

34
24

JUN 24 1998
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"MODIFICACION AL METODO ANALITICO PARA LA
CUANTIFICACION DE DEXAMETASONA
(TABLETAS) EN LA PRUEBA DE DISOLUCION
POR HPLC".

T E S I S

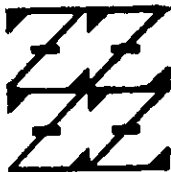
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

OLGA ELVIRA JUAREZ GARCIA

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
EN NUESTRA REFLEXION

225787-

MEXICO, D. F.

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES

VOCAL: Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

SECRETARIO: Q.F.B. GEORGINA RIOS OLVERA.

SUPLENTE: Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ

SUPLENTE: Q.F.B. ANA PATRICIA PINEDA ZAVALA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

PRODUCTOS FARMACEUTICOS "CHINOIN"

ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

SUSTENTANTE

OLGA ELVIRA JUAREZ GARCIA

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

**FRANCISCA GARCIA ROMERO
ALBANO JUAREZ CRUZ**

**POR SER Y SEGUIR SIENDO EL MAS GRANDE APOYO EN LARGO
DE TODA MI EXISTENCIA.**

A MIS HERMANOS:

GUADALUPE, RICARDO, JOSÉ Y GRETEL

POR SU CARIÑO Y PACIENCIA.

A MIS SOBRINOS:

PAOLA. PABLO Y ROSALIA

A MIS AMIGOS:

**GRISELDA, ROCIO, ELIUT, PERLA,
OLGA, MOISES**

AL Q.F.B. DAVID SALAS (JEFE DE LOS LAB. "CHINOIN")
POR LA OPORTUNIDAD DE PODER
CONCLUIR LA PARTE FINAL DE MI PROFESION

ESPECIALMENTE AL PROFESOR RAMON SOTO

GRACIAS POR SU GRAN DEDICACION
Y COOPERACION AL HACER POSIBLE
ESTE TRABAJO Y SOBRE TODO POR
SUS VALORES HUMANOS,
EXPERIENCIA Y PROFESIONALISMO.

DEBE TENERSE PRESENTE QUE LA
TRAGEDIA DE LA VIDA NO RESIDE
EN NO LOGRAR LOS OBJETIVOS,
LA TRAGEDIA CONSISTE EN NO
OBTENER OBJETIVOS POR LOGRAR;
NO ES NINGUNA DESGRACIA MORIR
CON SUEÑOS INCUMPLIDOS, SI
LO ES EN CAMBIO NO SOÑAR
NO HAY DESDICHA ALGUNA EN NO
LLEGAR HASTA LAS ESTRELLAS A
LAS CUALES DIRIGIRSE, NO ES EL
FRACASO, SI NO LA POBREZA DE
ESPIRITU LO QUE CONSTITUYE EL
AUTENTICO FRACASO.

BENJAMIN MAYS

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	1
I. Fundamentación del tema	3
II. Planeamiento del problema	24
III. Objetivos	25
IV. Hipótesis	26
V. Material y equipo	27
VI. Método propuesto	31
VII. Resultados	40
VIII. Análisis de Resultados	51
IX. Conclusiones	53
Anexos	54
X. Bibliografía	57

INTRODUCCION

El papel del proceso de disolución en la eficiencia de una forma farmacéutica sólida tiene como efecto obtener datos precisos que aseguren la disponibilidad biológica del fármaco en el lugar de absorción, además de ayudar a identificar formulaciones que presenten problemas de bioequivalencia, también como asegurar la bioequivalencia de lote a lote, así la velocidad de disolución es relacionada directamente con la eficiencia de la tableta. De esta manera es posible predecir de forma relativa el comportamiento de una forma farmacéutica particular después de su administración en el organismo.

Es por eso que a nivel producción se hace necesario, una vez establecidas las condiciones operacionales para la prueba de disolución, ocuparse de la cuantificación del principio activo, requiriendo para la cuantificación de la dexametasona en la disolución de un análisis que garantice la obtención de resultados confiables, que tenga siempre la misma validez, que el equipo disponible sea el adecuado y que el tiempo para efectuar el análisis sea el mínimo para evitar contratiempos en producción.

En la actualidad el método empleado para la cuantificación de la dexametasona es por reacción colorimétrica presentando desventajas de costo elevado, tiempo de reacción largo y difícil disposición de reactivos, es por ello que se plantea la implementación del método por cromatografía de líquidos de alta resolución que efectúa la detección y cuantificación de bajas concentraciones de este activo (0.03mg/ml), el cual evita cualquier interacción con los excipientes que se encuentran en mayor proporción (específico), realiza el análisis en tiempos cortos (tiempos de retención de 2.2 min aproximadamente) y por último se aplique a todo el ensayo de tabletas (uniformidad de contenido, identidad y valoración).

Inevitablemente al suprimir la reacción de color y realizar la cuantificación de la dexametasona en la disolución por HPLC se comprueba la eficacia del método por medio de la validación, la cual es el arma más valiosa de tal implementación, debido a que proporciona datos esenciales para saber si es aplicable en análisis químico.

Los criterios que se emplearon para validar la técnica de la disolución fueron los establecidos en la USP en la categoría III (precisión y tolerancia) y como datos adicionales se realizaron la linealidad, exactitud y especificidad.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

1.1 DEXAMETASONA (DXS).

Desde la observación de Hench, en 1949, de una respuesta espectacular a la cortisona en pacientes con artritis reumatoide, los esteroides suprarenales y glucocorticoides sintéticos se han usado ampliamente en medicina, investigaciones posteriores condujeron al desarrollo de muchos esteroides nuevos con mayor potencia antiinflamatoria y poco efecto sobre la adsorción de Na^+ como son: Prednisona, metilprednisolona y dexametasona, esta última difiere de la cortisona por un doble enlace en la posición 1,2; un flúor en posición α 9 y un $\text{CH}_3\alpha$ en posición 16. (1,2).

1.2 CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS (8,10).

1.2.1. FORMULA ESTRUCTURAL:

Estructura desarrollada de dexametasona.
(VER FIGURA 1)

1.2.3. FORMULA CONDENSADA:

$\text{C}_{22} \text{H}_{29} \text{F} \text{O}_5$

1.2.4. PESO MOLECULAR:

392.50 g/mol

1.2.5. NOMBRES QUIMICOS:

- a) 9-FLUORO-11,17,21-TRIHIDROXI-16-METILPREGNA-1,4-DIENO-3,20-DIONA.
- b) PREGNA-1,4-DIENO-3,20-DIONA- 9-FLUORO-11,17,21 TRIHIDROXI-16-METIL-(11 β ,16 α).
- c) 9-FLUOR-16 α -METILPREDNISOLONA.
- d) 1-DIHIDRO-16 α -METIL-9 α -FLUORO- HIDROCORTISONA.

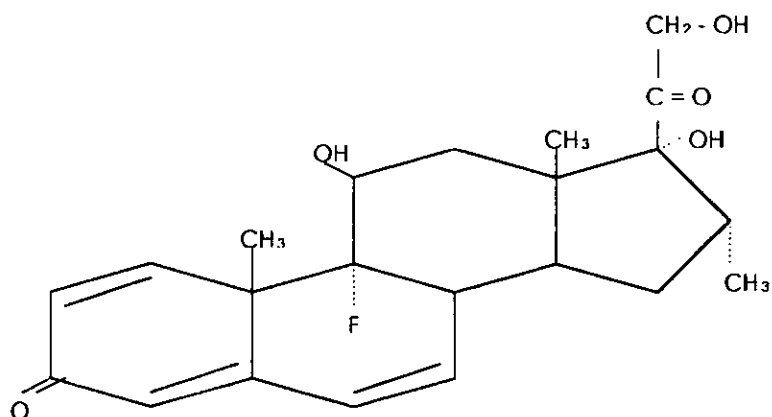


FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA DEXAMETASONA.

1.2.6. SOLUBILIDAD:

Insoluble en agua, débilmente soluble en éter y soluble en acetona, etanol y cloroformo.

1.2.7. BIODISPONIBILIDAD:

Luego de su administración oral, se alcanzan las concentraciones máximas plasmáticas (50 -80%) en 1 o 2 hrs (21).

1.2.8. ELIMINACION RENAL:

8% en forma de sulfato o glucoronido por la reducción de la cetona a hidróxilo en el C3 (21).

1.2.9. VOLUMEN DE DISTRIBUCION:

0.8 - 1.0 lt/Kg.(21).

1.2.1.0. ESPECTRO ULTRAVIOLETA:

Absorción máxima al U.V. a 240 nm con etanol el E 1% 1 cm. 355. A 263 nm el E% 1 cm 422 a 455 (8).

1.2.1.1. FORMAS FARMACEUTICAS:

Tabletas de 0.25mg, y 0.5 mg y 0.75 mg.
Solucion oftálmica de 0.90 mg.
Soluciones nasales de 0.5 mg.
Soluciones inyectables de 4 mg/ml.

Estas tres últimas contienen una sal de dexametasona (fosfato sódico de dexametasona ó 21-isonicotinato de dexametasona) que las hace soluble en agua.

1.2.12. INDICACIONES TERAPÉUTICAS:

ENDOCRINOLOGIA.- Algunos casos de insuficiencia adrenal y Tiroiditis.

Empleo terapéutico en enfermedades no endocrinas.

REUMATOLOGIA.- El criterio para iniciar la terapéutica con corticosteroides es el estado de enfermedad progresiva, considerándose el hecho, de que una vez iniciada la administración, posiblemente deberán emplearse durante muchos años o toda la vida, con los riesgos de serias complicaciones. Ejemplo: Artritis reumatoide, gotosa, postraumática, osteoartritis, sinovitis espondilitis anquilosante. Lupus sistémico.

