



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO DE CLONIXINATO
DE LISINA Y KETOROLACO TROMETAMINA EN UNA
SOLUCIÓN INYECTABLE POR CROMATOGRFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

NÉSTOR VILLATORO ALVAREZ

ASESOR: M. en C. ELVIA ADRIANA MORALES HIPÓLITO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Validación de un método analítico para determinar contenido químico de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina en una solución inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

que presenta el pasante: Néstor Villatoro Álvarez
con número de cuenta: 30031071-1 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Octubre de 2008

PRESIDENTE	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
VOCAL	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Gabriela Vargas Martínez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MI. Claudia Mariano Hernández</u>	

"El azar favorece a una mente bien preparada"
Louis Pasteur

*"Todos somos ignorantes. Lo que ocurre es que no todos
ignoramos las mismas cosas"*
Albert Einstein

*"Empieza por hacer lo necesario, luego lo que te es posible y
un día acabarás haciendo lo imposible"*
Anónimo

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por todo el apoyo otorgado durante todo este tiempo, nunca olvidare a mi *alma Mater* que me ha dado esta oportunidad; la oportunidad de ser universitario. **Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR)**, gracias por todo el conocimiento otorgado durante mi estancia en este. **Farmacéuticos Rayere**, gracias por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis. **Dra. Raquel López Arellano y Prof. Juan José Díaz Esquivel**, gracias por depositar su confianza en mí y proporcionarme todo su apoyo en cualquier momento, nunca los voy a olvidar ya que son personas a quienes yo admiro mucho. **Elvia Adriana Morales Hipólito**, gracias por ser mi asesora, mi “jefa” de trabajo durante todo este tiempo, no tengo duda de que aprendí muchas cosas a tu lado; sabes que te admiro mucho, no solo como profesionista, sino también como persona. **Guadalupe Alvarez Ávila**, gracias “lupis” por todo el apoyo que me brindaste durante la elaboración de esta tesis, gracias a ti adquirí mucha experiencia acerca de lo que significa ser profesionista. **Gabriela Rodríguez Patiño**, gracias por ser una amiga y compañera de trabajo excelente, he pasado muy buenos momentos contigo y espero seguir teniendo tu valiosa amistad, también muchas gracias por ser analista 2 en esta tesis. **Alinne Santander**, gracias por ser una compañera de trabajo y una gran persona. **Hugo Cuatecontzi y Sandra Liliana**, chicos con ustedes pase grandes momentos y el trabajo se convirtió en algo muy ameno y divertido, nunca cambien. **Claudia Mariano, Claus**, gracias por apoyarme durante la realización de esta tesis, contigo aprendí mucho acerca de estadística, legislación, farmacia y de la vida misma, espero contar siempre con tu apoyo. **Profesor Garduño**, gracias profe por su paciencia y apoyo en la realización de esta tesis (ya le debo una hortaliza de manzanas por todas las asesorías); aprendí mucho de usted y espero seguir aprendiendo. **Doctoras Gaby Vargas y Alma Revilla**, muchas gracias profesoras por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis. **Abdiel García**, “familia” muchas gracias por tu apoyo y tu amistad, pase muy buenos momentos contigo y me gustaría seguir teniendo tu amistad; eres una gran persona y se que vas a tener éxito en todo lo que emprendas. **Alma Villaseñor y Leticia Nieto**, aunque pase un tiempo muy corto con ustedes le agradezco su amistad y los buenos ratos. **Ing. Draucin Jimenez**, gracias por su ayuda en la reparación y diseño del material de vidrio. A todos mis amigos y compañeros durante la carrera: **Caty, Faby, Carlos, Pablo, Pam, Miguel, Emma, Alejandro (Streptorostro), Bety, Marisol, Patilu, Joel, Mark, Tin, la comunidad y todos los que haya olvidado**; a todos ustedes muchas gracias por su compañía, apoyo y toda la confianza que depositaron en mí.

Les deseo éxito en todo lo que emprendan.

Dedicatorias

A mi madre: Elizabeth Alvarez Florez

Gracias por depositar toda tu confianza en mí, este logro también es tuyo, si he llegado hasta aquí, ha sido por tu ejemplo y tus ganas de triunfar en la vida, eres mi modelo a seguir; eres una mujer que no se derrota frente a las adversidades de la vida y siempre tiene un buen estado de ánimo, te amo mamá.

A mi hermano Edmar

Tu también me has apoyado cuando lo he necesitado y hemos vivido tantas cosas juntos, te quiero mucho y te deseo mucho éxito en la vida.

A mi novia Bety

Gracias por compartir este tiempo conmigo, cada vez que me he sentido derrotado me he levantado sabiendo que te tengo a mi lado, te amo porque eres el regalo mas hermoso que me ha obsequiado la vida, esta tesis también es tuya.

A Jhonny (Potter)

Has sido mas que un compañero de la carrera, eres un hermano para mí, te conozco desde la infancia, hemos vivido tantas cosas juntos y aún nos faltan muchas cosas más por vivir, estoy muy agradecido por conocerte.

A toda la banda natural índigo

Gracias chicos por compartir momentos inolvidables conmigo, son unos amigos geniales y estoy muy feliz de conocerlos.

