1934.00284		100.0331687
		3	634914	DER = 0.3035506		
	M2	1	628393	X = 629083.333	100.190194	101.0753749
		2	628964	DE = 757.086741		100.6327846
		3	629893	DER = 0.12034761		
	M3	1	648953	X = 649581.333	100.553108	101.4414949
		2	651145	DE = 1362.84714		100.9973014
		3	648646	DER = 0.20980393		

**TABLA N° 44 - PESOS Y ÁREAS DEL ANALITO CLOTRIMAZOL EN EL PRODUCTO NOTIL**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

Pesos (g)		Analista	
Estándar 1	0.0177	M1	1.7908
Estándar 2	0.0312	M2	1.8301
		M3	1.8895

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	635136	X = 635065
	2	637002	DE = 1973.45813
	3	633057	DER = 0.310749
St2	1	1105273	X = 1109633
	2	1111813	DE = 3775.87076
	3	1111813	DER = 0.34028104

Productos Similares	Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
Notil	M1	1	658606	X = 657296.333	102.298487	103.2022947
		2	657484	DE = 1412.87874		102.750391
		3	655799	DER = 0.21495308		
	M2	1	663828	X = 665778.667	101.393506	102.2893183
		2	664287	DE = 2989.96895		101.8414123
		3	669221	DER = 0.44909354		
	M3	1	689107	X = 690437	101.84325	102.743035
		2	691533	DE = 1229.81137		102.2931424
		3	690671	DER = 0.17812072		

**TABLA N° 45 – PESOS Y ÁREAS DEL ANALITO DEXAMETASONA ACETATO EN EL PRODUCTO NOTIZOL**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

Pesos (g)		Analista	
Estándar 1	0.0186	M1	1.7830
Estándar 2	0.0338	M2	1.7500
		M3	1.8005

**Peso Molecular 1 (Base)** 392.47  
**Peso Molecular 2 (Sal)** 434.50

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Número de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	470028	X = 472456.667
	2	471155	DE = 3279.34023
	3	476187	DER = 0.69410392
St2	1	865562	X = 865314
	2	865190	DE = 214.7743
	3	865190	DER = 0.02482039

Productos similares	Muestras M	Número de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
Notizol	M1	1	601520	X = 601071.333	95.8934349	95.14388536
		2	601815	DE = 1043.07254		95.51866012
		3	599879	DER = 0.17353557		
	M2	1	584901	X = 583698.667	94.8778545	94.13624321
		2	583197	DE = 1045.99442		94.50704884
		3	582998	DER = 0.1792011		
	M3	1	598951	X = 598903.667	94.6189336	93.87934616
		2	598455	DE = 426.972286		94.24913986
		3	599305	DER = 0.07129231		

**TABLA N° 46 - PESOS Y ÁREAS DEL ANALITO DEXAMETASONA ACETATO EN EL PRODUCTO NOTIL**

**Pesos de los estándares y las muestras:**

	Pesos (g)
<b>Estándar 1</b>	0.0186
<b>Estándar 2</b>	0.0338

		Analista
Notil	M1	1.7908
	M2	1.8301
	M3	1.8895

**Peso Molecular 1 (Base)** 392.47

**Peso Molecular 2 (Sal)** 434.50

**Resultados de los estándares y las muestras:**

Estándar St	Número de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística
St1	1	470028	X = 472456.667
	2	471155	DE = 3279.34023
	3	476187	DER = 0.69410392
St2	1	865562	X = 865314
	2	865190	DE = 214.7743
	3	865190	DER = 0.02482039

Productos similares	Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
Notil	M1	1	513588	X = 511674	101.594566	100.8004537
		2	510122	DE = 1761.12805		101.1975098
		3	511312	DER = 0.34418947		
	M2	1	519109	X = 520770.667	101.180287	100.3894132
		2	520248	DE = 1975.55418		100.7848503
		3	522955	DER = 0.37935205		
	M3	1	541657	X = 545106.333	102.57902	101.7772131
		2	546583	DE = 2997.48717		102.1781167
		3	547079	DER = 0.54989036		

**TABLA N° 47 - ANÁLISIS COMPARATIVO**

**RESULTADOS:**

PARÁMETRO	M1		M2		M3		Promedio		DE	DER
	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%	g/100g	%		
<b>* CLOTRIMAZOL</b>										
NOTIL	1.0275	102.75	1.0184	101.84	1.0229	102.29	1.0253	102.53	0.6067	0.5917
NOTIZOL	1.0003	100.03	1.0063	100.63	1.0099	100.99	1.0055	100.55	0.4850	0.4823
<b>* DEXAMETASONA</b>										
NOTIL	0.0405	101.20	0.0403	100.78	0.0409	102.18	0.0406	101.39	0.7184	0.7086
NOTIZOL	0.0478	95.52	0.0473	94.51	0.0471	94.25	0.0474	94.76	0.6709	0.7080

## **V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **DESARROLLO DEL METODO ANALITICO**

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la cuantificación de clotrimazol y Dexametasona Acetato, la cual no figura en ninguna obra oficial; como se sabe éste tipo de análisis presenta mayores ventajas en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos.

Para determinar las mejores condiciones cromatográficas se efectuaron diferentes ensayos en relación al tipo de fase estacionaria, proporción de los componentes de la fase móvil y pH de la fase móvil.

Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación del método desarrollado.

### **SELECTIVIDAD**

Al comparar los tiempos de retención de la **tabla N° 4**, se deduce que el método analítico nos permite obtener picos Cromatográficos de clotrimazol y dexametasona acetato con tiempos de retención similares, tanto para el estándar como para la muestra.

Los excipientes presentes en la formulación no interfieren con los tiempos de retención de los principios activos.

El análisis de placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con los picos de los principios activos, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de dexametasona acetato al realizar el análisis del principio activo sometido a estrés para que generen los compuestos potencialmente interferentes y para el caso de clotrimazol observamos en la figura N° 3 que su compuesto relacionado no interfiere con ninguno de los picos principales.

## **LINEALIDAD**

### **➤ ANALITO CLOTRIMAZOL**

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados registrados en la **tabla N° 8**, se obtuvo la ecuación de la recta de regresión lineal (concentración vs. área) que se expreso según:

$$y = 1863256 x + 3144$$

El coeficiente de correlación lineal (**r**) fue de: 0.999987

En la tabla de significación de “r”, para n-2 grados de libertad, el valor obtenido supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9% (significativa al 1 por mil) ya que  $r(13,0,001) = 0.760$

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fue de 0.999974. Lo que significa que la variable independiente explica un 99.99% de la varianza total de “y”.

Al aplicar el test de linealidad en la **tabla N° 9**, el coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) fue de 0.40, lo que demuestra que los factores de respuestas son semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Aplicando el test de Cochran se obtuvo un valor de  $G_{exp} = 0.5937$  vs  $G_{tabla} = 0.6838$

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$ , significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Mediante los resultados de la **tabla N° 10**, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, al realizar la aplicación del test de hipótesis nula ( $b=0$ ) y obtenerse un valor  $t_{exp} = 705.381$  y  $t_{tabla} = 2.160$  (valor de t para n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%).

Al ser  $t_{exp} > t_{tabla}$  significa que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, incluso superior al 99,9% Si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión.

Para el caso del test de proporcionalidad los límites de confianza para el intercepto van desde (615 – 5673) como estos límites no incluyen al cero el método presenta sesgo y aplicando el test de “t” y obtener un “t” experimental de 2,686 mayor del  $t_{\text{tabla}}$  que es 2,160, nos demuestra que la probabilidad de ser diferente a cero es elevada. En el caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre a menos dos estándares uno superior y otro inferior y de esta manera se obvia el sesgo del método.

### ➤ **ANALITO DEXAMETASONA ACETATO**

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados registrados en la **tabla N° 38**, se obtuvo la ecuación de la recta de regresión lineal (concentración vs. área) que se expreso según:

$$Y = 35199939 + 3545$$

El coeficiente de correlación lineal (**r**) fue de: 0.999958

En la tabla de significación de “r”, para n-2 grados de libertad, el valor obtenido supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9% (significativa al 1 por mil) ya que  $r(13,0,001) = 0.760$

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fue de 0.999917. Lo que significa que la variable independiente explica un 99.99% de la varianza total de “y”.

Al aplicar el test de linealidad en la **tabla N° 39**, el coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) fue de 0.55, lo que demuestra que los factores de respuestas son semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Aplicando el test de Cochran se obtuvo un valor de  $G_{\text{exp}} = 0.6762$  vs  $G_{\text{tabla}} = 0.6838$

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$ , significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Mediante los resultados de la **tabla N° 40**, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, al realizar la aplicación del test de

hipótesis nula ( $b=0$ ) y obtenerse un valor  $t_{exp} = 395.353$  y  $t_{tabla} = 2.160$  (valor de  $t$  para  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%).

Al ser  $t_{exp} > t_{tabla}$  significa que la probabilidad de ser  $b \neq 0$  es muy elevada, incluso superior al 99,9% si fuera  $b = 0$  significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión.

Para el caso del test de proporcionalidad los límites de confianza para el intercepto van desde (50 – 7040) como estos límites no incluyen al cero el método presenta sesgo y aplicando el test de “ $t$ ” y obtener un “ $t$ ” experimental de 2,191, nos demuestra que la probabilidad de ser diferente a cero es elevada. En el caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre a menos dos estándares uno superior y otro inferior y de esta manera se obvia el sesgo del método.

## **EXACTITUD**

### **➤ ANALITO CLOTRIMAZOL**

De la **tabla N° 16**, al aplicar el test de igualdad de varianzas (test G de Cochran) para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor  $G_{exp} = 0.5789$  vs  $G_{tabla} (0.05,3,3) = 0.8709$

Donde  $k$  = número de grupos y  $n$  = número de determinaciones por grupo.

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Asimismo el porcentaje de recuperación que se obtuvo fue satisfactorio (media = 100.30%), para confirmar se aplicó el test de Student cuyos resultados fueron  $t_{exp} = 1.923$  vs  $t_{tabla} = 2.306$ .

Al ser  $t_{exp} < t_{tabla}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmándose que el método es exacto.

### ➤ **ANALITO DEXAMETASONA ACETATO**

De la **tabla N° 46**, al aplicar el test de igualdad de varianzas (test G de Cochran) para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor  $G_{\text{exp}} = 0.8621$  vs  $G_{\text{tabla}} (0.05; 3; 3) = 0.8709$ .

Donde  $k$  = número de grupos y  $n$  = número de determinaciones por grupo.