DEMATOLOGIA.- El empleo de preparados de corticosteroides adecuados para la administración tópica, ha revolucionado la terapéutica de las formas más comunes de enfermedad cutáneas. Se debe cuidar la concentración utilizada, evitando ocasionar represión en el eje hipofisario-suprarrenal. Ejemplos: Eritema multiforme, dermatitis exfoliativa, dermatitis por contacto.

HEMATOLOGIA.- Las manifestaciones de la mayor parte de enfermedades de este grupo, son controlados por glucocorticosteroides, disminuyendo la morbilidad en todas estas enfermedades y prolongando los tiempos de supervivencia. Ejemplos: Anemias y trombocitopenias autoinmunes. Leucemia y linfomas. Síndrome de coagulación intravascular.

MISCELANEAS.- Estados de choque. Edema cerebral. En general, en los procesos inflamatorios que requieren tratamientos rápidos.

1.3 CROMATOGRAFIA

1.3.1. METODOS DE ANALISIS DE LA DEXAMETASONA.

Existen gran variedad de métodos analíticos para la cuantificación de dexametasona, muchos de estos están basados principalmente por reacciones específicas en el carbonilo en 20, dando como resultado soluciones coloridas que posteriormente son cuantificadas espectrofotométricamente (13,14), cuyas desventajas son el tiempo requerido de reacción y la estabilidad que presenta esta reacción. También se encuentran descritos diversos métodos como los directos de cuantificación al espectrofotómetro U.V. en solución de metanol, enzimáticos, polarográficos, polarimétricos y cromatográficos como son: capa fina, gases y líquidos de alta resolución (8,19). En la actualidad, el auge y mayor relevancia de análisis por cromatografía han permitido prescindir poco a poco de los otros métodos, esto se debe a la capacidad que tiene en poder separar los componentes de interés de los componentes inertes, propiedad por la cual permite cuantificar a la dexametasona sin interferencia de los excipientes que se encuentran en mayor proporción en la tableta (15,16).

1.3.2 DEFINICION

La cromatografía se define como un método físico de separación, en el cual los componentes a separarse se distribuyen entre dos fases, una fase móvil (líquida o gaseosa) que circula a través de una fase estacionaria, (sólida o líquida). Al introducir una mezcla de sustancias en un sistema cromatográfico, se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, dando lugar a repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes a lo largo de la fase estacionaria, lográndose la separación debida a los coeficientes de distribución de los componentes (17).

1.3.3. TIPOS DE CROMATOGRAFIA

Según sea la naturaleza de las fases involucradas en los mecanismos de separación, la cromatografía se clasifica en : (VER FIGURA 2).

TIPOS DE CROMATOGRAFIA

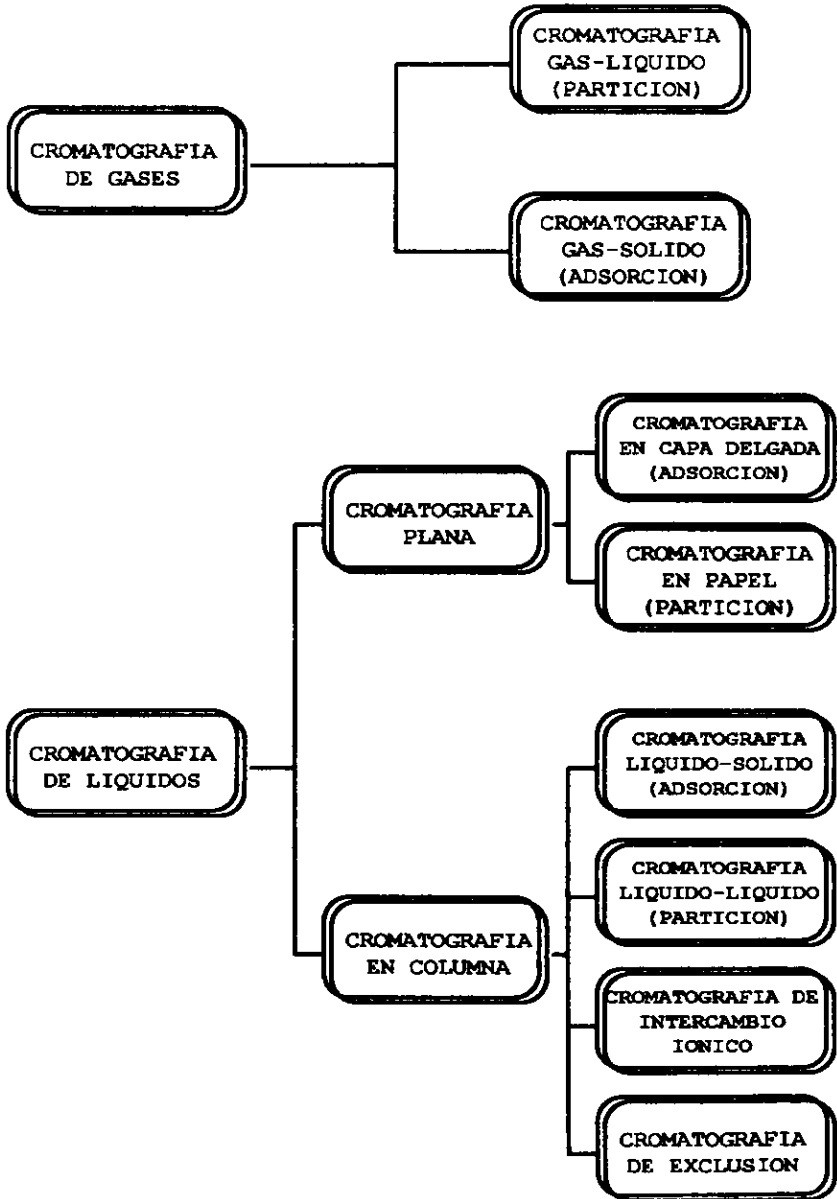


FIGURA 2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA

1.3.3.1. CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN:

La fase estacionaria es un sólido, la separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción.

1.3.3.2. CROMATOGRAFIA DE PARTICIÓN:

La fase estacionaria es un líquido, la separación se basa en una partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

1.3.3.3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO:

La fase estacionaria está cargada iónicamente con la carga contraria a la muestra.

1.3.3.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN:

Se rellena la columna con un material especial con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea el tamaño molecular.

1.3.4. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

La cromatografía de líquidos (HPLC), es una de las técnicas más versátiles de la química analítica, debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. El éxito de la aplicación para un compuesto depende de la combinación correcta de las condiciones de operación: tipo de columna, fase móvil, longitud y diámetro de la columna, velocidad de flujo, tipo de empaque etc.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a diferentes métodos de cromatografía líquida. Existen otros mecanismos de separación, como la cromatografía de fases enlazadas, en la cual, la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas del soporte. Este empaque es de los más usados en HPLC por ser estable y no perderse fácilmente por el uso. Esta variante de cromatografía se puede llevar a cabo en la fase normal o fase inversa.

1.3.4.1. FASE NORMAL:

La fase estacionaria es fuertemente polar (sílice) y la fase móvil es apolar. Los componentes polares quedan retenidos en la columna durante tiempos mayores de que los componentes no polares.

1.3.4.2. FASE INVERSA:

La fase estacionaria es apolar (hidrocarburos) y la fase móvil es polar. En cuanto más apolar sean los componentes de una muestra, mayor será la retención.

1.3.5. COMPONENTES BASICOS

Los componentes básicos que integran un cromatógrafo de líquidos son: *una bomba, un inyector, una columna, un detector y un integrador* (VER FIGURA 3).

1.3.5.1. SISTEMA DE BOMBEO:

Su objetivo es impulsar la fase móvil a través de la columna y se debe cumplir con ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante. La más utilizada es la llamada bomba recíproca que proporciona un flujo constante de la fase móvil a la columna cromatográfica. En muchos instrumentos se sitúa entre la bomba y el sistema de inyección un amortiguador de impulsos con el fin de mantener estable la presión del sistema.

1.3.5.2. COLUMNA:

Es la parte fundamental en cromatografía, porque es donde se lleva a cabo la separación. Generalmente es un tubo de acero inoxidable, con una longitud de 7.5 a 30 cm. de largo, con un diámetro interno de 2-5 mm.; contiene a la fase estacionaria, el material de empaque seleccionado dependerá de la separación que se desee hacer. Este empaque está formado de unas microesferas de sílice porosa con la superficie modificada (también se usan otros

materiales pero no son tan comunes) la modificación de la superficie de sílice se realiza por reacciones químicas, con frecuencia se une una monocapa de grupos *octadecil, fenil, octil, amino, etc.*, dando lugar a un producto con diferentes características cromatográficas.

1.3.5.3. SISTEMA DE INYECCIÓN:

Existen varios mecanismos de introducción de la muestra, pudiéndose clasificar en: *manuales, automáticos y computarizados*. Es importante la introducción de la muestra para obtener una buena resolución y separación y debe hacerse en forma de paquete pequeño para ayudar a la obtención de picos pequeños y simétricos.

1.3.5.4. FASE MOVIL:

Es parte activa en un sistema de cromatografía de líquidos, por lo que su elección es muy importante, en la separación de las muestras.

CARACTERISTICAS DE LA FASE MOVIL:

- Alta pureza
- Punto de ebullición de 20 a 50° C arriba de la temperatura de la columna.
- Baja viscosidad.
- Baja reactividad, para evitar la interacción con los solutos o con el empaque.
- Limitada inflamabilidad y toxicidad.
- Polaridad adecuada.
- Solubilidad compatible con la de la muestra.