A toda mi familia

Siempre han estado al pendiente y nos han apoyado cuando lo hemos necesitado, gracias a mis abuelos, a mis tíos, etc.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	
2.1. Objetivo general.	3
2.2. Objetivos particulares.	3
3. Marco teórico	
3.1. Validación	4
3.1.1. Especificidad	6
3.1.2. Adecuabilidad del sistema	6
3.1.3. Precisión	6
3.1.3.1. Precisión del sistema	7
3.1.3.2. Precisión del método	7
3.1.4. Linealidad	
3.1.4.1. Linealidad del sistema	7
3.1.4.2. Linealidad del método	8
3.1.5. Exactitud	8
3.1.6. Estabilidad analítica de la muestra	8
3.1.7. Robustez	8
3.1.8. Tolerancia	9
3.1.9. Rango	9
3.2. Cromatografía	10
3.3. Ketorolaco trometamina	
3.3.1. Propiedades fisicoquímicas	13
3.3.2. Características terapéuticas	14
3.3.3. Farmacocinética y farmacodinamia	14
3.3.4. Formas farmacéuticas	15
3.3.5. Métodos analíticos reportados para su análisis	16
3.4. Clonixinato de lisina	
3.4.1. Propiedades fisicoquímicas	18
3.4.2. Indicaciones terapéuticas	19
3.4.3. Farmacocinética y farmacodinamia	19



3.4.4. Formas farmacéuticas	20
3.4.5. Métodos analíticos reportados para su análisis	21
4. Diagrama de actividades a realizar.	22
5. Procedimiento experimental	
5.1. Materiales y reactivos	23
5.2. Ensayo	24
5.2.1. Condiciones cromatográficas.	26
6. Resultados y análisis	
6.1. Selección de condiciones óptimas de trabajo.	27
6.2. Validación	
6.2.1. Especificidad	29
6.2.2. Adecuabilidad del sistema	31
6.2.3. Precisión del sistema	31
6.2.4. Linealidad del sistema	32
6.2.5. Precisión y exactitud del método	36
6.2.6. Linealidad del método	39
6.2.7. Repetibilidad y reproducibilidad del método.	45
7. Conclusiones	51
8. Anexos	
Anexo 1. Preparación de soluciones.	52
Anexo 2. Formulas	55
Anexo 3. Fórmulas y procedimiento de cálculo del “Modelo de diseño anidado”.	56
Anexo 4. Resultados.	59
Anexo 5. Definiciones.	63
Anexo 6. Símbolos y abreviaturas.	67
Anexo 7. Índice de tablas.	69
Anexo 8. Índice de figuras.	70
9. Referencias	52



1. Introducción

La validación de métodos analíticos ha sido un requisito fundamental al momento de liberar un medicamento al mercado, por lo que es necesario tener toda la documentación que demuestre que existe un método analítico que asegure el contenido del fármaco en la forma farmacéutica. Existen algunas guías que permiten realizar la validación de manera adecuada y que proporcionan un grado de confiabilidad en los resultados obtenidos de la validación; guías como la del colegio de químicos farmacéuticos biólogos (CNQFB) a nivel nacional o como la de la administración de alimentos y drogas (Food and Drug Administration, FDA) en Estados Unidos.

Existen casos en los que los métodos de análisis para un determinado producto han sido aplicados durante mucho tiempo, en estos casos se realiza una *validación retrospectiva* a partir de los datos que se han generado durante el tiempo que ha permanecido ese método analítico; por otra parte, se realiza una *validación prospectiva* cuando un nuevo producto farmacéutico está por lanzarse al mercado y una *validación concurrente* a aquella en la cual se está realizando la validación del método analítico a la par de que se está formulando un nuevo producto farmacéutico.

A través del tiempo las técnicas analíticas relacionadas con la cuantificación e identificación de sustancias han evolucionado de una manera relevante, tal es el caso de la cromatografía de líquidos que comenzó con pequeños cilindros empaquetados con silicato, el cuál era de tamaño de partícula muy grande, hasta lo que ahora es la cromatografía de líquidos de alta resolución, e incluso ahora se habla de tecnologías más sofisticadas como la ultra cromatografía UPLC por sus siglas en inglés (Ultra Performance Liquid Chromatography).

La cromatografía de líquidos (principalmente la cromatografía de líquidos de alta resolución, CLAR), se ha convertido en una herramienta fundamental al momento de identificar o cuantificar cantidades muy pequeñas de sustancias, con un menor tiempo. Es por eso que se publican gran cantidad de artículos en las revistas científicas (tan solo 256,872 en la base de datos Elsevier –<http://bidi.unam.mx>- desde 1990 hasta diciembre 2008).



En este trabajo se presentan los criterios de validación necesarios para validar un método analítico para determinar el contenido químico de una solución inyectable. En la primera parte de este trabajo se presenta de manera resumida los conceptos de validación, cromatografía y de las características físico-químicas de los dos fármacos involucrados (Clonixinato de lisina y ketorolaco trometamina –ambos antiinflamatorios no esteroideos-).

La segunda parte contiene el diagrama de actividades a realizar, procedimiento experimental, material empleado, reactivos involucrados en la elaboración de este trabajo.

La parte final indica, por medio de figuras y tablas los resultados obtenidos de la validación del método, así como el respectivo análisis a cada parámetro de validación evaluado y las condiciones o conclusiones a las que se llegó en este trabajo.



2 Objetivos

2.1 Objetivo general

- Validar un método analítico para determinar el contenido químico de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina en una solución inyectable por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

2.2 Objetivos particulares

- Realizar una investigación de antecedentes teóricos y normativos sobre la validación de métodos analíticos para tener un concepto claro acerca de los requisitos implicados en su realización.
- Elaborar un protocolo de validación en base a las guías de validación disponibles CNQFB, ICH y FDA para realizar la validación del método analítico.
- Realizar los estudios de laboratorio pertinentes, a partir de lo descrito en el protocolo de validación para obtener la información necesaria y demostrar que las cualidades del método son adecuadas para obtener resultados confiables.
- Evaluar el desempeño de las siguientes cualidades del método: especificidad, precisión del sistema, precisión del método, linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad.