Al ser  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Asimismo el porcentaje de recuperación que se obtuvo fue satisfactorio (media 100.36%), para confirmar se aplicó el test de Student cuyos resultados fueron  $t_{\text{exp}} = 2.273$  vs  $t_{\text{tabla}} = 2.306$

Al ser  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmándose que el método es exacto.

## **PRECISIÓN**

### ➤ **ANALITO CLOTRIMAZOL**

#### ***Precisión intermedia***

Para el estudio de la precisión intermedia se evaluaron los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores que se estudiaron fueron el día y los analistas. Obteniéndose los siguientes resultados de la **tabla N° 27**.

Coeficiente de Variación (CV) = 0.33

Límite de confianza individual (95%):  $x \pm ts = 101.63\% - 103.18\%$

Límite de confianza de la media (95%) =  $x \pm ts/\sqrt{n} = 102.14\% - 102.66\%$

Siendo el valor de  $t = 2.305$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los resultados estuvieron entre 1,0163 g/100g – 1,0318 g/100g (101.63% - 103.18%).

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo del producto terminado se encuentra con una probabilidad del 95% entre 1,0214g/100g – 1,0266 g/100g (102.14% - 102.66%).

***Repetibilidad:***

El estudio de Repetibilidad se efectuó sobre una serie de alicuotas de una muestra homogénea por el mismo instrumento y el mismo analista. Obteniéndose los siguientes resultados de la **tabla N° 29**.

Coefficiente de variación (CV) = 0.58

Límite de confianza individual (95%):  $x \pm ts$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los análisis de principio activo, en el caso de producto terminado, estuvieron por día entre:

**LC individual D1 = 100.12% - 105.07%**

**LC individual D2 = 101.12% - 102.15%**

**LC individual D3 = 101.29% - 103.35%**

Límite de confianza de la media (95%):  $x \pm ts / \sqrt{n}$

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo en el producto terminado se encontró por día, con una probabilidad del 95% entre:

**LC media D1 = 101.16% - 104.02%**

**LC media D2 = 101.34% - 101.93%**

**LC media D3 = 101.73% - 102.91%**

➤ ***ANALITO DEXAMETASONA ACETATO***

***Precisión intermedia***

Para el estudio de la precisión intermedia se evaluaron los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores que se estudiaron fueron el día y los analistas.

Obteniéndose los siguientes resultados de la **tabla N° 57**

Coeficiente de Variación (CV) = 0.57

Límite de confianza individual (95%):  $x \pm ts = 105.26\% - 108.06\%$

Límite de confianza de la media (95%):  $x \pm t\sqrt{s} = 106.20\% - 107.13\%$

Siendo el valor de  $t = 2.305$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los análisis estuvieron entre 0,0421g/100g – 0,0432g/100g (105.26% - 108.06%) de principio activo en caso de producto terminado.

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo en el producto terminado se encontró con una probabilidad del 95% entre 0,0425g/100g – 0,0429g/100g (106.25% - 107.13%)

### ***Repetibilidad:***

El estudio de Repetibilidad se efectuó sobre una serie de alicuotas de una muestra homogénea por el mismo instrumento y el mismo analista. Obteniéndose los siguientes resultados de la **tabla N° 59**.

Coeficiente de variación (CV) = 0.52

Límite de confianza **individual (95%):  $x \pm ts$**

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los análisis de principio activo, en el caso de producto terminado, estuvieron por día entre:

**LC individual D1 = 105.18% - 108.16%**

**LC individual D2 = 104.63% - 109.09%**

**LC individual D3 = 104.57% - 107.60%**

Límite de confianza de la media (95%):  $x \pm ts / \sqrt{n}$

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo en el producto terminado se encontró por día, con una probabilidad del 95% entre:

**LC media D1 = 105.81% - 107.93**

**LC media D2 = 105.57% - 108.15%**

**LC media D3 = 105.21% - 106.96%**

### **ROBUSTEZ**

Para el parámetro que se modificó se obtuvieron resultados que no varían significativamente con el que se trabaja a condiciones normales, obteniéndose para el caso de Clotrimazol una desviación estándar de 0.6725 y para la Dexametasona acetato una desviación estándar de 0.4936; para las tres condiciones.

### **ANÁLISIS COMPARATIVO**

En los productos NOTIL y NOTIZOL los resultados obtenidos los analitos Clotrimazol y Dexametasona se encuentran dentro de especificaciones.

Además en las figuras 17 y 18 se puede observar que en los cromatogramas no se evidenciaría una posible interferencia de algún componente de la matriz con los picos principales.

## **VI. CONCLUSIONES**

- ❖ El método desarrollado es selectivo; ya que no se detectó interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación y/o compuesto relacionado.
- ❖ El método es lineal en el intervalo de concentración del 33,3% hasta 166,6% de la muestra, siendo el 100% igual a 0,4mg/mL de Clotrimazol y 0,018mg/mL de Dexametasona acetato.
- ❖ El método es exacto ya que su capacidad analítica de dar resultados lo más cercano al valor real queda demostrado al no haber diferencia significativa entre la recuperación media de 100,30% y el 100%.
- ❖ El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas, nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles.
- ❖ La validación del presente método analítico solo es aplicable a la formulación del producto mencionado en el Anexo 1.
- ❖ El método es robusto para el parámetro pH de la fase móvil, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando a las condiciones cromatográficas establecidas.
- ❖ Se demuestra la aplicabilidad del método para otros productos similares comercializados en el Perú, ya que se obtuvo resultados muy cercanos al valor declarado.
- ❖ El método analítico desarrollado se encuentra validado y aprobado para los análisis correspondientes de Clotrimazol 1g% + Dexametasona 0,04g% en la crema tópica, según la fórmula del Anexo 1.
- ❖ La utilización del método de análisis para la crema tópica Clotrimazol + Dexametasona 1,0 - 0,04 g/100 g debe estar acorde a la Técnica Analítica desarrollada y al Protocolo de Validación emitido, cualquier modificación en el método analítico significa una revalidación de dicho proceso.

## **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Arthur H. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association Washington, DC Third Edition 2000.
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, Marzo 2001.
3. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de la Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Catalana, España, 2001.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Guía de Protocolos de Validación de Procesos no estériles, Comisión de Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Centro, España, 2001.
5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Procesos de Producción, Formas No estériles, España, 2001.
6. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos de Limpieza, Sección Catalán, Barcelona, Noviembre 1994
7. British Pharmacopeia 2005, Volumen I, Páginas: 518 – 519 (Clotrimazol), Páginas: 608 – 609 (Dexametasona acetato).
8. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (DEF). Editorial PLM 17<sup>a</sup> Edición, Lima, 2005.
9. García Shimizu, Rosemary. Validación del método de valoración de la Clorfenamina Maleato presentación jarabe, por HPLC y análisis comparativo de productos comercializados en el país. Lima, 2000.
10. Gestión de Calidad; Garantía permanente de la Calidad [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.tecservice.com.ar>. Acceso: Febrero 2006.
11. Gessner G. Hawley, Diccionario de Química y productos Químicos, Editorial Omega S.A. Barcelona, 2da edición.

12. Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Mc Graw – Hill Interamericana, 9<sup>na</sup> Edición, México 1998.
13. Guía de la Organización Mundial de la salud (OMS) sobre los requisitos de las Buenas Practicas de manufactura (BPM). Segunda parte: Validaciones, Ginebra 1998.
14. Guía para Validar Métodos y Tópicos Relacionados [Sitio en Internet] Disponible en: <http://www.analitica.cl>. Acceso: Enero 2006.
15. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. Text on Validation of Analytical Procedures Q2A. Switzerland, Octubre 1994.
16. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. Switzerland, Noviembre 1996.
17. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura, DIGEMID. Lima – Perú, Diciembre 1999.
18. Protocolo de Validación de Métodos analíticos para la Cuantificación de Fármacos [Sitio en Internet] disponible en: <http://www.sld.cu>. Acceso: Marzo 2006.
19. Quattrochi O., Abelaria de Andrizzi S., Laba R., Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Bases de la Separación. Capítulo 3, Desarrollo de Métodos. Capítulo 11, Validación de Métodos Analíticos. Capítulo 12. Argentina 1992.
20. Silva Cajas, Guido Vidal. Validación del método de valoración de Glimepiride presentación comprimido de 4 mg. por el método de cromatografía líquida de alta performance HPLC. Lima, 2004.
21. Skoog D., West D., Química analítica, Editorial Mc GRAW – HILL, Capítulo 18 “Métodos Cromatográficos”, 4ta Edición México 1994.
22. The Merck Index; an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Tenth Edition 1983. USA.

23. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 28 ed. January, 2005. p. 2748-2751. USA.
24. Validación de Métodos Analíticos [Sitio en Internet] Disponible en <http://www.genium.udistrital.edu.com>. Acceso: Diciembre 2005
25. Zaravia García, Jessica Griselda. Desarrollo y validación de una técnica analítica de dosaje de Fenilpropanolamina clorhidrato, Clorfenamina maleato y Cafeína en tabletas por el método de HPLC. Lima, 2004. Tesis.

## VIII. ANEXOS

### **CONTENIDO:**

**ANEXO 1:** Fórmula con la que se desarrolló la Validación del Método Analítico.

**ANEXO 2:** Flujograma de Validación de Técnicas Analíticas.

**ANEXO 3:** Cromatogramas obtenidos en la Validación.

- **Figura N° 1** - Cromatograma del Estándar mixto.
- **Figura N° 2** - Cromatograma del Estándar mixto.
- **Figura N° 3** - Cromatograma del Estándar mixto más el compuesto Relacionado A.
- **Figura N° 4** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 66,6%.
- **Figura N° 5** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 100%.
- **Figura N° 6** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 133,3%.
- **Figura N° 7** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 166,6%.
- **Figura N° 8** - Curva de calibración de los resultados obtenidos en la linealidad, donde se observa que para el analito Dexametasona acetato el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 0.9998, así como para el analito Clotrimazol el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9999, estos valores confieren la linealidad del método.
- **Figura N° 9** - Cromatograma de la muestra de una solución al 33,3%.
- **Figura N° 10** - Cromatograma de la muestra de una solución al 100%.
- **Figura N° 11** - Cromatograma de la muestra de una solución al 166,6%.
- **Figura N° 12** - Curva de Calibración de los resultados obtenidos en la Exactitud.
- **Figura N° 13** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia, trabajando a pH 5,3 la fase móvil.
- **Figura N° 14** - Cromatograma de la muestra, trabajando a pH 5,3 la fase móvil.
- **Figura N° 15** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia, trabajando a pH 4,3 la fase móvil.
- **Figura N° 16** - Cromatograma de la muestra, trabajando a pH 4,3 la fase móvil.
- **Figura N° 17** - Cromatograma de la muestra del producto de comparación Notizol.
- **Figura N° 18** - Cromatograma de la muestra del producto de comparación Notil.