1.3.5.5. DETECTORES:

Los cromatógrafos actuales poseen un amplio intervalo operativo que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa. Tiene una gran sensibilidad, lo que permite la detección de nanogramos de material.

El detector más utilizado es el de absorción UV/Vis. con longitud de onda variable. Existe un detector de arreglo de diodos cuya característica es que puede realizar la detección de los diferentes componentes de una muestra en un rango de longitudes de onda.

Otros detectores son:

- **DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION (Detector de desviación y detector de reflexión).**- Determina la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil sola y de la fase móvil que contiene el compuesto en cuanto emerge de la columna. Los detectores de índice de refracción son menos sensitivos que los detectores UV. Ellos son sensibles a cambios pequeños en la composición de solventes, flujo y temperatura.
- **DETECTOR DE FLUORESCENCIA.**- Son sensibles a compuestos que presentan fluorescencia inherente o que pueden ser convertidos a derivados fluorescentes por transformación química de otros compuestos, o por unirse con agentes fluorescentes en grupos funcionales específicos.
- **DETECTOR ELECTROQUIMICO, POTENCIOMETRICO O VOLTAMETRICO.**- Son usados en la cuantificación de especies que pueden oxidarse o reducirse. Estos detectores son selectivos, sensibles y confiables, pero requieren fase móvil conductora libre de oxígeno e iones metálicos reductores.

COMPONENTES BASICOS

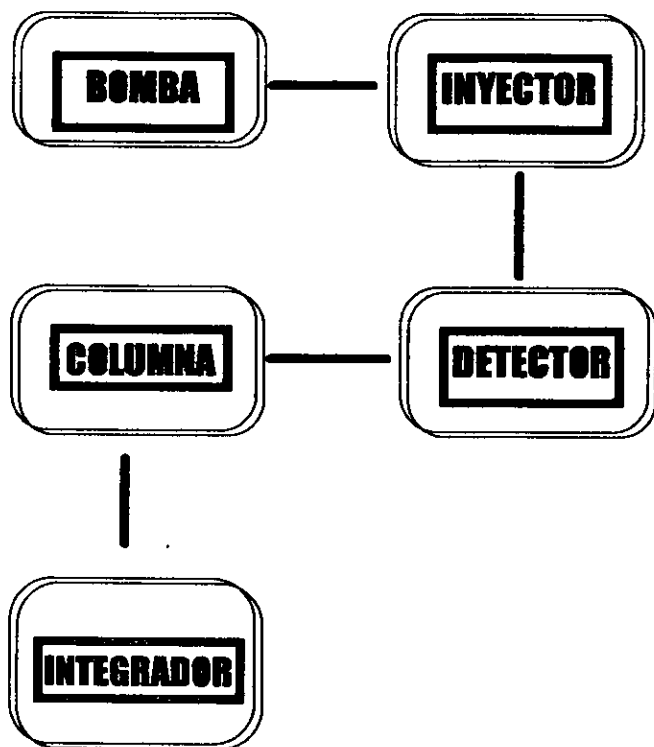


FIGURA 3. COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS

1.4. VALIDACION

1.4.1. DEFINICION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir, es un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en análisis químico. Los parámetros que suministran la información para decidir si un método es o no funcional son estudiados con la herramienta estadística, es claro que un método que es validado para una situación puede no serlo para otra.

1.4.2 CATEGORIAS

Las categorías de los métodos más comunes que requieren ser validados son: (13).

- CATEGORIA 1: Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.
- CATEGORIA 2: Métodos analíticos para determinar impurezas a sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados. **Análisis Cuantitativo, pruebas límite.**
- CATEGORIA 3: Métodos analíticos para determinar características físicas, por ejemplo: **Disolución, liberación del principio activo. (VER CUADRO 1).**

DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

PARAMETROS ANALITICOS	CATEGORIAS			
	1	2		3
		CUANTITATIVO	CUALITATIVO	
<i>LINEALIDAD</i>	SI	SI	—	*
<i>PRECISION</i>	SI	SI	—	SI
<i>EXACTITUD</i>	SI	SI	*	*
<i>ESPECIFICIDAD</i>	SI	SI	SI	*
<i>LIMITES DE DETECCION</i>	—	—	SI	*
<i>LIMITES DE CUANTIFICACION</i>	—	SI	—	*
<i>TOLERANCIA</i>	SI	SI	SI	SI

*Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

CUADRO 1. PARAMETROS QUE SE REQUIEREN PARA CADA CATEGORIA.

1.4.3. PARAMETROS DE VALIDACION.

La forma de validar un método, depende de la aplicación que se le va a dar (control de calidad, estudios de estabilidad o análisis de proceso), de los requerimientos gubernamentales y desde luego el criterio de la persona que lo realiza.

1.4.3.1 LINEALIDAD.

Se llama linealidad al grado en que la curva de calibración analítica se aproxima a la función matemática o al grado en que la sensibilidad es constante.

- **La linealidad del sistema:** Debe demostrarse que la relación entre la concentración del estándar y la respuesta del detector sigue una relación matemática definida y constante, se busca que la función sea lineal. (VER CUADRO 2)

Cuando se determina la linealidad se debe especificar:

- a) **La sensibilidad del sistema:** Es igual a la pendiente de la curva de calibración analítica expresada como la relación del cambio de señal al cambio de concentración de la sustancia analizada.
- b) **Rango analítico:** Indica la concentración más alta y más baja de la sustancia que se ajusta a la función matemática que relaciona la respuesta del detector con la concentración o el rango de concentraciones en que se estudio esta respuesta.

CRITERIOS DE ACEPTACION		
C.V.	<	1.5 %
r	>	0.99
r ²	>	0.98

CUADRO 2: CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

- **Linealidad del método:** Es la relación que se establece mediante una línea recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada). (VER CUADRO 3)

CRITERIOS DE ACEPTACION		
b	=	0
m	=	1
r ²	>	0.98

CUADRO 3. CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL METODO

1.4.3.2. PRECISION

Grados de concordancia mútua entre los resultados obtenidos en una serie de ensayos, se expresa como la desviación estándar o bien como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

- **La precisión del sistema:** Se demuestra analizando un cierto número de veces de la misma solución estándar. Los experimentos se evalúan a nivel de significancia de 0.05 equivalente a una desviación estándar relativa de 2.0%. Se considera que un método es preciso cuando el valor de la media del porcentaje de recobro está muy aproximado al 100% y el valor de coeficiente de variación esta por debajo al porcentaje registrado, de acuerdo al método de análisis utilizado: (VER CUADRO 4).

CRITERIOS DE ACEPTACION		
C.V.	<	1.5 %

CUADRO 4. CRITERIOS DE ACEPTACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA

- **Precisión del método:** Es la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas (*repetibilidad*); y como la concordancia obtenida entre determinaciones efectuadas por diferentes analistas en diferentes días o diferentes laboratorios utilizando diferentes equipos (*reproducibilidad*). (VER CUADRO 5)

CRITERIOS DE ACEPTACION		
Método	C.V.	(porcentaje de recobro)
Cromatográfico	<	2.0 %
Químico y espectrofotométrico	<	3.0 %
Microbiológico	<	5.0 %

CUADRO 5. CRITERIOS DE ACEPTACION DE LA PRECISION DEL METODO.

1.4.3.3. EXACTITUD

Es la concordancia entre el valor experimental determinado y el valor de referencia aceptado, es decir, es la medida de cuánto las determinaciones se desvían del valor verdadero. Esto implica el conocimiento exacto del valor verdadero que ha sido comparado con un patrón aceptable y que se utiliza como exacto y verdadero.

- **Exactitud del sistema:** Establece el posible efecto de los excipientes sobre la adecuada correlación entre la respuesta del detector y la concentración real del fármaco. (VER CUADRO 6).

Para su determinación, se evalúa el comportamiento de diferentes niveles de concentración de la sustancia de referencia entre la respuesta del detector. Evaluándose a partir de la gráfica resultante de datos obtenidos experimentalmente y los siguientes parámetros estadísticos: intercepto (b) y coeficiente de correlación (r).

EL SISTEMA ES EXACTO CUANDO:		
b	=	0
r	=	1

CUADRO 6. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD DEL SISTEMA.

- **Exactitud el método:** Se demuestra por:

a) *Efecto placebo:* Concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista en muestras preparadas con la misma cantidad de placebo, añadiendo diferentes cantidades del estándar que varían entre el 50 y 110% del nivel normal de análisis.

b) *Linealidad del método:* Se lleva a cabo analizando muestras de diferentes tamaños. Este experimento indica el efecto que puede tener la presencia de las sustancias auxiliares en la formulación (excipientes o vehículos) cuando en alguna ocasión se modifica la cantidad de muestra empleada para el análisis o cuando ha habido un error en la manufactura del producto.

1.4.3.4. ESPECIFICIDAD (Selectividad)

Es el grado en el cual la medición es debido solo a la sustancia a ser determinada y no a otra u otras sustancias que pueden estar presentes en el material sujeto a análisis, dependiendo de la aplicación del método se requerirá de mayor o menor grado de especificidad. (VER CUADRO 7).

CRITERIOS DE ACEPTACION
No existiran interferencias por parte de los excipientes

CUADRO 7. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA ESPECIFICIDAD.

1.4.3.5. TOLERANCIA

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como proporciones de los disolventes de la fase móvil, el pH, columna, etc., y observando de que manera se alteran los resultados. (VER CUADRO 8).

Se establece cuantificando una muestra homogénea por triplicado y evaluando los parámetros cromatográficos de 3 inyecciones de una misma sustancia patrón de referencia.

CRITERIO
No existe criterio definido para este parámetro en farmacopeas o guías de validación, pudiéndose establecer una variación del 2% del promedio en el análisis de tolerancia con respecto al promedio del análisis realizado bajo condiciones normales.