3. Marco teórico

3.1 Validación

La **validación de métodos analíticos** se define como: “El proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de un método analítico cumplen con los requerimientos para su aplicación analítica, y que será libre de problemas durante su uso”^[3]. Otra definición la podemos encontrar en la FDA (Food and Drug Administration): “Es el proceso de demostrar que el procedimiento analítico es adecuado para lo que se intenta usar”^[4].

En la guía de validación de métodos cromatográficos se indica que: “la validación de un método es un proceso en el cual un método es probado por el creador o por el usuario para demostrar confiabilidad, precisión y exactitud”^[5].

A nivel nacional se tiene la NOM-059-SSA1-1993 la cual define validación como: “Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.”^[6]

La validación de métodos analíticos es una parte importante en la industria farmacéutica, ya que de esta depende la aceptación o el rechazo de un lote de medicamentos y por lo tanto su liberación a la venta en el mercado.

La validación de métodos analíticos nos permite saber el contenido químico del o los fármacos presentes en una forma farmacéutica, lo cual permite asegurar la homogeneidad de la dosificación, evitando así que se tengan problemas terapéuticos, como el caso de una falta en la dosis efectiva o que se tenga una dosis tóxica en aquellos medicamentos que tienen un margen de seguridad muy estrecho y que se requiere tener mucho cuidado al momento de dosificar. De acuerdo a la USP en el apartado <1225> se mencionan las características que son consideradas básicas para la validación de métodos^[7]



Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos⁽¹⁰⁾

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Linealidad
- Intervalo
- Robustez

Los parámetros necesarios para realizar la validación de un método analítico enfocado a la determinación de contenido químico en una formulación son semejantes entre los distintos autores y tienen un grado de concordancia con los documentos regulatorios internacionales; por ejemplo la farmacopea de los estados unidos, la guía de la FDA y la guía de la ICH, tal como se puede ver en la siguiente tabla:

Tabla 1. Parámetros de validación a emplear para contenido químico de acuerdo a distintas referencias							
Parámetro de desempeño	Referencia empleada						
	Guía CNQFB ^[3]	Guía FDA ^[8]	USP ^[7]	ICH ^[9]	Waters ^[10]	Ermer & Miller ^[11]	Quattrocchi ^[12]
Precisión del sistema	+	+	+	+	+	+	+
Adecuabilidad del sistema	+	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
Linealidad del sistema	+	+	+	+	+	+	+
Especificidad	+	+	+	+	+	+	+
Exactitud	+	+	+	+	+	+	+
Repetibilidad	+	+	nd	+	nd	+	nd
Linealidad del método	+	+	+	+	+	+	+
Precisión del método o precisión intermedia	+	+	+	+	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	*	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
Límite de detección	-	-	-	-	+	-	nd
Límite de cuantificación	-	-	-	-	+	-	nd
Robustez	+	+	nd	nd	+	Nd	+
Tolerancia	+	+	nd	nd	+	Nd	nd
Rango	nd	nd	nd	+	nd	+	nd

Nd: No definido; +: Sí se evalúa la prueba; -: No se evalúa la prueba. **Waters, USP e ICH:** Los puntos indicados son considerados como validación de métodos de manera global. * Dependiendo de la naturaleza del método.



3.1.1 Especificidad

Se puede definir como la capacidad que tiene el método para producir un cambio en la señal analítica únicamente provocada por el analito y no por alguna de las sustancias interferentes (tales como impurezas de síntesis, productos de degradación o bien la interferencia de alguno de los excipientes). De acuerdo a la ICH^[9] se aplica el término especificidad a cualquiera de los siguientes casos: demostrar que las impurezas no interfieren con el análisis o no interfieren con las valoraciones. Otra opción que se puede utilizar para demostrar la especificidad de un método es por medio de la prueba de pureza de pico, la cual utiliza un detector de ordenamiento de fotodiodos, el cual mide el nivel de la pendiente del pico cromatográfico y de su espectro^[12]. De acuerdo a la guía del CONQFB[3] se sugiere que para demostrar la especificidad de un método analítico es necesario realizar un análisis con la adición de cualquiera de los productos de degradación, y de no tenerse es necesario producirlos, ya sea por hidrólisis (por medio de un baño de agua y calentamiento o por reflujo durante 1 hora^[12]), termólisis (105°C), hidrólisis alcalina (hidróxido de sodio 1N), hidrólisis ácida (ácido clorhídrico 1N), fotólisis u oxidación.

3.1.2 Adecuabilidad del sistema^[3]

También llamada “aptitud del sistema”^[7] más que ser un criterio de validación como tal, es considerada como un requisito previo al comienzo de la experimentación, ya que este parámetro va a demostrar que el equipo funciona de manera adecuada y que las variaciones que se puedan obtener no sean debidas al sistema, por ejemplo: mal funcionamiento de la bomba (flujo inadecuado), problemas de detección (periodo de vida de la lámpara del detector agotado o presencia de suciedad en las lentes), problemas de muestreo (inyector del automuestreador descompuesto o presencia de burbujas de aire en el mismo), variaciones de presión (provocados generalmente por la acumulación de sales en las tuberías, lo cual conduce a la elevación de presión y consecuentemente que se detenga el equipo debido a presiones fuera del límite).