**ANEXO 4:** Significados de abreviaturas y símbolos.

**ANEXO 1: FÓRMULA CON LA QUE SE DESARROLLO LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

**PRODUCTO:** Dexametasona Acetato + Clotrimazol

**FORMA FARMACÉUTICA:** crema

**FÓRMULA DECLARADA:** Cada 100g contiene:

Clotrimazol 1.0 g

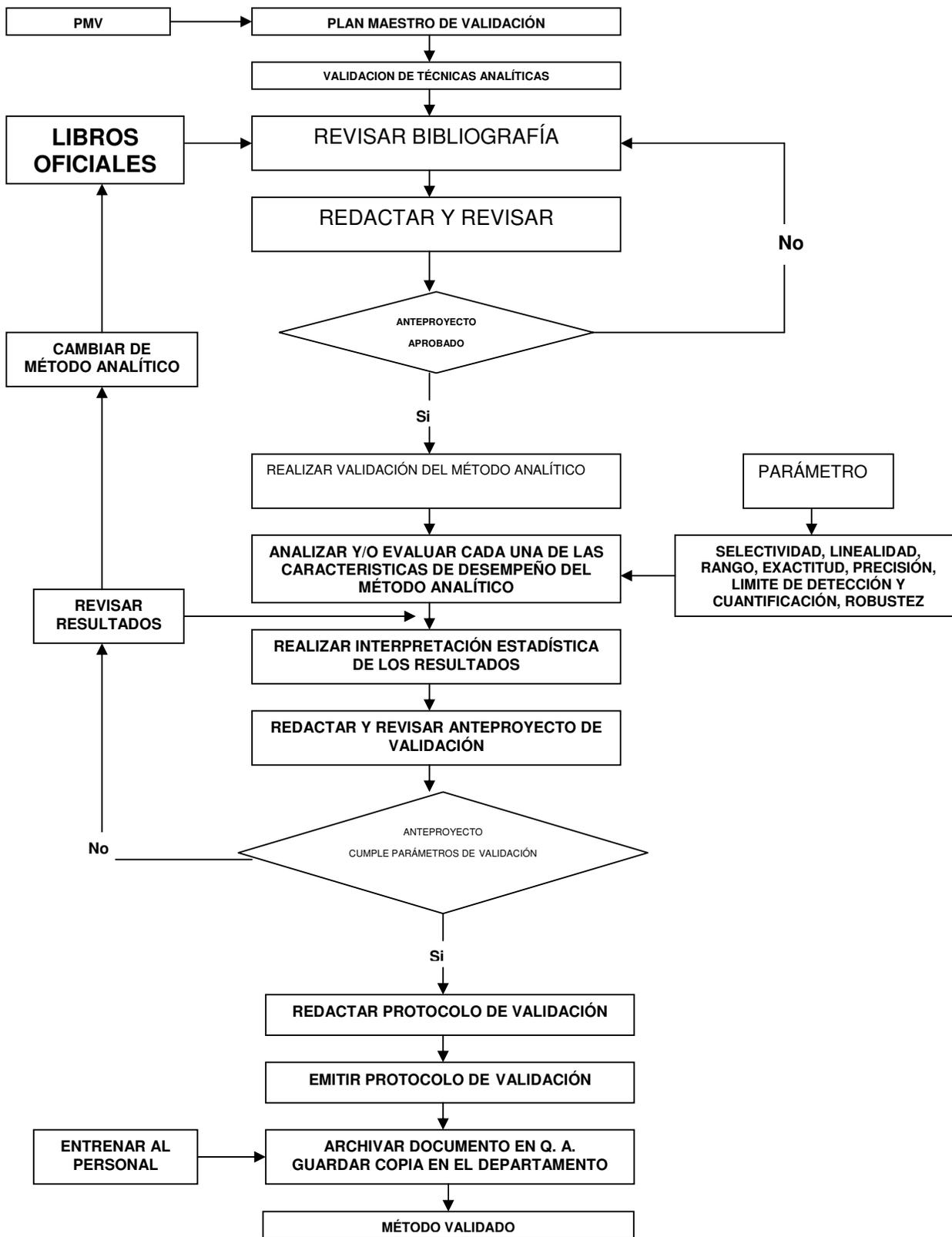
Dexametasona Acetato 0.044 g

equivalente a dexametasona 0.040 g

**LOTE ESTÁNDAR:**

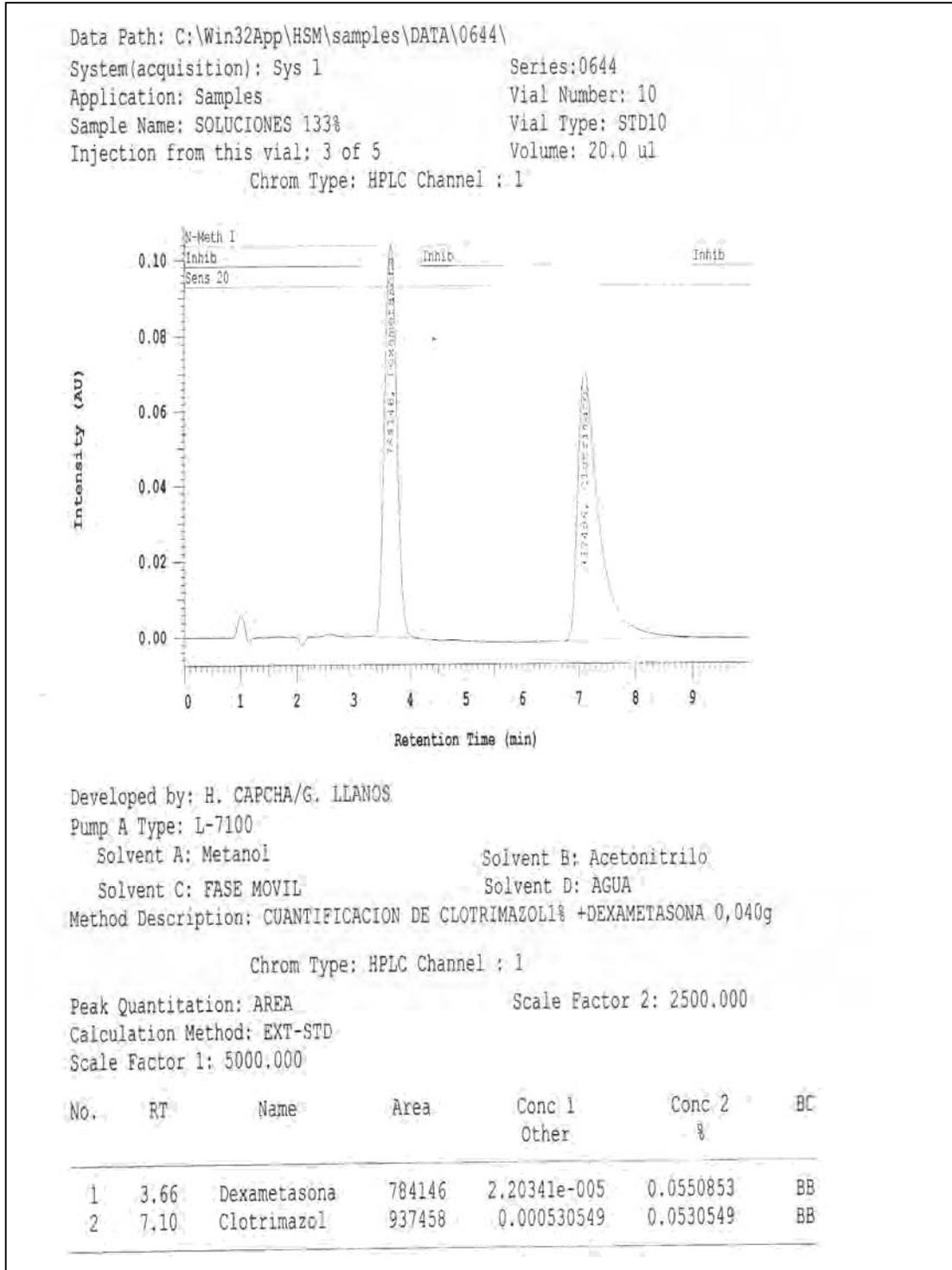
DESCRIPCIÓN	FÓRMULA DECLARADA x 100 g		LOTE ESTÁNDAR x 5 Kg	
	CANTIDAD	UNIDAD	CANTIDAD	UNIDAD
Clotrimazol	1,000	g	5,000	Kg
Dexametasona acetato	0,044	g	0,220	Kg
Metilparabeno	0,150	g	0,750	Kg
Propilparabeno	0,050	g	0,250	Kg
Propilenglicol	2,400	g	12,00	Kg
Polisorbato 80	0,017	g	0,085	Kg
Ceteareth 25	1,500	g	7,500	Kg
Ceteareth 6 + Alcohol Estearílico	1,500	g	7,500	Kg
Alcohol Bencílico	0,500	g	2,500	Kg
Alcohol Cetoestearílico	7,000	g	35,00	Kg
Miristato de Isopropilo	2,000	g	10,00	Kg
Aceite Mineral	12,00	g	60,00	Kg
Agua purificada c.s.p.	100,0	g	5,000	Kg