CUADRO 8. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA TOLERANCIA

1.5 DISOLUCION

1.5.1. DEFINICION

Es el proceso por el cual un soluto de relativamente poca solubilidad entra en solución (3).

La prueba de disolución in vitro es aplicada a las formas de dosificación sólida para medir la cantidad de fármaco disuelto en un tiempo predeterminado usando un aparato diseñado para un control cuidadoso de parámetros de la prueba (24).

La prueba de disolución debe ser sensible para pequeños cambios en la formulación, para poder asegurar una uniformidad de lote a lote en manufactura de rutina y servir como medida para comparar la disponibilidad biológica en formas farmacéuticas similares preparadas en diferentes laboratorios.

1.5.2. FACTORES QUE INFLUYEN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION

La disolución de un sólido depende de factores físico-químicos que aportan cambios en las características del soluto, esencialmente su solubilidad, o bien modificaciones donde se efectúa la disolución, en particular en el espesor de la capa a través de la cual se realiza el intercambio de materia entre las partículas a disolver, el disolvente y en la composición de este último.

1.5.3. FACTORES QUE DEPENDEN DEL MEDIO DE DISOLUCION

1.5.3.1. Intensidad de agitación. La relación entre la intensidad de agitación y velocidad de disolución varía considerablemente de acuerdo con el tipo de agitación que se utilice, del grado de flujo laminar o turbulento que hay en el sistema, la forma y diseño del agitador y las propiedades físico-químicas del sólido. Lo ideal sería tener un flujo laminar reproducible que es esencial para obtener resultados confiables manteniendo a un nivel relativamente bajo la velocidad de agitación.

1.5.3.2 Temperatura. La solubilidad del fármaco dependen de la temperatura del medio. Las variaciones de temperatura, durante la determinación de disolución se pueden evitar y deben mantenerse dentro de los ± 0.5 ° C. Esto se debe al uso de termostatos o calentadores diseñados para que no exista este tipo de problemas. La operación de la temperatura en la disolución es realizada a 37 °C debido a las condiciones "in vivo" (29).

1.5.3.3. Composición del medio. Factores como la viscosidad, pH, tensión superficial.

- **Viscosidad.** Influye en la velocidad de disolución de forma inversamente proporcional pero en algunos procesos de disolución la viscosidad puede tener poco efecto.
- **pH.** Una solución ácida tiende a desintegrar más rápido a la tableta, por lo tanto puede aumentar la velocidad de disolución aumentando la superficie eficaz, ahora bien, el pH del medio es aproximadamente de 1.2, con el fin de simular el pH del jugo gástrico.
- **Tensión superficial.** Posee gran efecto significativo sobre la velocidad de disolución del activo, debido a que agentes tensoactivos reducen el ángulo de contacto aumentando el proceso de penetración de la matriz por parte del medio de disolución.

1.5.4. FACTORES QUE DEPENDEN DEL SOLIDO A DISOLVER

1.5.4.1. Solubilidad (3).

- **Naturaleza química.** Las partículas sólidas presentan forma amorfa o cristalina. Generalmente es preferida la amorfa porque es más soluble que la cristalina, aunque en algunos compuestos presentan inestabilidad (*caso de la penicilina*).

- **Polimorfismo.** -Es cuando una sustancia puede cristalizar en varios sistemas cristalinos distintos con distintas propiedades. A una temperatura una forma es estable y las demás inestables (*metaestables*), se prefiere esta forma metaestable porque presenta mayor velocidad de disolución.

1.5.4.2. Superficie libre .

- **Tamaño de partícula.** La velocidad de disolución es directamente proporcional a la superficie efectiva del principio activo en contacto con el disolvente sin embargo no debe intentarse la disminución de la partícula pues existen dificultades de humectación debido a la carga adquirida en trituración. De modo que se hace necesario el estudio particular de estandarizar la granulometría del activo.

- **Porosidad.** Afecta de forma directamente proporcional a la penetración del líquido, es decir, en cuanto mayor sea el radio del poro es mayor la penetración del líquido.

II. PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación es parte fundamental en el desarrollo de todo proceso y formulación de técnicas de análisis, siendo particular para cada problema, por ello, las constantes modificaciones a los métodos analíticos deben requerir nuevamente de validación, asegurando la confiabilidad de los resultados.

Ahora bien, la dexametasona, cuya forma farmacéutica predominante ha sido en tabletas, ha tenido grandes cambios con referencia a los métodos de cuantificación del principio activo siendo reacciones colorimétricas, espectrofotométricas y actualmente cromatografía de líquidos (Farmacopea USP XXIII), no obstante, la cuantificación en la disolución no ha presentado una confiabilidad adecuada y la determinación del principio activo se realiza por medio de una reacción colorimétrica con tetrazolio e hidróxido de tetrametil amonio, con extracciones previas de cloroformo y determinado por espectrometría U.V./ VIS. como resultado se ha obtenido un mayor tiempo de análisis, además de la difícil y costosa adquisición de los reactivos.

Argumento por el cual se requiere prescindir de la reacción de color a fin de cumplir con la menor manipulación de la muestra desde el inicio hasta el final del análisis de las tabletas y sobre todo confirmar la validez del método garantizando así a la confiabilidad del mismo.

III. OBJETIVOS

Realizar la adaptación del método de disolución descartando la reacción de color y cuantificando el principio activo liberado por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Demostrar que esta modificación cumple con los requisitos especificados en validación, determinando los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y tolerancia del método.

IV. HIPOTESIS

Todo el análisis químico de las tabletas de dexametasona (disolución, valoración y uniformidad de contenido) que marca USP requiere de un tiempo considerable y un costo alto en reactivos. Si se omite la reacción colorimétrica en la cuantificación de la disolución y uniformidad de contenido realizándose por cromatografía de líquidos de alta resolución se podrá reducir el tiempo de análisis de las tabletas, además de demostrar la eficacia y confiabilidad en los resultados por medio de la validación.

V. MATERIAL Y EQUIPO.

MATERIAL

CANTIDAD	DESCRIPCION	CAPACIDAD	MARCA
5	Pipetas volumétricas	50 ml	Pyrex
5	Pipetas volumétricas	1,2,3,4,5, ml c/u	Pyrex
10	Matraces volumétricos	50 ml	Pyrex
10	Matraces volumétricos	25 ml	Pyrex
1	Matraz volumétrico	100 ml	Pyrex
5	Embudos de separación	125 ml	Pyrex
1	Jeringa de vidrio	100 mcl	
6	Vasos Erlenmeyer	100 ml	Pyrex
6	Embudos de filtración	250 ml	Pyrex
	Papel filtro No. 40		Millipore
1	Termómetro	45 °C	Trend
1	Baño ultrasonido		

INTRUMENTOS

DESCRIPCION	MARCA	MODELO
BALANZA ANALITICA	Mettler	160
DISOLUTOR	Elecsa	DIE 25- 250
CROMATOGRAFO	Perkin Elmer	
bomba	Perkin Elmer	200 Lc pump
detector	Perkin Elmer	235 c (arreglo de diodos)
Interfase	Pe Nelson	600 Link
inyector	Perkin Elmer	lup fijo
Columna	Fenomenex	Ultracarb ODS C-18

REACTIVOS

HCl
 Acetonitrilo
 Metanol
 Cloroforno
 Agua

MARCA

Merck
 Mallinckrodf
 Chromanorm
 Merck
 Mallinckrodf

CALIDAD

Grado analítico
 HPLC
 HPLC
 Grado analítico
 HPLC

DIAGRAMA DE FLUJO

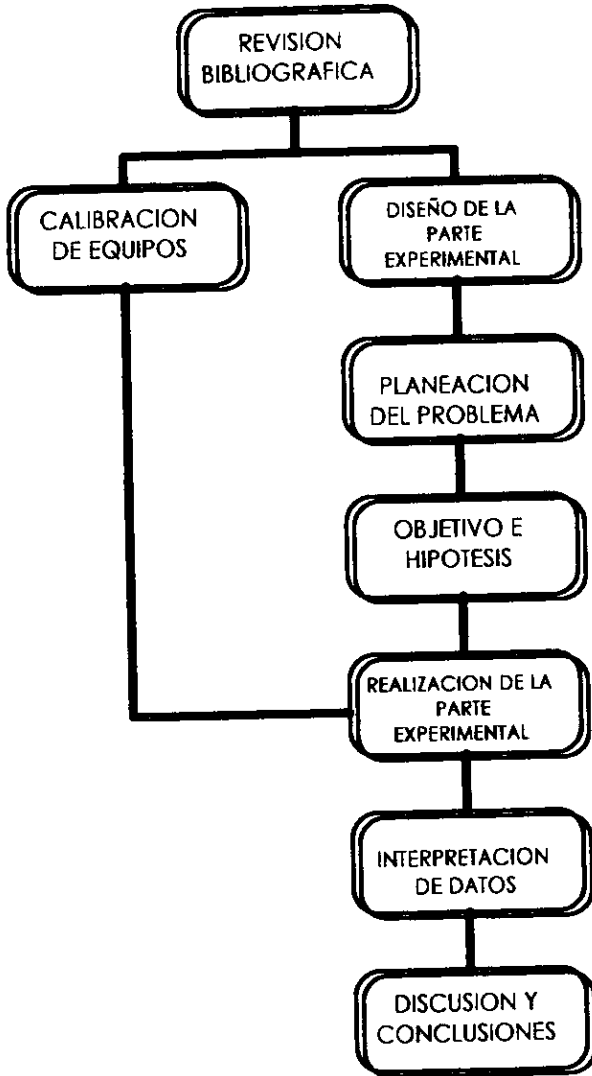


FIGURA 4. PARTE EXPERIMENTAL

METODO ORIGINAL

DEXAMETASONA

FORMA FARMACEUTICA: TABLETAS.