3.1.3 Precisión

De manera general se puede definir a la precisión como el grado de concordancia (dispersión de los datos con respecto a un valor promedio^[12]) entre datos obtenidos bajo las mismas condiciones analíticas^[3, 8]. De acuerdo a la guía CNQFB la precisión se ha dividido en sistema y método (el sistema se evalúa por medio de estándares y método por



medio de la preparación de varias muestras analíticas^[12]). Otros autores^[3, 8, 11] sugieren que para realizar un estudio más detallado es necesario que la precisión tenga tres componentes: repetibilidad (consistente en realizar mediciones múltiples, mismo analista y mismas condiciones analíticas y expresar el resultado en CV), tolerancia^[7] (que se realiza con distintos analistas, días, instrumentos -estos parámetros se evalúan dependiendo del tiempo y los recursos que se tengan-) y precisión intermedia (precisión obtenida entre distintos laboratorios).

3.1.3.1 Precisión del sistema

De acuerdo a la guía CNQFB^[3] se define como un “sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que representa la concentración de la solución de referencia... representativa al 100%”^[3], sin embargo, es recomendado preparar tres soluciones estándar que representen 3 niveles de concentración^[7] (uno que represente el 100% y un nivel superior e inferior, respectivamente) de la muestra analítica; de esta manera se puede realizar un análisis más detallado de la precisión del sistema.

3.1.3.2 Precisión del método

Al igual que en la precisión del sistema se preparan tres niveles de concentración (tres placebos adicionados) y a cada nivel se le realiza seis veces el procedimiento de ensayo (el ensayo comprende “desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento”^[12]); pero con la diferencia de que se prepara una muestra homogénea del producto.

3.1.4 Linealidad

3.1.5 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema tiene la finalidad de demostrar la proporcionalidad que hay entre la concentración de analito y la respuesta obtenida^[12], los datos obtenidos deben ser proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida^[7]. La guía FDA indica que la linealidad debe corresponder a un rango que obedezca la ley de Beer^[8] y la guía ICH recomienda que se establezca un intervalo de mínimo 5 concentraciones (solución estándar equivalente al 100%, dos niveles superiores y dos niveles inferiores –un intervalo recomendado es del 80-120%^[9])



3.1.6 Linealidad del método

La linealidad del método tiene una finalidad diferente a la del sistema, ya que en el sistema se demuestra que el equipo está presentando proporcionalidad entre la respuesta y concentración de analito^[8] (esta respuesta depende del tipo de analito y del tipo de detector utilizado); en la linealidad del método la finalidad es demostrar que sin importar la proporción en que se encuentren los fármacos de interés y los excipientes presentes en la misma formulación, el método es capaz de detectar y cuantificar un determinado analito, sin importar la presencia de otros componentes presentes (excipientes u otros analitos).

3.1.7 Exactitud

También es conocida como *error sistemático* o *tendencia*^[12] y es una medida de que tan cercano está el valor experimental a el valor verdadero^[8] y se debe realizar en tres niveles de concentración (valores recomendados 80, 100, 120%)^[9], cada uno de los niveles se debe realizar por triplicado. Esta cualidad del método se puede evaluar durante prueba de desempeño de precisión del método.

3.1.8 Estabilidad analítica de la muestra

Es una propiedad de la muestra de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas (dependiendo de en que parte del proceso deseamos realizar el estudio de estabilidad, puede ser la muestra inicial como tal o en la parte final cuando la muestra se encuentra en el automuestreador, lista para ser inyectada). La estabilidad analítica de la muestra, al igual que la adecuabilidad, no es un criterio de validación estrictamente requerido^[3] sin embargo nos permite saber que tiempo tenemos para analizar la muestra, antes de que pierda sus propiedades fisicoquímicas.

3.1.7 Robustez

De acuerdo a Ermer^[11] este es uno de los parámetros de validación de mayor importancia, pero que generalmente pasa por inadvertido; este criterio de validación consiste en evaluar el método frente a cambios pequeños y deliberados, por ejemplo (en el caso de cromatografía de líquidos^[9]: Variaciones de pH, en la composición de la fase móvil, columnas (diferentes lotes/proveedores), temperatura, velocidad de flujo; sin



embargo, las variaciones deben de simular una variación “realista” de las posibles variaciones que se obtengan^[8].

Debido a que algunas variaciones inevitablemente producen cambios drásticos en la respuesta obtenida no necesariamente es “robusto” frente a todas las condiciones impuestas, así que lo que se reporta es el rango en el que se puede variar cada una de las condiciones sin producir alteraciones en los resultados^[12]; cabe mencionar que generalmente este tipo de estudios se realizan durante la etapa de desarrollo del método, antes de comenzar la validación del método como tal^[7] o bien se puede realizar de manera retrospectiva, a partir de los resultados históricos obtenidos en diferentes condiciones, pero en el caso de métodos nuevos, es conveniente que el estudio sea efectuado por el laboratorio que esta desarrollando el método^[12].

3.1.8 Tolerancia

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos bajo una variedad de condiciones (diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, reactivos, días^[10]), y esta expresada en términos de CV. En la guía ICH no se encuentra una definición como tal de tolerancia, en lugar de eso consideran la tolerancia como un parámetro involucrado con la precisión (precisión intermedia), sin embargo, en la guía de CNQFB se puede encontrar que la robustez se refiere a la influencia de los factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos del método^[3] y hace énfasis a que robustez y tolerancia no son lo mismo.

3.1.9 Rango

Se le considera rango al intervalo desde la concentración más baja hasta la concentración más alta del analito de interés. Este rango debe de cumplir con la ley de Beer (como se vio en linealidad del sistema)^[3].



3.2 Cromatografía

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) es una herramienta muy útil en el momento de demostrar la presencia de un analito o para su cuantificación; utilizando cantidades muy pequeñas y realizando el análisis en tiempos muy cortos; algunas de las aplicaciones de la cromatografía de líquidos son la separación, identificación, purificación y cuantificación de varios compuestos. Esta herramienta fue desarrollada a mediados de los años 70 y rápidamente mejorada, desarrollando mejores empaques en las columnas y detectores más específicos^[13].