## ANEXO 2: FLUJOGRAMA DE VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS

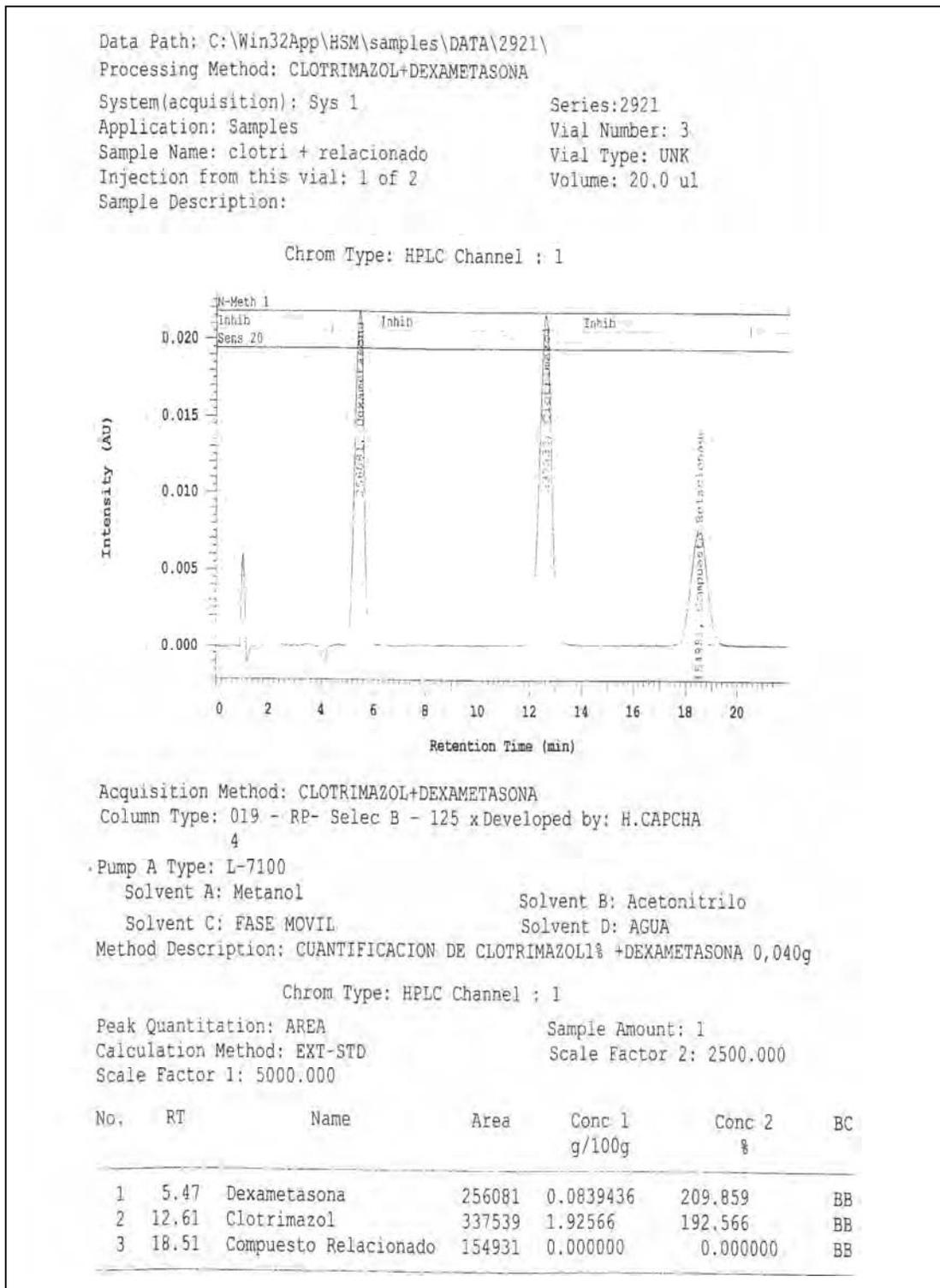




**Figura N° 2 - Cromatograma del Estándar mixto**

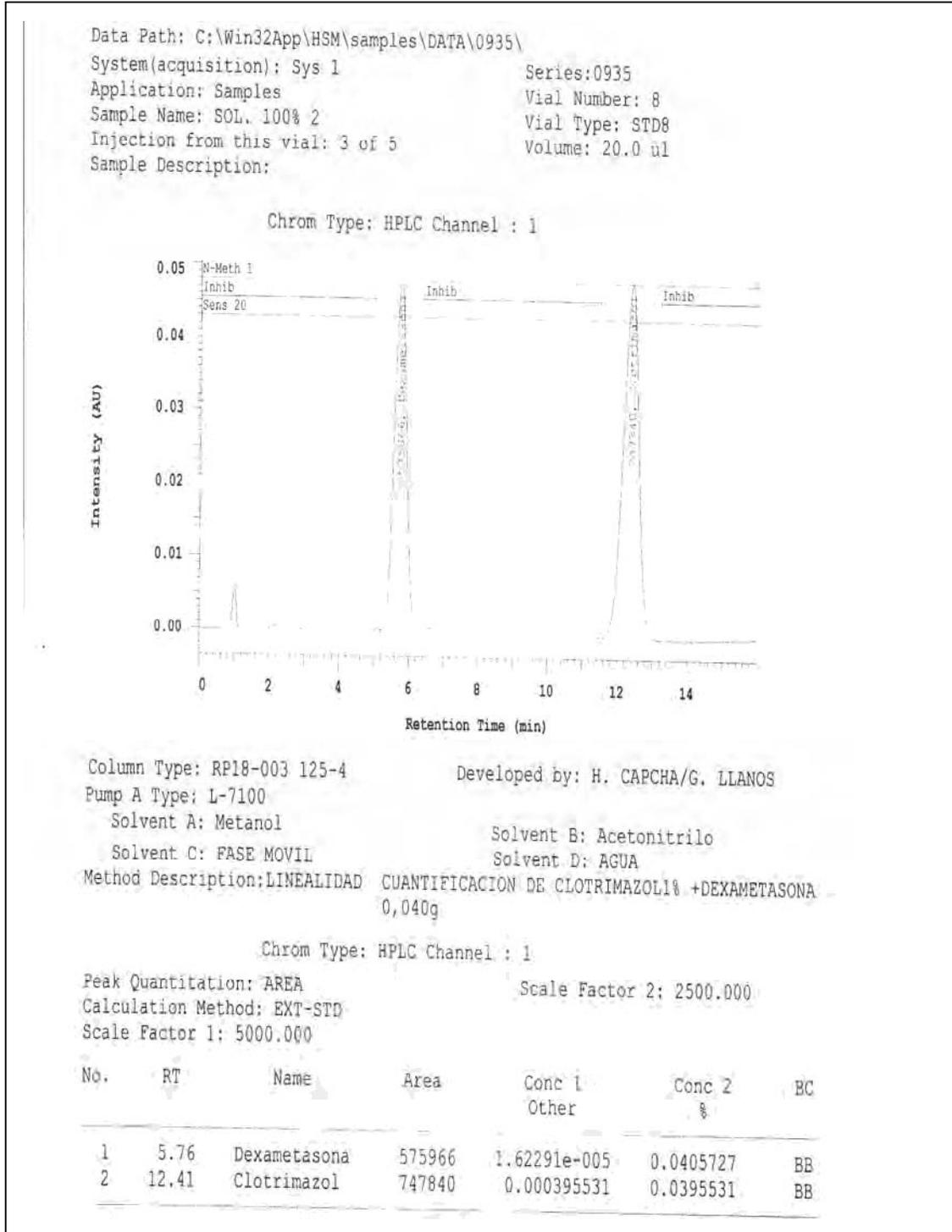


**Figura N° 3 - Cromatograma del Estándar mixto más el compuesto Relacionado A**

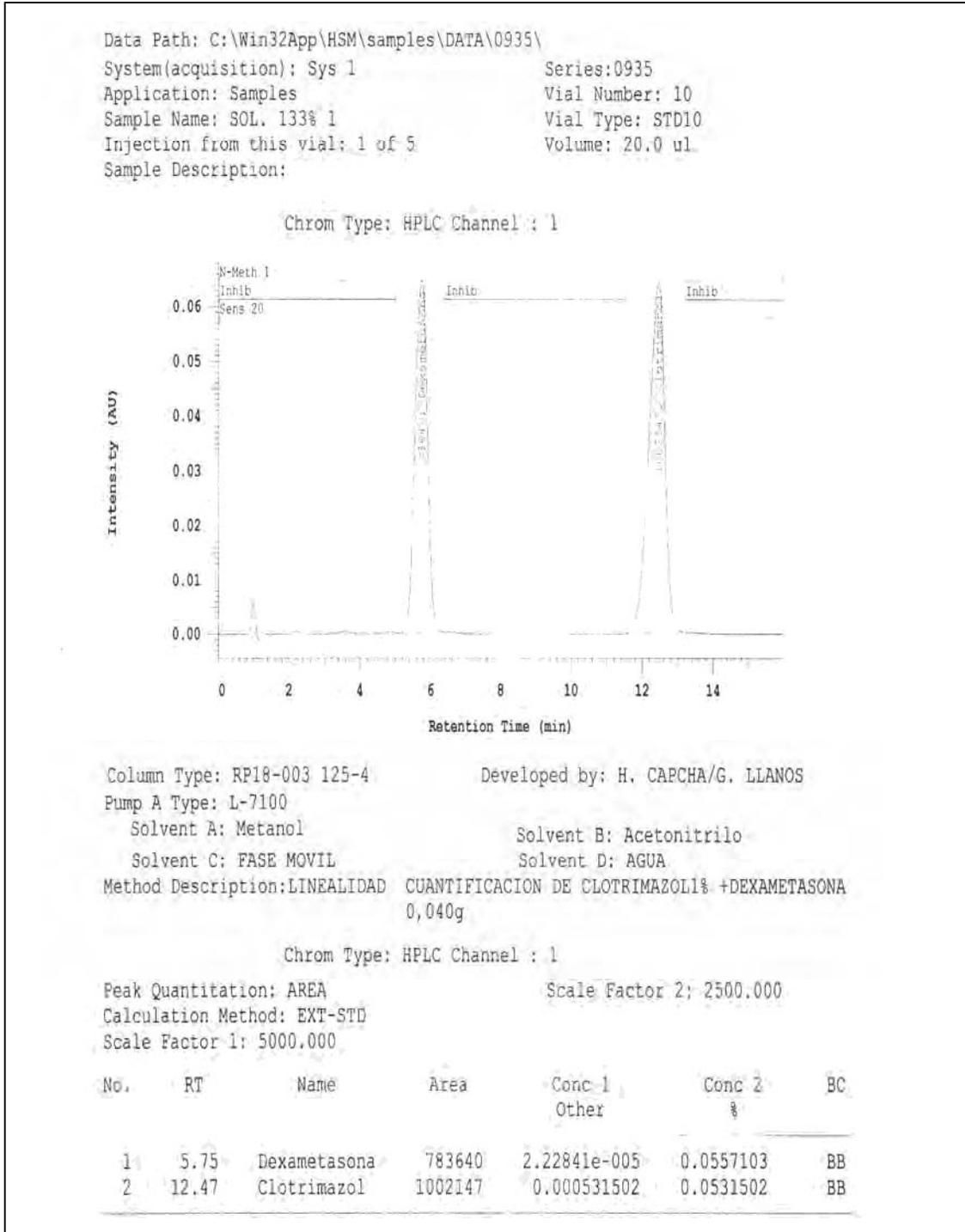