PESO PROMEDIO: 80 mg/tableta

CONTENIDO DE DEXAMETASONA : 0.75 mg/tableta.

METODO DE DISOLUCION:

MEDIO: HCl diluido (1:100); 500 ml.

APARATO I: Canastillas

VELOCIDAD: 100 rpm.

TIEMPO: 45 min.

Solución estándar: Disolver en alcohol una cantidad apropiada de estándar de dexametasona USP, pesada exactamente, obteniendo una solución cuya concentración es alrededor de 10 mcg/ml. Pipetear 20 ml de esta solución en una matraz aforado de 50 ml. Proceder directamente como en el ensayo para esteroides. (*Método 351*)

Procedimiento: Extraer una alícuota del medio de disolución equivalente aproximadamente a 200 mg de dexametasona con tres porciones de 15 ml de cloroformo. Evaporar los extractos combinados de cloroformo en una baño hasta sequedad, enfriar, y disolver el residuo en 20 ml de alcohol. Proceder directamente como en el ensayo para esteroides (*método 351*). Calcular con la siguiente fórmula:

$$10 (C/V) (Au/As)$$

En donde

V: el volumen en ml de la alícuota extraído con cloroformo.
C: la concentración del estándar.
Au: la absorbancia de la muestra.
As: la absorbancia del estándar.

Tolerancia: No menos de 70% (Q), de la cantidad del marbete de dexametasona es disuelta en 45 min.

Método 351. Ensayo para esteroides.

Adicionar a cada solución (estándar, muestra y blanco) 2 ml de una solución preparada y disuelta de 50 mg de azul de tetrazolium en 10 ml de metanol y mezclar. Después adicionar en cada matraz 2 ml de una mezcla de alcohol e hidróxido de tetrametil amonio (9:1), mezclar y colocar en la obscuridad por 45 min. Inmediatamente, determinar las absorbancias de las soluciones a 525 nm contra el blanco.

VI. METODO PROPUESTO.

METODO DE DISOLUCION:

MEDIO: HCl diluido (1:100); 500 ml.
APARATO I: Canastillas
VELOCIDAD: 100 rpm.
TIEMPO: 45 min.

Solución estándar: Preparar directamente el estándar disolviendo en metanol 19 mg de dexametasona en un matraz volumétrico de 25 ml agitar 20 min. y posteriormente aforar. Tomar una alícuota de 1 ml y llevar a un matraz de 25 ml, agitar y aforar con metanol. Concentración final: 30.4 mcg/ml.

Procedimiento: Llevar a cabo la disolución en las condiciones indicadas (dosis por unidad: 0.75 mg) y del medio de disolución filtrar 100 ml y extraer con tres porciones de cloroformo (15 ml cada porción). Filtrar los extractos clorofórmicos con sulfato de sodio anhidro y evaporar hasta sequedad, enfriar y disolver en 5 ml de metanol. Concentración final: 30 mcg/ml.

Tolerancia: Q mayor de 70 %.

CONDICIONES PARA EL ANALISIS POR HPLC

Fase móvil: Acetonitrilo-agua 30:70
Flujo: 2 ml/min.
Tiempo de retención: 7 min aproximadamente.
Longitud de onda: 254 nm.
Presión: 1000 psi.
Inyección: 20 µl.

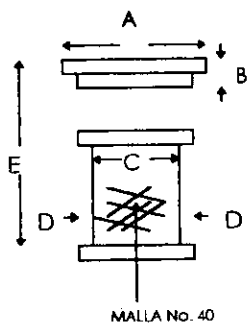
CALIBRACION DEL DISOLUTOR (12,13).

La calibración se lleva a cabo:

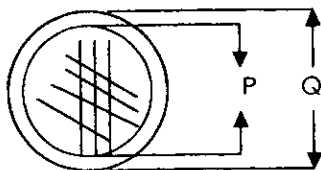
- Verificando las dimensiones del equipo.
- Verificando la disolución con tabletas estándar USP.

DIMENSIONES .

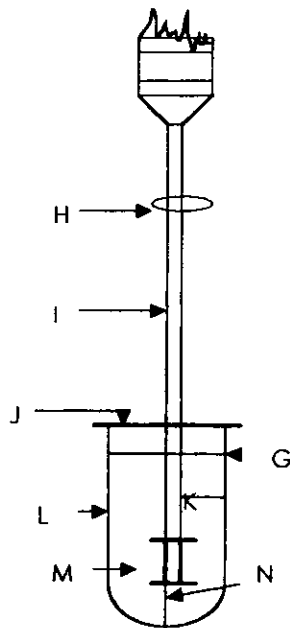
- 25 mm.
- Altura 12.5 mm.
- Diámetro interno 20.2 ± 0.1 mm
- Diámetro externo 22.0 ± 0.1 mm.
- Altura 36.8 mm. ± 3.0 mm.



- 20.2 ± 1.0 mm.
- 25.4 ± 3.0 mm.



- F. Temperatura del baño: 36.5 - 37.5 °C
- G. Volumen medio: 900 ml desgasificado.
- H. Velocidad (rpm) : 4 %
- I. Eje: 6 - 10.5 mm de diámetro.
- J. Centricidad ± 2 mm. de todos los puntos.
- K. Punto de muestreo.
- L. Vaso cilíndrico con fondo esférico,
16 - 17.5 mm. altura y 10 - 10.5 mm.
diámetro interno.
- M. Canastilla
- N. Posición de la canastilla 2.5 ± 0.5 cm.



6.1 METODO DE VALIDACION PROPUESTO.

6.1.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Análisis por duplicado de diferentes soluciones de dexametasona correspondientes a:

%	mg/ml
60	0.01
80	0.02
100	0.03
120	0.04
140	0.05

Desarrollo: Realizar una solución stock del estándar secundario de dexametasona a una concentración de 0.5 mg/ml en metanol grado HPLC. (50 mg en 100 ml). De esta solución se tomarán alícuotas de 1, 2, 3, 4, y 5 ml en matraces de 50 ml para obtener concentraciones de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg respectivamente.

Condiciones: Realizar la curva área del pico obtenido contra concentración. (VER CUADRO 9).

CRITERIOS DE ACEPTACION		
C.V.	<	1.5%
r	>	0.99
r ²	>	0.98

CUADRO 9. CRITERIOS DE ACEPTACION DE LINEALIDAD DEL SISTEMA.

El método se llama lineal si cumple satisfactoriamente con el criterio anterior.

6.1.2. LINEALIDAD DEL METODO.

Análisis por triplicado de diferentes soluciones de dexametasona correspondientes a:

%	ADICION DE	mg/ ml
80	80 mg de placebo	0.02
100	80 mg de placebo	0.03
120	80 mg de placebo	0.04

Desarrollo: Realizar la disolución en las condiciones antes mencionadas, colocando en cada vaso 2, 3 y 4 ml de la solución stock + 80 mg de excipiente, del medio de disolución filtrar alícuotas de 50 ml, extraer con cloroformo, evaporar y disolver con 5 ml de metanol, obtenido concentraciones de 0.02, 0.03, 0.04 mg respectivamente.

Condiciones: Realizar la curva area del pico obtenido contra con concentración. (VER CUADRO 10).

CRITERIOS DE ACEPTACION		
b	=	0
m	=	1
r ²	>	0.98

CUADRO 10. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEALIDAD DEL METODO

6.1.3. PRECISION DEL SISTEMA

Se evalua repetibilidad.

Análisis por sextuplicado de una solución de dexametasona correspondiente a:

%	mg/ml
100	0.03

Desarrollo: Realizar 6 inyecciones de una solución de dexametasona en metanol cuya concentración corresponda al 100% del nivel normal del procedimiento (0.03 mg/ml).

Condiciones: Un solo analista. (VER CUADRO 11.)

CRITERIOS DE ACEPTACION		
C.V.	<	1.5%

CUADRO 11. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA PRECISION DEL METODO

6.1.4. PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO

Repetibilidad al 100%.

%	ADICION DE	mg/ml
100	80 mg de placebo	0.03

Desarrollo: De la solución stock, adicionar una alícuota de 3 ml en un vaso de disolutor más 80 mg de excipientes, del medio de disolución filtrar alícuotas de 50 ml, extraer con cloroformo, evaporar y disolver con 5 ml de metanol, obtenido una concentración de 0.03 mg/ml de dexametasona.

Condiciones: Analista 1: Tres inyecciones, dos días
Analista 2: Tres inyecciones, dos días
(VER CUADRO 12).

CRITERIOS DE ACEPTACION	
Método	C.V. (por ciento de recobro)
Cromatográfico	< 2.0 %
Químico y espectrofotométrico	< 3.0 %
Microbiológico	< 5.0 %

CUADRO 12. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO

6.1.6. ESPECIFICIDAD

Análisis de la respuesta de los excipientes correspondiente a:

ADICION DE :
80 mg de placebo

Desarrollo: Llevar a cabo la preparación de una solución de placebo de aproximadamente 80 mg en 25 ml de metanol.

Condiciones: Inyectar 10 veces esta solución y dejar correr un tiempo de 15 min. aproximadamente, con el fin de verificar que no exista interferencia u otras impurezas antes y después del pico del activo de interés. (VER CUADRO 13)

CRITERIOS DE ACEPTACION
No existiran interferencias por parte de los excipientes

CUADRO 13. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA ESPECIFICIDAD

6.1.7. TOLERANCIA

Desarrollo : Realizar por triplicado el análisis de disolución.