Es importante saber que hay una gran variedad de tipos de cromatografía de líquidos de acuerdo al tipo de analito que se desea analizar y que sus aplicaciones son tan amplias que abarcan desde la biotecnología, investigación biomédica, industria cosmética, industria alimenticia, así como la industria farmacéutica (la cual comprende alrededor del 50% de los usuarios^[13]).

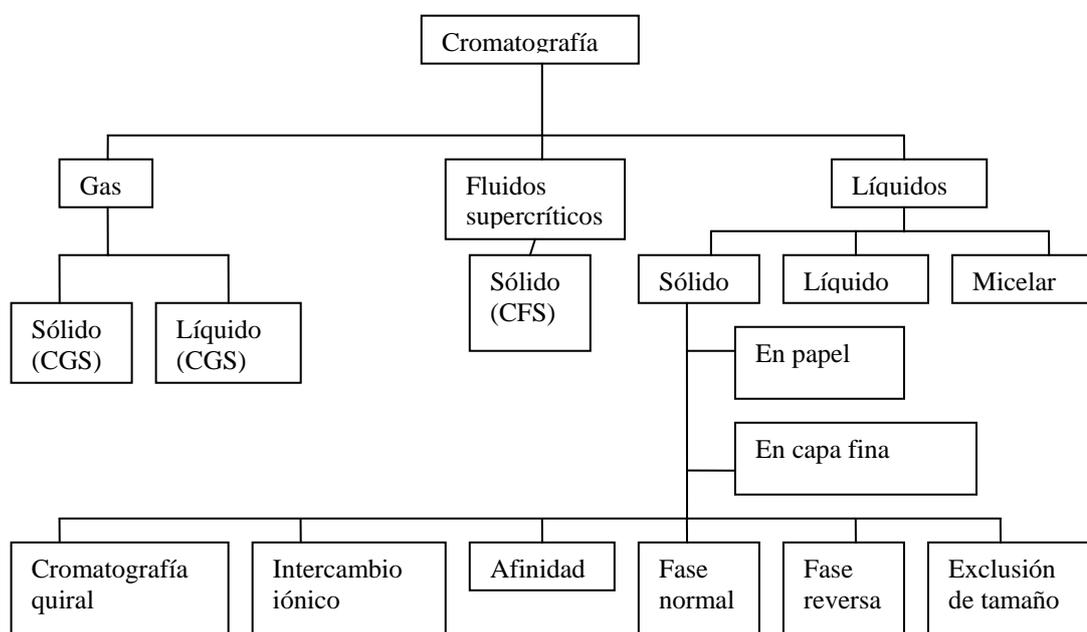


Fig. 1 Tipos de cromatografía de líquidos (adaptado de ref. 12)

La separación en cromatografía se basa en la interacción de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los métodos más comunes de cromatografía de líquidos se pueden dividir en los siguientes^[14]:



Tabla 2. Tipos de cromatografía y condiciones de fase móvil y fase estacionaria

Tipos	Fase Móvil	Fase estacionaria
Papel	líquido	Líquido
Capa fina	Líquido	Sólido
Fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Intercambio iónico	Líquido	Sólido
Exclusión	Líquido	Sólido
Fluidos supercríticos	Fluido supercrítico	Sólido
Gases	Gas	Sólido o líquido

Tabla 3. Clasificación de la cromatografía líquido – sólido y su fundamento

Tipo de cromatografía	Fundamento
Cromatografía quiral	Consiste en la separación de enantiómeros con fases estacionarias quirales por formación de diaesterómeros por agentes de derivatización o aditivos en la fase móvil en fases estacionarias aquirales.
Intercambio iónico	La fase estacionaria es un sólido con grupos iónicos inmovilizados, el mecanismo dominante de separación para muestras con iones negativos es el intercambio aniónico, mientras que para muestras con iones positivos es el intercambio catiónico. El gradiente de pH es una herramienta muy común.
Par-ion	Se utiliza cuando se requiere mantener al analito en su estado ionizado pero las condiciones requeridas de acidez o alcalinidad son muy altas y pueden dañar la columna. Consiste en aplicar un contraión al analito de interés. La separación depende del tipo de modificador orgánico, la cadena alquílica del contraión y por su concentración.
Fase normal	Utiliza solventes orgánicos para la fase móvil y una fase estacionaria polar (por ejemplo, sílice porosa); los componentes menos polares eluyen más rápido que los componentes más polares.
Fase reversa	Utiliza una fase estacionaria no polar silanol (SiOH) y agua como solvente base en la fase móvil; la separación es influida por la temperatura de la columna y el pH. De manera general, los componentes más polares eluyen primero.
Exclusión molecular o exclusión en gel	La separación se da por el tamaño molecular ya que funciona como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas según un orden decreciente de tamaño (moléculas más grandes son las que eluyen primero). Si se disponen de estándares adecuados puede llegar a evaluarse el peso molecular de un compuesto desconocido la distribución de pesos moleculares de un polímero sintético.



Para el caso particular de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), existen diversos métodos para determinar su contenido químico, tales como: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, espectrometría de masas; Ejemplos de antiinflamatorios cuantificados por cromatografía de líquidos son: fenilbutazona^[27] (determinada por CLAR con detección UV), naproxen^[28] (determinado por CLAR), indometacina^[29] (determinado por cromatografía micelar electrocinética y electroforesis capilar) y el ácido etacrínico^[30] (determinado por cromatografía de gases).