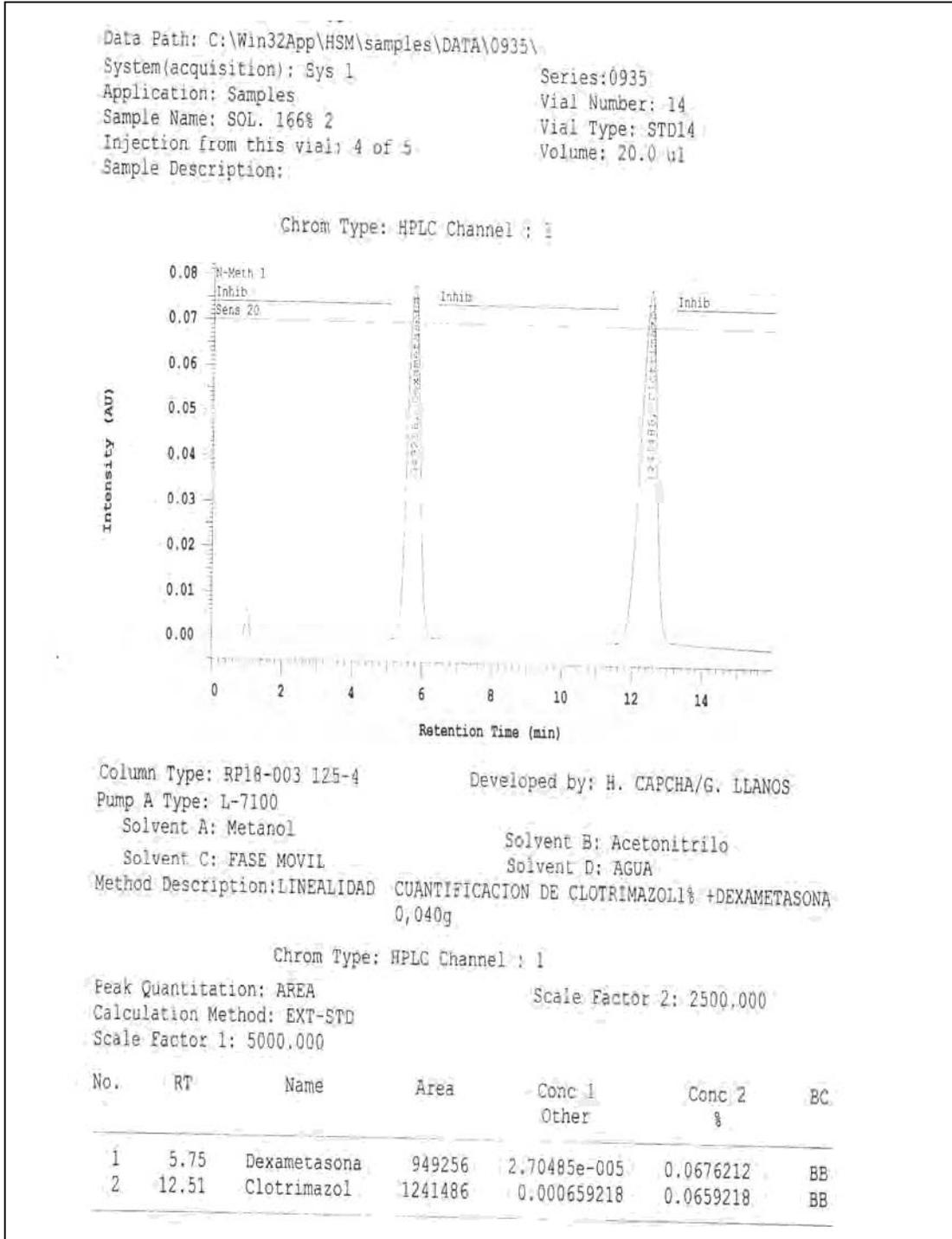
**Figura N° 5 - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 100%**



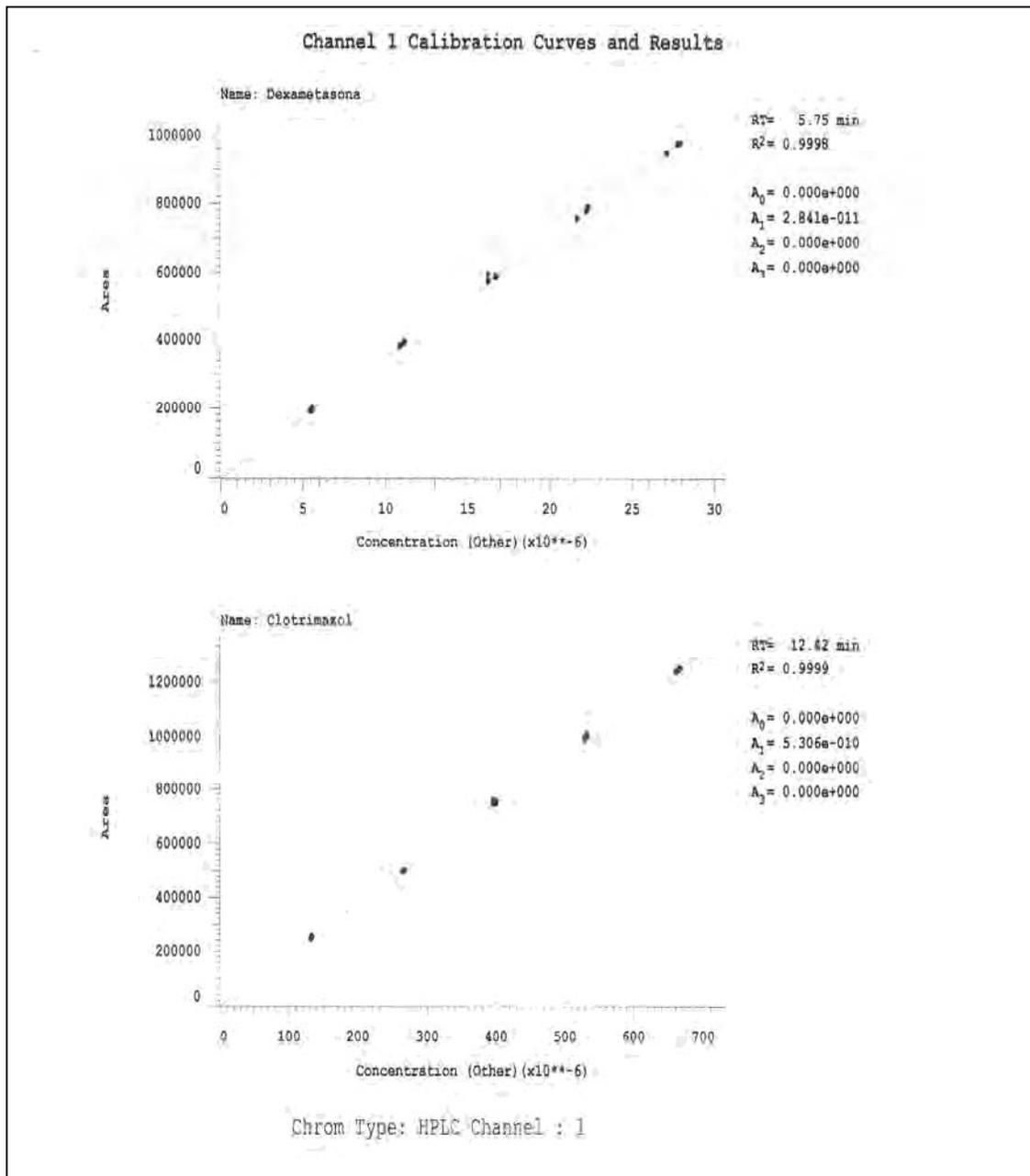
**Figura N° 6 - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 133,3%**



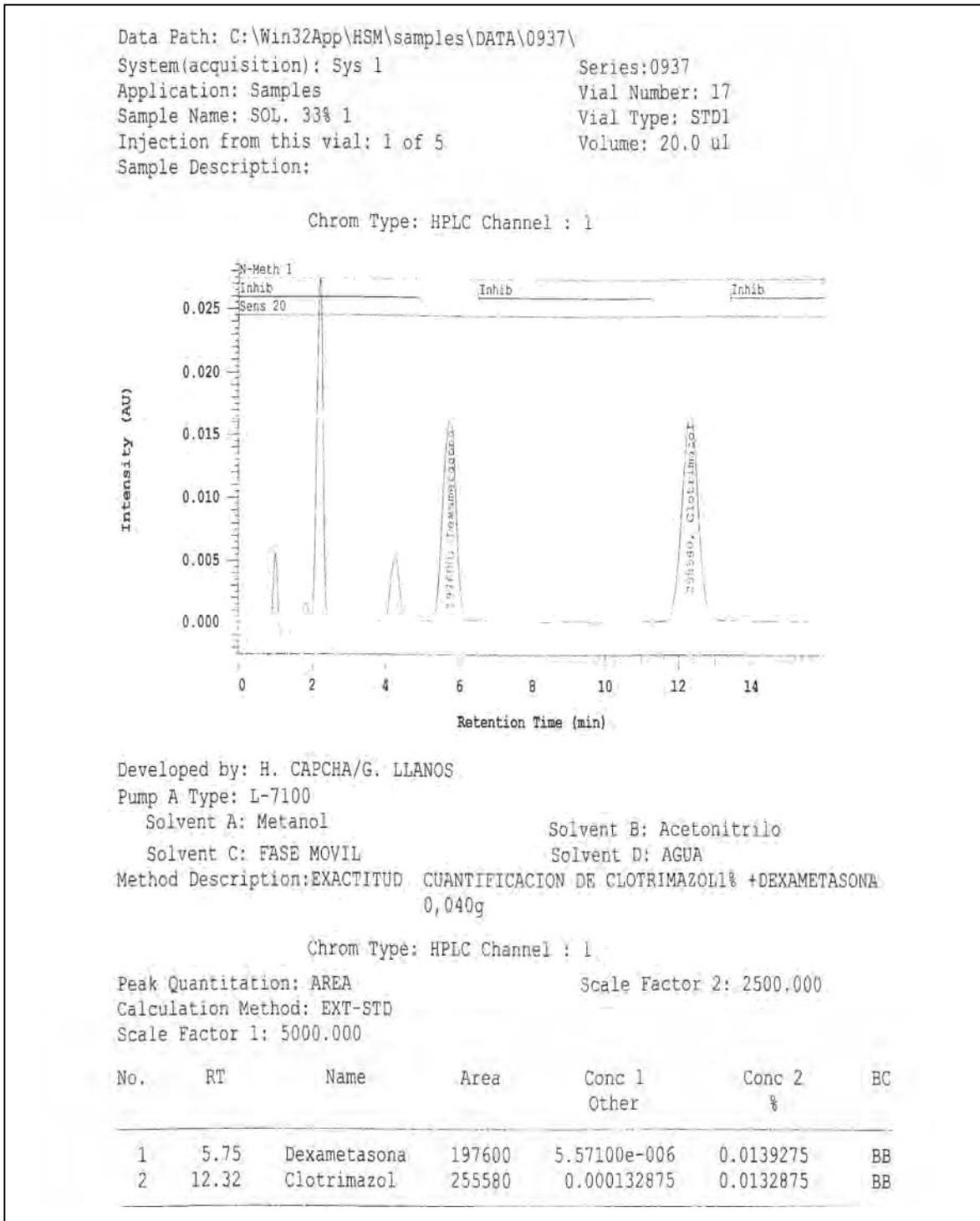
**Figura N° 7 - Cromatograma del Estándar mixto de referencia de una solución al 166,6%**