Condiciones : Efecto de la temperatura 30 y 40 °C
Efecto de la velocidad 125 y 75 rpm.
(VER CUADRO 14)

CRITERIOS DE ACEPTACION
2% de variación del promedio realizado en el análisis de tolerancia con respecto al promedio en condiciones normales.

CUADRO 14. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA TOLERANCIA.

VII. RESULTADOS.

Los parámetros obtenidos por HPLC fueron:

Tiempo de retención	2.3 min
Presión	1800 psi
Flujo	2 ml/min
Atenuación	100 mcV
Ruido	15 mcV

* ANEXA TABLA DE LAS CONDICIONES CON LAS QUE SE TRABAJÓ EN EL EQUIPO (VER TABLA 1).

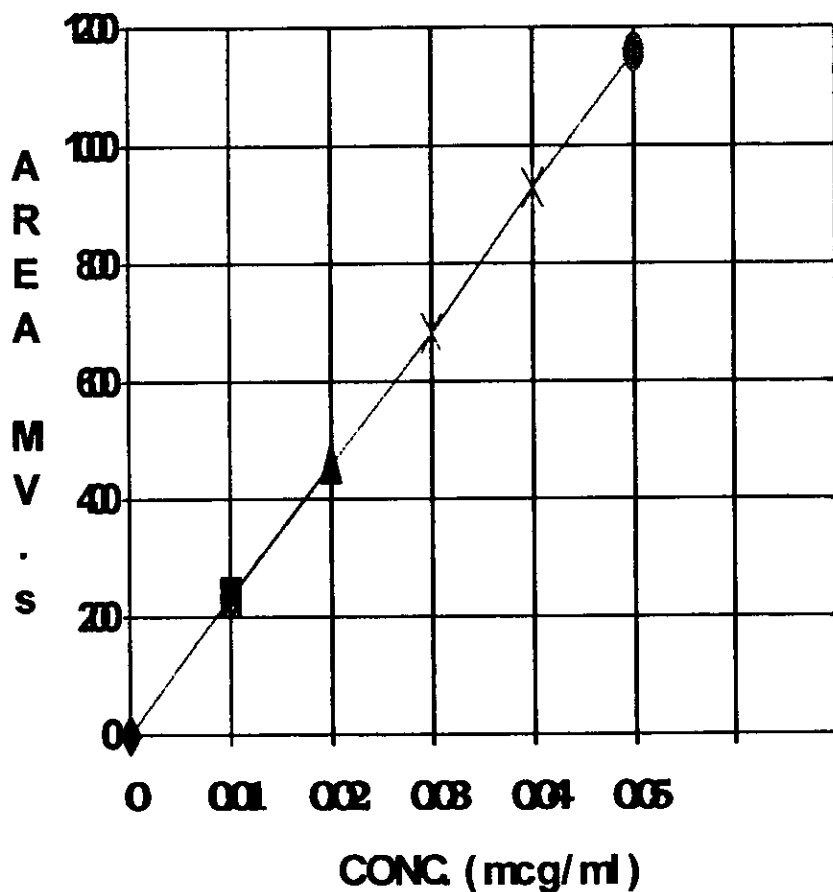
7.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

CONCENTRACION	RESPUESTA MEDIDA	
mg/ml	área	
0.01	234379	234347
0.02	459822	460226
0.03	682624	688001
0.04	929552	930759
0.05	1158329	1152618

(VER GRAFICA 1)

ESTADISTICA DESCRIPTIVA
$\Sigma X = 0.3$
$\Sigma X^2 = 0.011$
$\Sigma XY = 254166.76$
$\Sigma Y = 6930657$
$\Sigma Y^2 = 5.8730 \times 10^{12}$
$n = 10$

LINEALIDAD DEL SISTEMA



GRAFICA I. CURVA DE DEXAMETASONA

REGRESION LINEAL

Pendiente (m)	23123525
Ordenada al origen (b)	-640.05
Desviación estándar (σ)	220976.18
Coefficiente de variación (C.V.)	0.9554
Correlación (r^2)	0.99976
Correlación (r)	0.99988

PRUEBAS ESTADISTICAS	
Función lineal del tipo $t(\text{tab}) (0.975, n-2) = 2.3060$ Interferencia independiente: relación de cambio de la respuesta dada con respecto al cambio de la cantidad de principio activo.	$Y_{ij} = b + m \cdot X_i + E_j(i)$ $S_{y/x} = 5648.86$ INTERVALO DE CONFIANZA $22832248 < m < 234114801$ $t \text{ cal} = 183.06$

CRITERIOS DE ACEPTACION	
1. $t \text{ cal} > t \text{ tab}$ Indica que al variar la cantidad adicionada varía la respuesta obtenida Interferencia para la ordenada: Es la respuesta del sistema a la cantidad cero	Valores encontrados $t \text{ cal} > t \text{ tab}$ $183.06 > 2.3060$ Intervalo de confianza $-10300 < b < 9020$ $t \text{ cal} = 0$
2. $t \text{ cal} < t \text{ tab}$ El resultado reporta que la ordenada pasa por el origen.	Valores encontrados $t \text{ cal} < t \text{ tab}$ $0 < 2.3060$

CUADRO 15. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

TABLA DE ANADEVA

Fuente de variación	de Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Media de cuadrados	de Fcal
Regresión	Gl = 1	1.06939X 10 ¹²	1.06039X10 ²	MCr/MCre
Error de regresión	Gler = n-2 8	2552771	31909647	33513.21

TABLA 2. TABLA DE ANADEVA

F tab (criterio)

F (0.05,Gl, Gler)= 7.57

CRITERIO DE ACEPTACION	
1. Si $F_{cal} > F_{tab}$ Por lo tanto existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada.	VALORES ENCONTRADOS $F_{cal} > F_{tab}$ 33513 > 7.57
2. Si r^2 es mayor o igual de 0.98 de antemano nos indica una relación altamente significativa entre cantidad adicionada y recuperada.	$r^2 = 0.99976$
3. Si C.V. es menor o igual de 1.5%	C.V. = 0.9554%

CUADRO 16. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA ANADEVA.

7.2. ESPECIFICIDAD

En esta prueba se determina si los excipientes interfieren en las mediciones, de acuerdo a la metodología empleada.

Se realizó inyectando 10 veces placebo a las condiciones establecidas, dejando correr el cromatograma durante 6 min. El equipo no detectó ningún tipo de pico, por lo tanto, no se registraron áreas. (VER CUADRO 17)

CRITERIOS DE ACEPTACION	
Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.	PASA LA PRUEBA

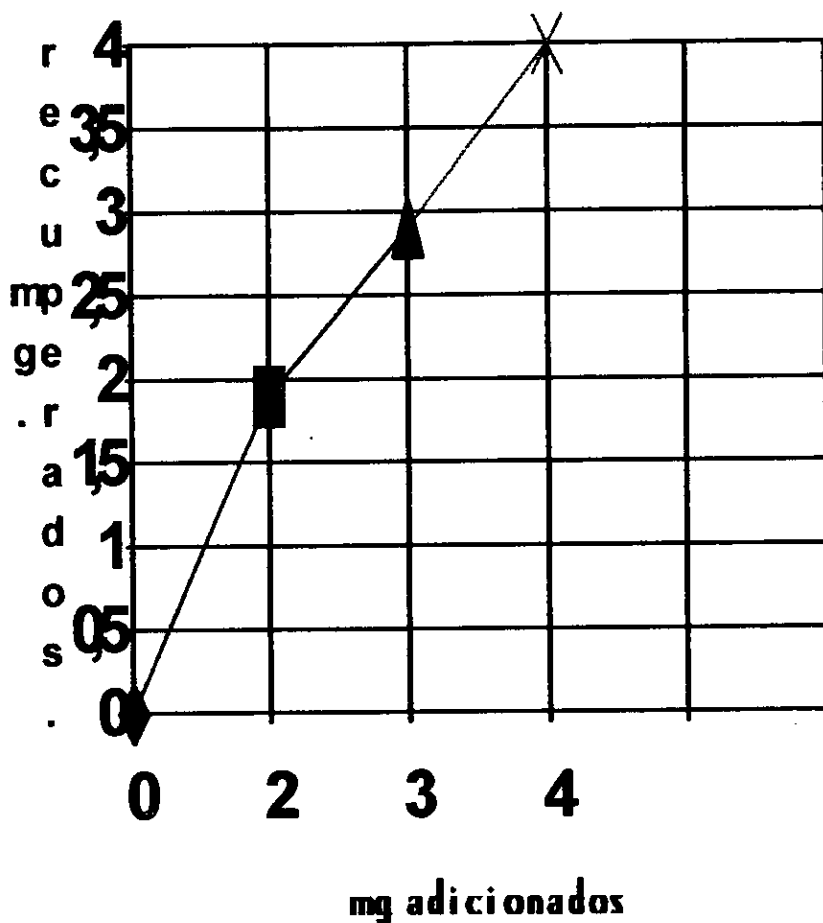
CUADRO 17. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD.