Sin embargo, a nivel farmacopeico no existe un método de análisis que permita determinar el contenido químico de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina, es por eso que es necesario validar un método analítico para su determinación en una solución inyectable.



3.3 Ketorolaco trometamina^[23]

3.3.1. Propiedades fisicoquímicas

Peso molecular (Ketorolaco): 255.2686;

(trometamina) 121.1350

Fórmula condensada $C_{15}H_{13}NO_3$;

$C_4H_{11}NO_3$

Log P (ketorolaco) 2.45 ± 0.88 ^[23]

pKa 3.49^[17, 23]

Descripción: polvo cristalino, color blanco a ligeramente blanco.

Solubilidad: Muy soluble en alcohol y agua, insoluble en acetato de etilo y hexano.

Pérdida al secado: 0.05%

Residuos de ignición: 0.01%

Metales pesados: menor al 0.002%

Ensayo 99.5%

Densidad aparente: 0.32 g/mL

Densidad consolidada: 0.52 g/mL

Tamaño de partícula: 90% menor a 60 micras, 50% menor a 30 micras

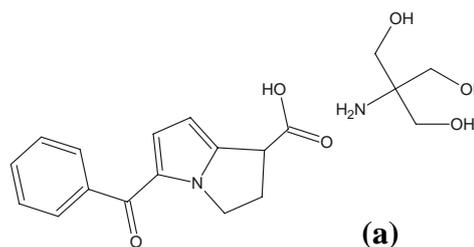


Figura 2. (a) Estructura química del Ketorolaco trometamina, (b) Aspecto físico del Ketorolaco trometamina

Condiciones de almacenamiento: Higroscópico, preservar en contenedores cerrados.

Fotosensible: proteger de la luz.

3.3.2 Características terapéuticas

Indicaciones terapéuticas: Analgésico no narcótico indicado en el tratamiento del dolor a corto plazo.

Se ha encontrado que el ketorolaco trometamina es 800 veces más potente que la aspirina en la actividad analgésica y en la actividad antiinflamatoria moderada.

Debe ser administrado con precaución a pacientes con disfunción hepática o renal; si se desarrollaran signos clínicos de enfermedad hepática, eosinofilia o rash cutáneo deberá suspenderse la administración de ketorolaco.

Contraindicaciones: No debe administrarse en pacientes que presentan asma, deshidratación, historia de úlcera péptica o de desordenes de la coagulación, o en pacientes en quienes el ácido acetil salicílico u otros inhibidores de la síntesis de prostaglandinas induzcan reacciones alérgicas.

Interacciones medicamentosas: No debe administrarse durante las 24 horas previas ni durante las 12 horas posteriores a la infusión de metotrexato, ya que pueden incrementarse los efectos tóxicos. La administración concomitante de anticoagulantes, incluyendo dosis bajas de heparina y warfarina pueden incrementar el riesgo de sangrado postoperatorio. La administración concomitante de ketorolaco y dextrán puede aumentar también el riesgo de sangrado postoperatorio. El ketorolaco causa una posible inhibición de la depuración renal de litio, provocando un aumento de este y la potencial toxicidad del mismo.

3.3.3. Farmacocinética y farmacodinamia^[24]

Por vía intramuscular, su efecto se inicia en 10 minutos y es máximo en 1 a 3 horas; por esta vía, es capaz de aliviar el dolor de moderado a leve. Se demostró en estudios clínicos que la eficacia en una sola dosis, es más grande que en la morfina, meperidina y pentazocina^[25]. Esta relacionado con la disminución tisular de prostaglandinas^[24]. Este



fármaco puede ser administrado de manera intravenosa, intramuscular y de manera oral (en forma de sal –ketorolaco trometamina)^[20].

Por vía oral se absorbe rápidamente y completamente, con una concentración plasmática máxima de 0.87 mcg/mL, que se presenta a los 44 minutos después de la dosis de 10mg. La vida media plasmática es de 5.3 horas, en los adultos jóvenes y de 6.1 horas en los sujetos de edad avanzada. El 99% se une a proteínas plasmáticas, se distribuye ampliamente en el organismo y alcanza concentraciones significativas en la leche materna. Se biotransforma parcialmente en el hígado (50%), donde se forman metabolitos inactivos, y se excreta en la orina (90%) y en menor proporción en la bilis. Carece de potencial de abuso o dependencia física y no se desarrolla síndrome de abstinencia tras la supresión súbita del medicamento.

Su vida media de eliminación es de aproximadamente 5 horas, la cual se prolonga en los ancianos (7 horas) y en casos de insuficiencia renal (10 horas). Se encuentra de venta en el mercado como la mezcla racémica de los enantiómeros (-) S y (+) R. Los estudios animales han demostrado que el enantiómero que posee actividad farmacológica es el (-) S y que el otro es farmacológicamente inactivo^[15].

3.3.4. Formas farmacéuticas^[24]

Acularen[®] Solución oftálmica indicada para el alivio del prurito hiperemia conjuntival, estados posquirúrgicos, inflamaciones crónicas no infecciosas como conjuntivitis, queratoconjuntivitis; utilizado como antiinflamatorio y analgésico.

Toloran[®] Solución inyectable para el tratamiento a corto plazo del dolor, administrado por vía intramuscular o intravenosa.

Alidol[®] Tabletas sublinguales indicadas para el tratamiento del dolor, leve, moderado e intenso, por ejemplo: migraña, dismenorrea, postraumático. (No se deberá exceder más de 2 días).

Dolikan[®] Tabletas. Antiinflamatorio no esteroideo indicado para el tratamiento a corto plazo del dolor.