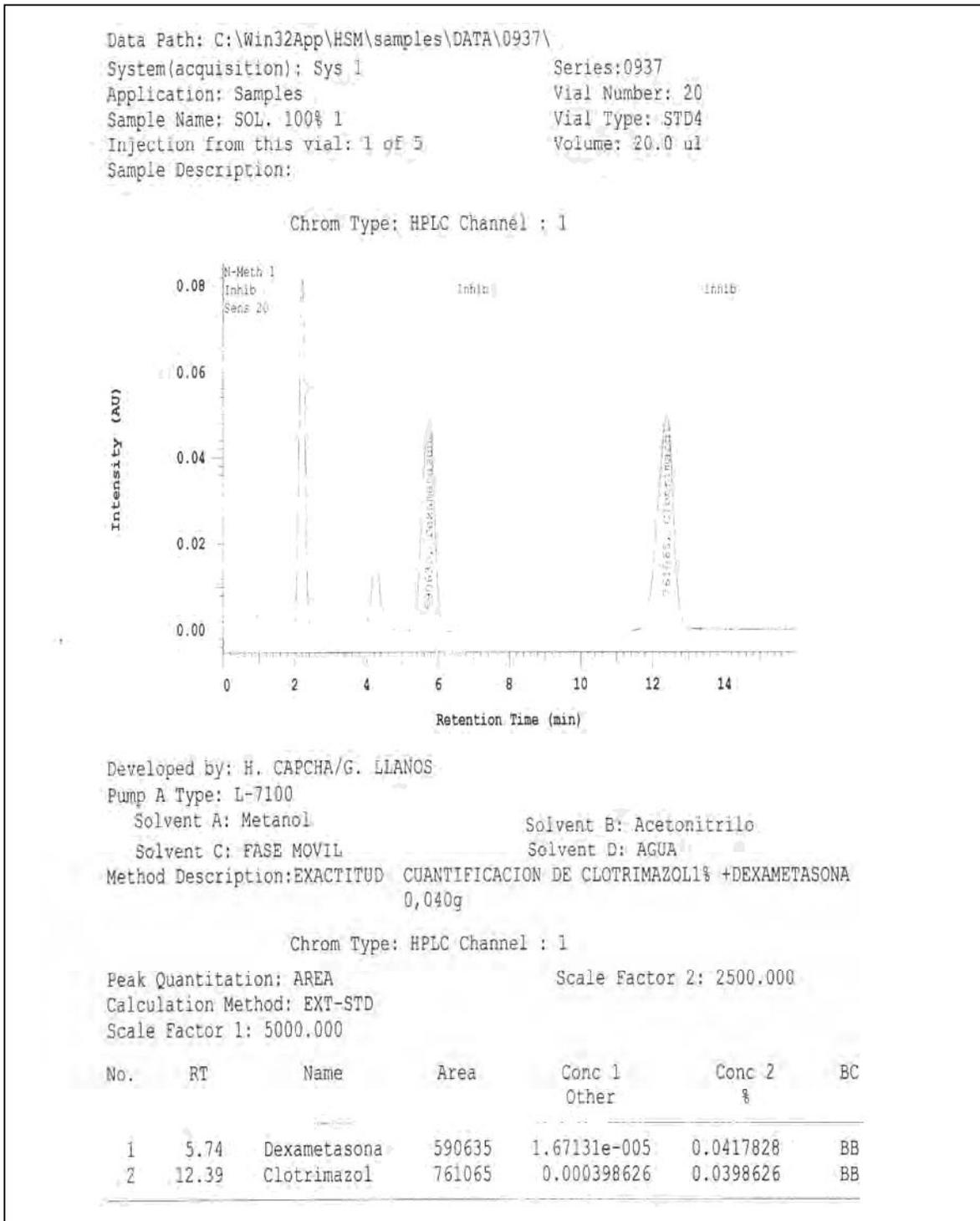
**Figura N° 8** - Curva de calibración de los resultados obtenidos en la linealidad, donde se observa que para el analito Dexametasona acetato el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 0.9998, así como para el analito Clotrimazol el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9999, estos valores confieren la linealidad del método.