7.3. LINEALIDAD DEL METODO

mg ADICIONADO	mg RECUPERADO		
0.02	0.01986	0.01983	0.01975
0.03	0.02995	0.02996	0.02997
0.04	0.04026	0.04027	0.04088

% ADICIONADO	% RECUPERADO		
80	99.30	99.15	98.75
100	99.83	99.86	99.90
120	100.65	100.67	102.20

LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA 2. LINEALIDAD DE L METODO DE DEXAMETASONA

ESTADISTICA DESCRIPTIVA	
ΣX : 0.27	ΣY : 0.27073
ΣX^2 : 8.7×10^{-3}	ΣY^2 : 8.7842×10^{-3}
ΣXY : 8.7416×10^{-3}	
(No. de muestras) $n = 9$	
(No. de concentraciones) $C = 3$	
(No. de replicaciones) $re = 3$	

REGRESION LINEAL	
PENDIENTE (m) : 1.03	COEFICIENTE DE VARIACION (C.V) : 1.03%
ORDENADA AL ORIGEN (b): 0.0009	CORRELACION (r^2) : 0.9995
DESVIACION ESTANDAR (σ) : 1.033	CORRELACION (r) : 0.9997

TABLA DE ANADAVA				
FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	Glr = 1	6.4004×10^{-4}	6.4004×10^{-4}	MCr/MCer
ERROR DE REGRESION	Gler = n-2 7	3.2487×10^{-7}	4.641×10^{-8}	13791

TABLA I. ANALISIS DE VARIANZA PARA LINEALIDAD DEL METODO

F tab CRITERIO
(0.01, Glr, Gler) = 7.57

CRITERIOS DE ACEPTACION	
1. Si F calculada > F crítica por lo tanto existe una asociación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.	VALORES ENCONTRADOS F cal > F tab 13791 > 7.57
2. Si r^2 es mayor o igual de 0.98 de antemano nos indica que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.	$r^2 = 0.9995$
3. Si C.V es menor o igual a 1.5% Promedios de recobro 97 - 103%	C.V. = 1.03% PROMEDIO DE RECOBRO 101.7%

CUADRO IB. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEALIDAD DEL METODO.

7.4 PRECISION DEL SISTEMA

Cantidad adicionada mg	área
0.03	718383
0.03	721383
0.03	711415
0.03	718815
0.03	724545
0.03	715227

ESTADISTICA	
$\Sigma Y = 4309768$	Desviación estándar (σ) = 4596.16
$\Sigma Y = 3.09578 \times 10^{12}$	C.V. = 0.6398%
$Y = 718294.66$	
$n = 6$	

PRUEBA Ji CUADRADA.

CONDICIONES: GL $n-1 = 5$

$$\alpha = 0.05$$

$$Ji^2_{1-0.05/2} = 0.975 \text{ de tablas} = 12.832$$

$$Ji^2_{\text{cal}} = 6.0$$

CRITERIOS DE ACEPTACION

1. Si la prueba de Ji cuadrada $Ji^2_{\text{cal}} < Ji^2_{\text{tab}}$
calculada es menor o igual a $6 < 12.832$
Ji cuadrada de tablas.

2. Si C.V menor o igual a $C.V = 0.6398\%$
1.5%.

CUADRO 19. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA PRECISION DEL SISTEMA.

7.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

CANTIDAD ADICIONADA	AREA	CANTIDAD RECUPERADA	%DE RECOBRO
0.03 mg	627577	0.0300	100.00
0.03 mg	628786	0.0301	100.59
0.03 mg	630018	0.0302	100.66
0.03 mg	624243	0.0299	99.66
0.03 mg	626790	0.0300	100.00
0.03 mg	629720	0.0301	100.60

Se tomaron los datos de la precisión del método.

$$\Sigma R = 601.31$$

$$\sigma = 0.4193$$

$$\Sigma R^2 = 60303.25$$

$$C.V. = 0.4182$$

$$R = 100.25$$

$$n = 6$$

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma / \sqrt{n}}$$

$$t_{tab} (0.975, n-1) = 2.57$$

$$t_{cal} = 1.47$$

CRITERIOS DE ACEPTACION	
1. Si $t_{cal} < t_{tab}$ El método carece de error sistemático constante, por lo tanto el método es exacto al 100%.	VALORES ENCONTRADOS $t_{cal} < t_{tab}$ $1.47 < 2.5706$
2. C.V. < 1,5%	C.V. = 0.4182

CUADRO 20. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.

7.6 PRECISION DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	100.257	99.724
	100.450	100.131
	100.647	100.599
DIA 2	99.763	99.891
	100.114	100.166
	99.549	99.257

<i>ESTADISTICA DESCRIPTIVA</i>			
$\Sigma Y \dots$	= 1200.548	$\Sigma Y_{21}.$	= 300.454
$\Sigma Y_{1..}$	= 600.780	$\Sigma Y_{22}.$	= 299.314
$\Sigma Y_{2..}$	= 599.768	(Analista) $a=$	2
$\Sigma Y_{11}.$	= 301.354	(Días) $d=$	2
ΣY_{12}	= 299.426	(Replicaciones) $r=$	3

TABLA DE ANADAVA				
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal
ANALISTA	$(a-1)$	SCA _i	MCA _i	MCA _i /SCA _i
A _i	1	0.0854	0.0854	0.2042
DIAS	$\{a(d-1)\}$	SCD _i	MCD _i	MCD _i /MCE
	2	0.8361	0.41805	3.1
ERROR	$\{r-1\} \{ad\}$	SCE	MCE	
Ek(ij)	8	1.0568	0.1321	

TABLA 4. ANALISIS DE VARIANZA PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

ANALISTA $F_{a \text{ tab}} (0.05, a-1, a(d-1)) = 38.51$

DIAS $F_{d \text{ tab}} (0.05, a(d-1), ad(r-1)) = 6.06$

CRITERIOS DE ACEPTACION	
1. Si $(F \text{ calculada} \leq F \text{ tablas})$ no existe efecto de la fuente crítica de variación.	$F \text{ cal} \leq F \text{ tab}$ $0.2042 < 38.51$ $3.164 < 6.06$
2. Si C.V. es menor o igual a 2% de antemano nos muestra que existe una relación al- tamente significativa entre cantidad adicionada y can- tidad recuperada.	C.V. = 0.4238%

CUADRO 21. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA PRECISION DEL METODO.

7.7 TOLERANCIA

SE TRABAJO CON EL ESTANDAR SECUNDARIO DE DEXAMETASONA				
DISOLUCION AL 100 %.				
CONDICIONES NORMALES	30°C	40°C	75 rpm	125 rpm
665977	643218	668043	653496	666219
669126	647086	661078	651414	668016
663146	643186	668845	655444	664338
X = 666083	644497	665989	653451	666191
% = 100	96.75	99.98	98.55	100.01

CRITERIOS DE ACEPTACION	
1. El promedio de tolerancia no debe ser menor de 2% en comparación con el promedio al análisis normal	VALORES ENCONTRADOS 30°C 3.25% 40°C 0.02% 75 rpm 1.45% 125 rpm 0.00%

CUADRO 22. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EL ANALISIS DE TOLERANCIA.

VIII ANALISIS DE RESULTADOS

El iniciar la cuantificación de la dexametasona tabletas en la disolución y enfrentar el problema de que el método existente conducía a un exceso de material, a un largo período de análisis al realizar extracciones y reacciones de color, está última con un alto precio en los reactivos de azul de tetrazolium e hidróxido de tetrametil amonio y por ser una técnica implementada varios años atrás, la difícil adquisición de éstos, fue vital realizar modificaciones al método de análisis en la disolución los cuales fueron: suprimir la reacción colorimétrica cuyo tiempo de reacción requería de una hora (sin tomar en cuenta el tiempo de disolución y el tiempo de extracción) para luego ser cuantificada por espectrofotometría visible a 525 nm y adaptar el análisis a cromatografía de líquidos tomando como referencia el método de dexametasona tabletas establecido en la USP XXIII, cuyas condiciones a reproducir fueron: *fase móvil* (agua - acetonitrilo, 30:60), *columna* (octadecilsilano), *flujo* (2 ml/min), *tiempo de retención* (7 min) y *longitud de onda* (254 nm); bajo estos parámetros el resultado obtenido fue satisfactorio y mejorado en cuanto al tiempo de retención pues el obtenido fue de 2.2 min, aproximadamente favoreciendo un análisis mucho más rápido al previsto.

Para demostrar, que efectivamente, la técnica empleada fuera confiable, eficaz y válida, se realizó el análisis estadístico que marca la validación para disolución.

En primer lugar, se realizó el parámetro de especificidad con el objeto de verificar si existía interferencia de excipientes debido a que estos se encuentran en proporción elevada con respecto al principio activo, los cromatogramas mostraron ausencia de picos para los placebos, mostrando así la especificidad del método.

Uno de los parámetros críticos para la disolución fue la precisión, el análisis estadístico mostró coeficientes de variación menor de 1.5% y 2% para la precisión del sistema y método respectivamente, indicando que existe concordancia entre el conjunto de valores experimentales respecto al valor central y a condiciones diferentes (analista -día).

En cuanto al parámetro de linealidad para el sistema y el método a las concentraciones propuestas, el análisis estadístico cumplió satisfactoriamente con los requisitos de $C.V \leq 1.5\%$ y $r^2 \geq 0.98$ y $C.V \leq 2\%$, $m = 1.0$, $b=0$, $r^2 \geq 0.98$ y con promedio de recobro en el rango de (98 - 102%) respectivamente. Por lo tanto existe una relación directamente proporcional entre cantidades adicionadas y cantidades recuperadas.

Para la exactitud del método se utilizaron los datos de precisión del método, obteniendo un coeficiente de variación menor de 2% con un promedio de recobro en el rango de (98 - 102%), reportando que existe concordancia entre el valor obtenido y el valor real.

El segundo de los parámetros críticos para el método de disolución fue la tolerancia, aquí los criterios utilizados fueron una variación no menor del 2% del promedio a las condiciones de 30°C y 40°C, 75 y 125 r.p.m. con respecto al promedio de una muestra a condiciones normales. El método propuesto resulto ser tolerante a las condiciones de 40°C, 75 y 125 r.p.m.; no así a las condiciones a 30°C, la tolerancia obtenida fue de 3.25%, no obstante, el método es tolerante debido a que en una disolución existe un gran control sobre la temperatura y estos resultados nos obligan a ser más estrictos a temperatura menores de 37°C \pm 0.5.