Supradol[®] Tabletas, tabletas sublinguales, inyección, gel. Supradol gel[®] esta indicado para el tratamiento de dolores musculares, articulaciones y postraumáticos. Es eficaz en el tratamiento de tejidos blandos como esguinces, torceduras, bursitis, tendinitis, epicondilitis y osteoartritis de articulaciones superficiales (dedos, rodilla, tobillo).



3.3.5 Métodos analíticos reportados para su análisis

Tabla 4. Condiciones reportadas de separación de Ketorolaco trometamina

Referencia	Columna	Fase móvil	Flujo	Longitud de onda (nm)	mcg/mL	Muestra	L D	LC	Observaciones	Tr
[15]	Microsorb Silica 5cm. 150 mm x 4.6 mm	Acetato de etilo-hexano (40:60 v/v)	1	317	0.4, 1, 2, 5, 10 y 20	Plasma	*	0.02	Derivatización: hidroxibenzotriazol + N,N'-diclohexilcarbodiimida	5.5
[16]	Guard column packed with 35-50cm C ₁₈ Corasil, a Guard-Pack 10-mcm C ₁₈ pre-column insert, an RCM-100 radial compression module with a Radial-Pak 10-mcm C ₁₈ (10 cmx8mm) cartridge	Agua-acetonitrilo-1.0 M fosfato de dibutilamina (DBAP, pH 2.5) (30:20:1)	1.8	313	Plasma 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10	Plasma	*	0.0005	Coefficiente de variación de 20%	6.4 69
[17]	μ-Bondapack C ₁₈ 150x3.9 mm I. D.	Agua/acetonitrilo 70:30 v/v pH ajustado a 4.0 (con ác. Acético glacial)	1	320	No indica	Niosomas	*	*	Ninguna	*



Tabla 4. (continuación)										
[18]	Novapak C ₁₈ 150x3.9 mm Tamaño de particular 4mcm	Acetato de sodio 0.05M pH4/Acetonitri lo (75:25 v/v)	1.5	313	10 mcg/mL (80mL iny)	Plasma	*	*	pKa en solución 3.49 ± 0.02	4.5 2
[19]	Nova Pack C18 150x4.6mm Tamaño de partícula 4 mcm	Acetonitrilo/ac ido fosfórico 0.05% 34:66	1	317	*	Sangre	*	0.01	Volumen de inyección 20 mcL	5.5
[19]	Newguard RP- 18 100x8 mm Radial pak. Tamaño de partícula 4mcm	Gradiente metanol/ácido acético 0.1% 30:70 a 60:40 en 10 minutos, mantener así 2 minutos y 100:0 en 3 min.	2	258	*	Sangre	*	0.005	Gradiente de elución	6.7
[19]	Partisil 5 ODS-2 100x4.6mm Tamaño de particular 5mcm	Acetonitrilo/6 0mM KH ₂ PO ₄ /trietil amina 30:70:0.02	1	310	*	Sangre	*	*	Volumen de inyección 10-100 mcL	11 (R), 19 (S)

LC: Límite de cuantificación (mcg/mL). **LD:** Límite de detección (mcg/mL). **Flujo** esta en mL/min. **Tr:** Tiempo de retención (minutos) * : No se reporta

3.4 Clonixinato de lisina ^[23]

3.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Peso molecular (Clonixinato): 262.69; (lisina) 146.187

Fórmula condensada

$C_{13}H_{11}ClN_2O_2$; $C_6H_{14}N_2O_2$

Log P (clonixinato) 5.09 ± 0.59 ^[31]

pKa 5.625 ± 0.3105 ^[32]

p.f. 205-210 °C ^[23]

Descripción: Polvo fino, seco color blanco-crema, muy irritante.

Solubilidad: ligeramente soluble en metanol y etanol, soluble en agua y soluciones alcalinas diluidas. Insoluble en acetona, tolueno y cloroformo.

Perdida al secado: 0.1%

Ensayo: 99.6%

Almacenamiento: preservar en contenedores cerrados. Almacenar a temperaturas no excedentes a 15°C (puede utilizarse refrigeración).

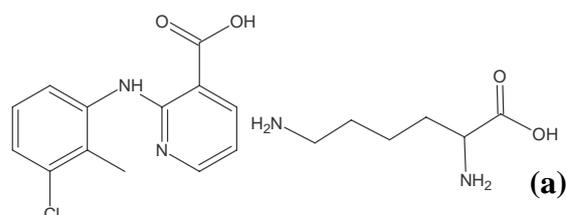


Fig. 3 (a) Estructura del Clonixinato de lisina, **(b)** aspecto físico de Clonixinato de lisina

3.4.2. Indicaciones terapéuticas

Esta indicado como analgésico en pacientes que presentan dolor agudo o crónico. Es un analgésico no narcótico destinado al tratamiento de procesos dolorosos de distinta intensidad y origen; no provoca depresión del sistema nervioso central (SNC). Se destaca ante el grupo de antiinflamatorios por su elevada potencia analgésica demostrada en modelos experimentales y a través de su empleo clínico destinado al tratamiento de dolor somático y visceral.

3.4.3. Farmacocinética y farmacodinamia

El Clonixinato de lisina es un derivado del ácido antranílico que inhibe la enzima prostaglandina sintetiza a nivel cromosomal, responsable de la síntesis de prostaglandinas; al inhibir esta enzima no se sintetizan la PGE y la PGE II ni la PGEF II y esto conlleva a la disminución de la bradicidina. De esta manera, de forma indirecta, se impide la sensibilización de los receptores dolorosos periféricos y se consigue la eliminación del dolor.