**Figura N° 9 - Cromatograma de la muestra de una solución al 33,3%**



**Figura N° 10 - Cromatograma de la muestra de una solución al 100%**



**Figura N° 11 - Cromatograma de la muestra de una solución al 166,6%**

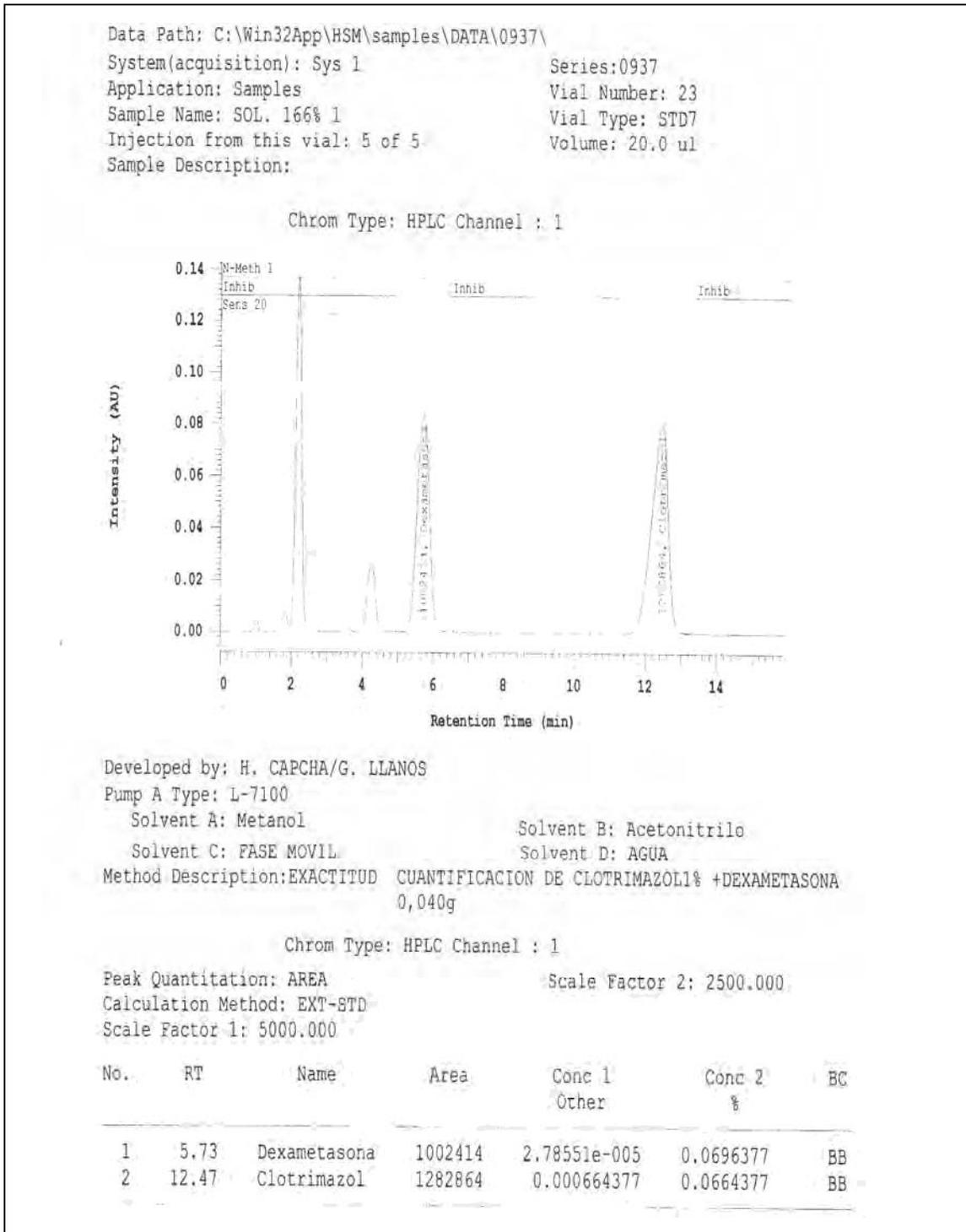
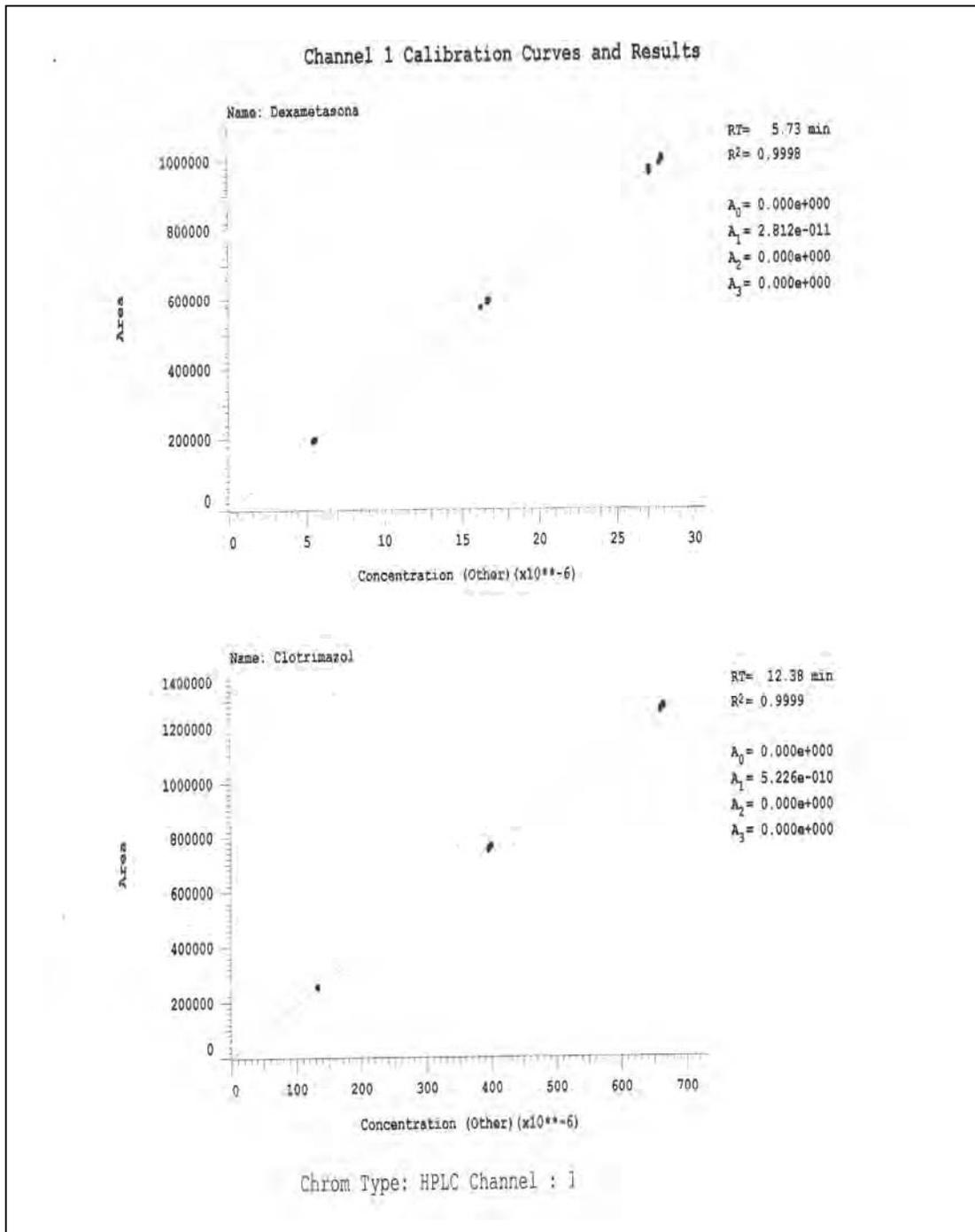
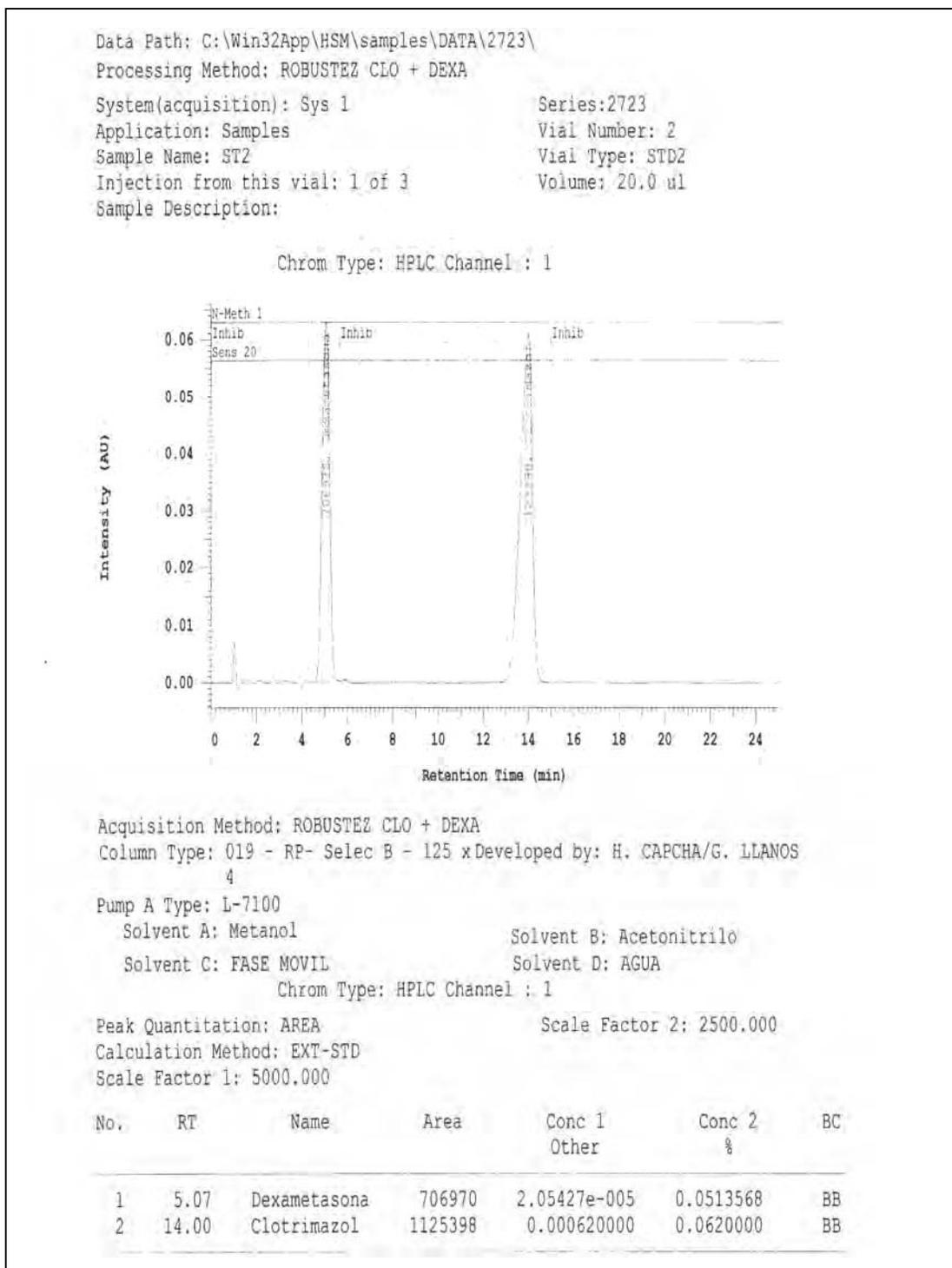