IX CONCLUSIONES.

Uno de los motivos más importantes para iniciar la modificación del método fue prescindir de las extracciones y reacciones colorimétricas, lo cual significaba evitar manipular demasiado a la muestra, sin embargo, por la concentración muy baja en la disolución (0.0015 mg/ml) y el medio ácido (pH=0), no fue posible inyectar directamente al cromatógrafo, no obstante, el método cumplió con los objetivos propuestos, resultando ser un método apropiado, rápido y eficaz para la cuantificación de la dexametasona en la disolución, además de que es posible extrapolar el análisis para uniformidad de contenido y valoración, utilizando la preparación de un sólo estándar para todo el ensayo. Se cumplió con todos los parámetros de validación que se marcaron en farmacopea para disolución (Categoría 3: precisión y tolerancia) y los parámetros de linealidad, exactitud y especificidad.

Cabe mencionar que en las condiciones que se establecieron para HPLC la estabilización del sistema es rápida, con tiempos de retención cortos y sin deformación en los picos (coleo).

Por lo anterior se concluye que el método reúne todas las condiciones necesarias para su aplicación y puede ser usado como método de control de calidad.

ANEXOS

1. FORMULAS DE CALCULO

$$\Sigma X = X_1 + X_2 + \dots + X_n$$

X: Cantidad adicionada

$$\Sigma Y = Y_1 + Y_2 + \dots + Y_n$$

Y: Cantidad recuperada

$$\Sigma X^2 = X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_n^2$$

$$\Sigma Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + \dots + Y_n^2$$

$$\Sigma XY = X_1Y_1 + X_2Y_2 + \dots + X_nY_n$$

r: coeficiente de correlación

$$r^2 = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X) - (\Sigma X) \quad n(\Sigma Y) - (\Sigma Y)}$$

$$r = \sqrt{r^2}$$

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X}{n}$$

n: No. muestra totales

$$\sigma = \left(\frac{N(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}{N(N-1)} \right)$$

F: factor preliminar
para obtener C.V
 σ : Desviación estándar

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

C.V: Coeficiente de variación

$$m = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

m: Pendiente

R: Por ciento recuperado

α : Nivel de significancia

$$b = \frac{\Sigma Y - m(\Sigma X)}{n}$$

b: Ordenada al origen

$$S_{x/y} = \frac{\Sigma Y^2 - b(\Sigma Y) - m(\Sigma XY)}{n-2}$$

$S_{x/y}$: Desviación estándar de la regresión.

Intervalo de confianza para la pendiente :

$$m \pm t(0.975, n-2) * S_{y/x} \left[\frac{1}{\frac{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Intervalo de confianza para el origen:

$$b \pm t(0.975, n-2) * S_{y/x} \left[\frac{\frac{\bar{X}^2}{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2} + \frac{1}{n}}{n} \right]^{1/2}$$

$$t_{cal} = \frac{b}{S_{y/x} \left[\frac{\frac{\bar{X}^2}{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2} + \frac{1}{n}}{n} \right]^{1/2}}$$

Análisis de varianza de la reproducibilidad del método

El modelo hipotético es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \sigma_j(i) + \varepsilon(ij)$$

Y_{ijk} : Es el ensayo de la sustancia de interés a la k ésima muestra analizada por i ésimo analista en j ésimo día

μ : Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés de la muestra..

α_i : Efecto del analista en el ensayo (donde $i=1$ hasta a)

$\sigma_j(i)$: Efecto del día anidado en el analista en el ensayo (donde $j=1$ hasta d)

$\varepsilon(ij)$: Error del método analítico (donde $k=1$ hasta r)

$$Y_{11.} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12.} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21.} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22.} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

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

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

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

BIBLIOGRAFIA

1. Griffith H. Winter, *Guía de usos de medicamentos*, 9a. ed. Ed. Interamericana (1993) . pp. 249-245 .
2. Wesley Clark, *Farmacología Clínica* 12 ed. Ed. Médica Panamericana S.A. de C.V. (1990), pp. 433-450.
3. Biofarmacia J.M. AIACHE; Ed. Manual Moderno S.A. (1983). pp. 85-99.
4. Nigel W.R. *Antiinflammatory compounds*; Ed. Marcel Delker. (1987). pp. 25,26,180,350.
5. Dekker M., *Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes*. (1988). pp. 1-27.
6. Rodríguez C.R.; *Vademecum de Medicamentos*; Dirección General de publicaciones de la UNAM. México D.F. (1978). pp. 197-267.
7. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM)*; México D.F. ed. 40 (1994). pp. 190-195.
8. Clarke E.G.; *Isolation and Identification of Drugs* vol. 1 The Pharmaceutical Press London (1984). pp. 578.
9. *British Pharmacopeia*; Vol. 1; Her Majestys Stationary Office University Press. England (1980). pp. 140-142.
10. *The Merck index*; 10a. ed.; Published by Merck Co. Inc. Rahway, New York, U.S.A. (1983). pp. 425, 925 y 1051.
11. *Martindale, The Extra Pharmacopeia*. 27 th. ed. London The Pharmaceutical Press. (1972). pp. 36, 515, 519, 1387.

12. **Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos; 5th. ed. México D.F. (1988).**
13. **The United States Pharmacopeia; 23a. From January 1; (1995). pp. 291-294.**
14. **Grahan, R. and Kenner T.; Rapid blue Tetrazolium procedure for analysis of corticosteroids in pharmaceutical preparations, J. Pharm. Sci. 67, (6) 792-795. (1978).**
15. **Robertson G., Analysis of steroids Phosphates by high pressure liquid chromatography, J. Pharm. Sci. 67, 913-915. (1978).**
16. **Gupta. V., Quantitative dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate by high pressure liquid chromatography; J. Pharm: Sci. 68, (7). 926-928. 1984**
17. **Brian A. Bidlingmeyer; Practical HPLC Methodology and Applications; Ed. Jonh Wiley & Sons. Canada. (1992). pp. 207-331.**
18. **Howard A.S.; Chemical Instrumentation a Systematic Approach; 30a. ed.; Ed. Jonh Wiley & Sons. (1989). pp. 456-490.**
19. **Higuchi. T.; Pharmaceutical Analysis, Ed. John Wiley & Sons.; United States (1972). pp. 72-127.**
20. **Friend J. and Edwards. J.A.; Organic Reactions in steroid Chemistry.; Vol. 1; Ed. Van Nostrand Rernhold Company. (1972). pp. 61-101.**
21. **Klyne W.; Química de los esteroides; Ed. Continental. S.A. (1980). pp. 1-54.**

22. **Murthy K.S.; Current Perspectives on the Dissolution Stability of Solid Oral dosage forms.; J. Pharm. Sci. 82 (2) Febrero 1993.**
23. **Marr. J. G. D.; Novel techniques for Purity Assessment by High Performace Liquid Chromatography Their Implication for Pharmacoepia Use.; Anal Proc. 25 (150-153) 1988.**
24. **Abdou M.; Dissolution Bioavailability and Bioequivalence.; J. Pharm: Sci. 79 (4) Abril 1990.**
25. **Jashnani N. R.; Validation of and improved Wood's Rotating Disk Dissolution Apparatus.; J. Pharm Sci. 82 (6) June 1993.**
26. **Mooney K. G.; Dissolution with Chemical Reaction: Reversible versus Irreversible Chemical Reactions.; J. Pharm. Sci. 79 (11) Nov. 1990**
27. **Drewe J.; In Vitro-in Vivo Correlation for Modified-Release Formulations.; J. Pharm. Sci. 82 (2) Feb. 1993.**
28. **Shah V. P.; Analytical Methods Validations Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies.; J. Pharm: Sci. 81 (3) March 1992.**
29. **Beysac B. E.; New Method of dissolution In Vitro the Bio-dis Apparatus: comparison with the rotating botte method and In Vitro-in vivo correlations.; J. Pharm: Sci. 80 (10) 991-994 Oct. 1991.**

TABLA DE CONDICIONES POR HPLC.

MTHEDIT Summary - C:\TC4\DATA2\TABDEX.MTH

Data Acquisition and Instrument Control

Instrument Name: S200 COM LC235C	Injection : MANUAL	Detector : LC135/235
Experiment Time: 3.00 min	Injection Volume:	Wavelength A : 255 nm
Delay Time : 0.00 min	Sampling Rate : 2.44140 pts/s	Wavelength B : 255 nm
Bus Time : 3.00 min	Channel : A	Spectral Mode: AUTO

Solvent A:A	Step	Step Time	Flow	Solvent A	Solvent B	Solvent C	Solvent D	Curve
Solvent B: ACETONITR	0	0.0	2.00	0.0	30.0	70.0	0.0	0.0
Solvent C: AGUA	1	3.0	2.00	0.0	30.0	70.0	0.0	0.0
Solvent D: D								

Data Processing and Reporting

Replot Pages: 0	BF	: 10	User Programs: 0
Scale Factor: 0.000000	MT	: 15 μ V	Report Files : 0
Offset : 250.000 mV	AT	: 100.00 μ V	
Scale : 300.000 mV	Timed Events: 0		

Component List and Calibration

Components : 0	Volume Units : μ l	Unidentified Peaks	: Use Calibration Factor
Named Groups: 0	Sample Volume: 1.000	Global Calibration Factor: 1.000000e+06	
Timed Groups: 0	Quant Units : mg	Reject Outliers	: NO
Calibration : EXT0	Void Time : 0.000 min	Outlier Tolerance	: 3.00 t

TABLA 1. CONDICIONES CON LAS QUE SE TRABAJA CON EL EQUIPO DE HPLC.