Figura N° 12 – Curva de Calibración de los resultados obtenidos en la Exactitud



**Figura N° 13** - Cromatograma del Estándar mixto de referencia, trabajando a pH 5,3 la fase móvil







**Figura N° 16 - Cromatograma de la muestra, trabajando a pH 4,3 la fase móvil**

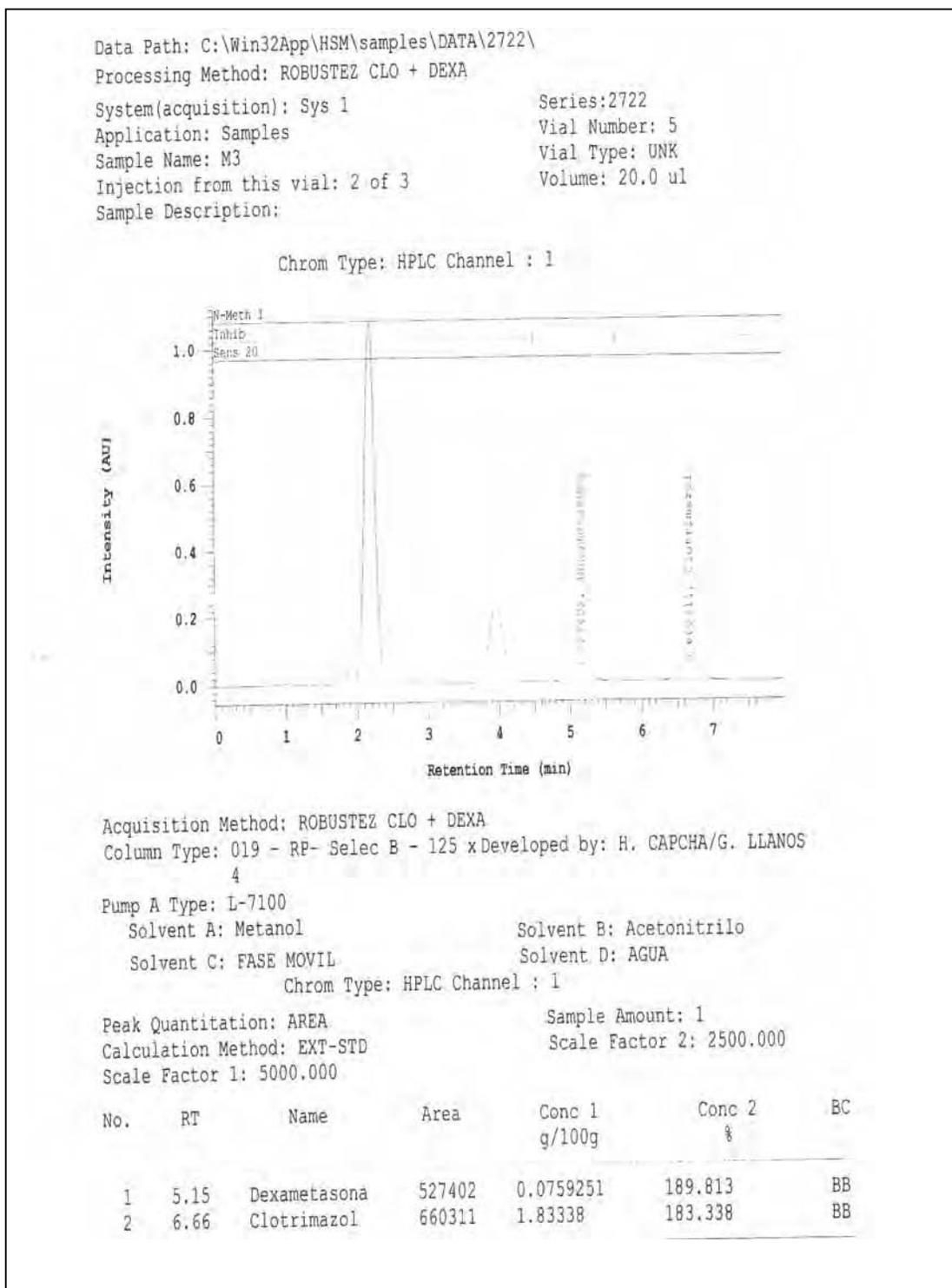


Figura N° 17 - Cromatograma de la muestra del producto de comparación Notizol

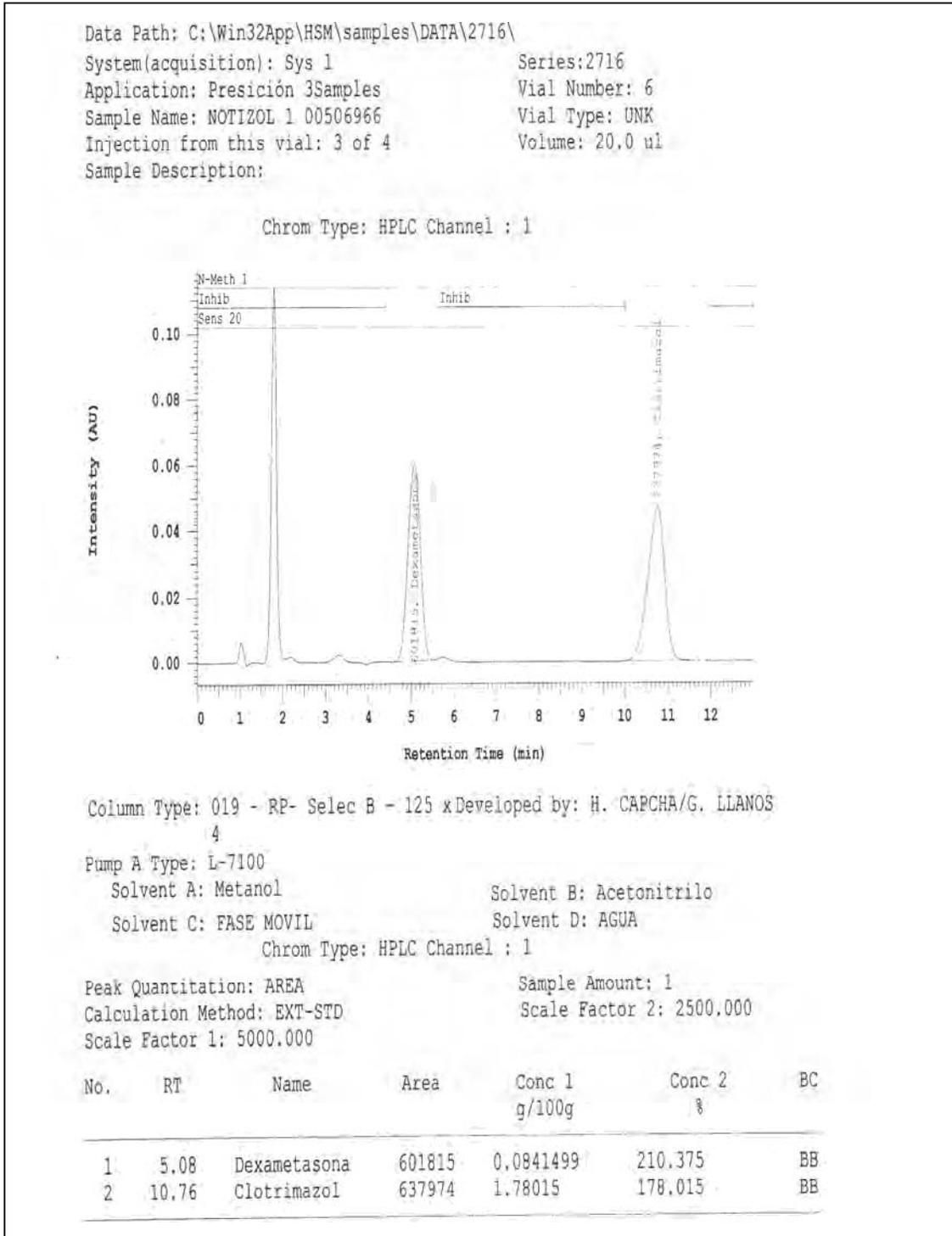
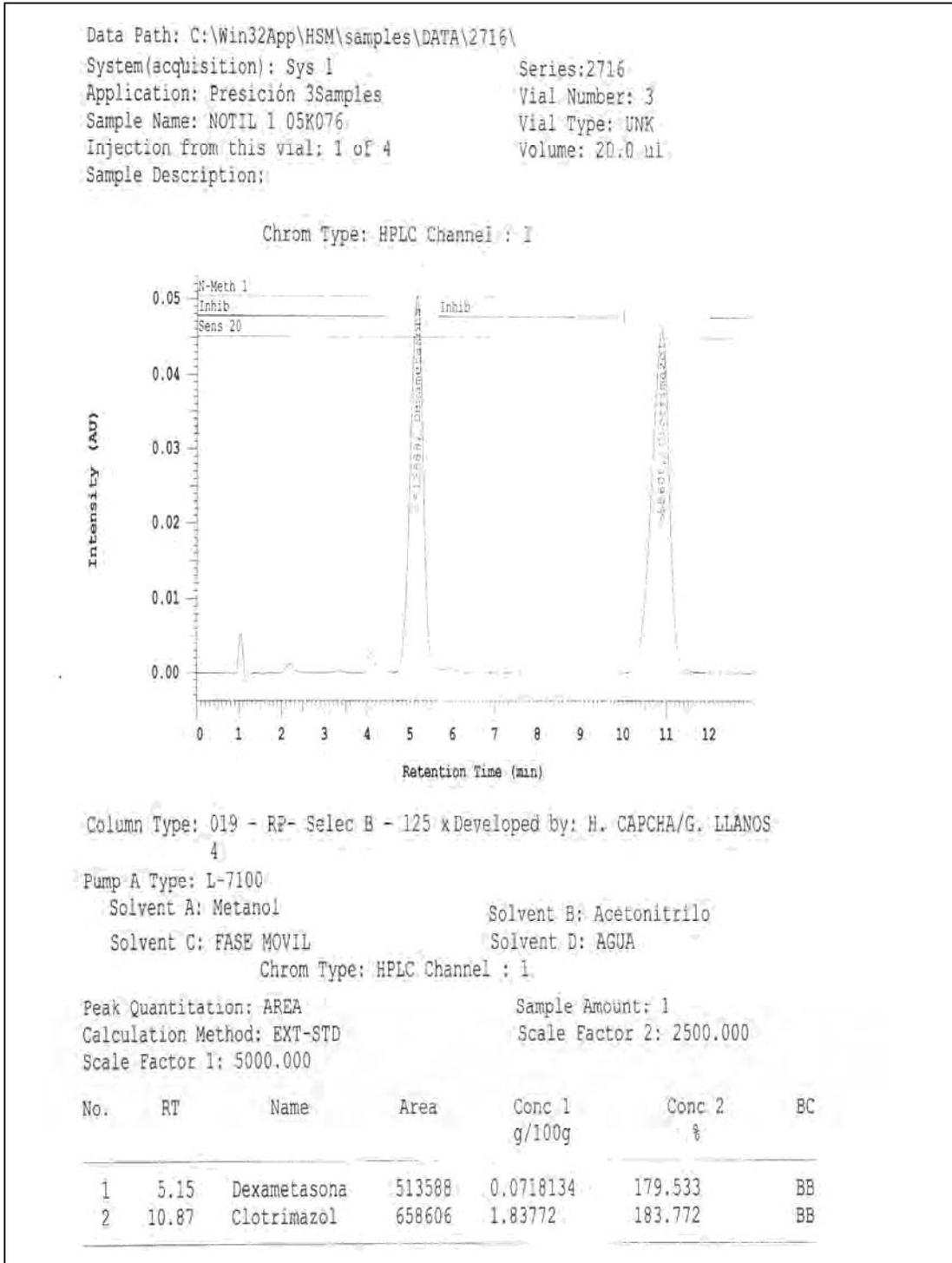


Figura N° 18 - Cromatograma de la muestra del producto de comparación Notil



#### **ANEXO 4: SIGNIFICADOS DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

<b>a</b>	Termino independiente de la recta de regresión
<b>b</b>	Pendiente de la recta regresión o curva de calibración
<b>f</b>	Factor de respuesta
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>K'</b>	Factor de capacidad
<b>n</b>	Tamaño de la muestra
<b>r</b>	Coeficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>s(DE)</b>	Desviación estándar de una muestra
<b>s<sup>2</sup></b>	Varianza de una muestra
<b>Sx</b>	Desviación estándar de la muestra
<b>t</b>	Test estadístico de Student
<b>tr</b>	Tiempo de retención de un analito
<b>t<sub>0</sub></b>	Tiempo muerto
<b>x</b>	variable independiente (valor nominal)
<b>y</b>	Variable dependiente (valor experimental)
<b>ŷ</b>	Valor estimado o calculado de la variable dependiente
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical chemist
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>BPL (GLP)</b>	Buenas Practicas de Laboratorio
<b>CV(CV%)</b>	Coeficiente de variación
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>G</b>	Test estadístico de la prueba de homogeneidad de varianza de cochran
<b>GMP (BPM)</b>	Buenas Practicas de Manufactura
<b>GALP</b>	Buenas Practicas de laboratorio automatizado
<b>HPLC</b>	Cromatografía liquida de alta Performance
<b>IC (LC)</b>	Intervalo de confianza
<b>ICH</b>	International conference of Harmonisation
<b>ISO</b>	International Organization for Standarizacion
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied chemistry
<b>ID</b>	Calificación del diseño

<b>IQ</b>	Calificación de Instalación
<b>K'</b>	Numero de grupos
<b>LC</b>	Limite de cuantificación
<b>LD</b>	Limite de detección
<b>MQ</b>	Calificación de mantenimiento
<b>M1,2,3</b>	Muestra 1,2,3
<b>n</b>	Numero de platos teóricos
<b>PQ</b>	Calificación de operación
<b>OMS</b>	Organización Mundial de salud
<b>PMV</b>	Plan Maestro de Validaciones
<b>PQ</b>	Calificación de desempeño
<b>R(R%)</b>	Porcentaje de recuperación
<b>Rs</b>	Resolución (Cromatografía)
<b>R1,2,3</b>	Resultado 1,2,3
<b>SOP</b>	Procedimiento de Operación estándar
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VL</b>	Validación de limpieza
<b>VP</b>	Validación de proceso
<b>VT</b>	Validación de técnica
<b>w</b>	Anchura de pico cromatográfico