Las concentraciones séricas por vía oral o intravenosa, son similares a partir de los 75 minutos; a los 240 minutos disminuyen hasta desaparecer a los 360 minutos, lo que muestra el bajo poder acumulativo de este fármaco a nivel sérico. No se deposita en la mucosa gástrica, por ello tiene un mínimo índice ulcerogénico. Se distribuye ampliamente en todos los tejidos. Es biotransformado parcialmente a nivel hepático y se elimina por vía urinaria.

Contraindicaciones: Es conveniente abstenerse de su empleo en caso de úlcera péptica activa o hemorragia gastroduodenal. Administrarlo con precaución en pacientes con antecedentes digestivos. No se administre a menores de 10 años.

Reacciones secundarias: Puede presentarse náusea, mareo y somnolencia, de carácter leve y transitorio.



3.4.4. Formas farmacéuticas^[24]

Prestodol® Comprimidos. Indicado como analgésico y antiinflamatorio en pacientes que cursan con dolor agudo o crónico; no provoca depresión del SNC.

Firac® Tabletas e inyectable. Esta indicado como analgésico en pacientes que cursan por dolor agudo o crónico. Particularmente el dolor posquirúrgico, es útil por su efecto analgésico y porque no modifica el sistema de coagulación.



3.4.5. Métodos analíticos reportados para su análisis

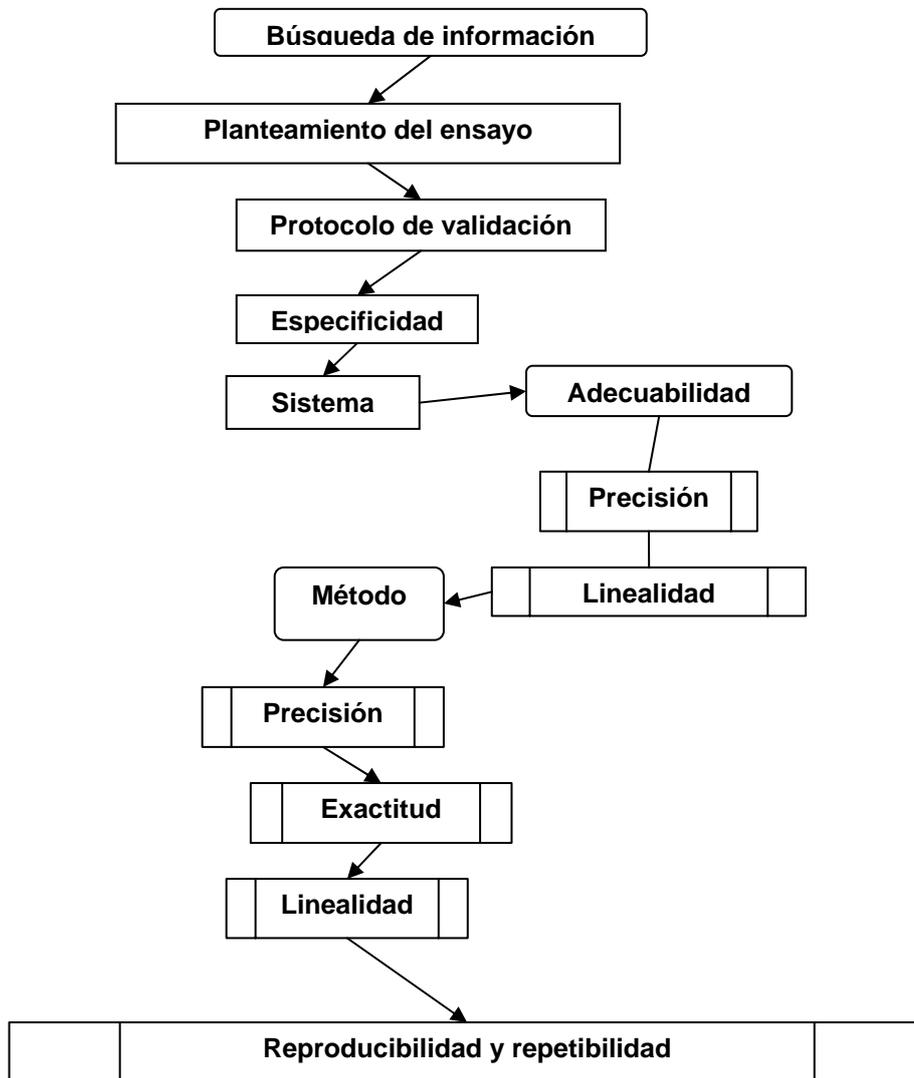
Tabla 5. Condiciones reportadas de separación de Clonixinato de lisina

Ref.	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Longitud de onda (nm)	mcg/mL	LD	LC	Observación	Muestra	Tiempo de retención (min)
[20]	Nucleosil-100, 5mcm C ₁₈ , guardacolumna C ₁₈ 5mcm	Acetonitrilo: metanol y acético (28:36:36%)	1	290	0.01, 0.02, 0.4 (plasma) 0.02, 0.4 y 2 (orina)	*	0.1 (plasma) 0.2 (orina)	Estándar interno <i>p</i> -clorowarfarina	Plasma y orina	Plasma 7.09 Orina 9.83
[21]	Spherisorb C ₁₈ 200x4.6 mm ² i. d.	Acetonitrilo búfer de fosfatos pH 3.3 (70:30%)	1.8	252	5, 10,20, 30, 40 y 60	0.18	0.215*	Solubilidad 409.78 + 3.41 mg g ⁻¹	Emulsiones agua/aceite	6.31
[22]	Cartucho radialpak μ -Bondapak C ₁₈ 10cm x 8 mm d.i.	Metanol/0.02 M K ₂ HPO ₄ pH 6 (60:40 %)	2	254	50 (10mL volumen iny.)	*	*	Ninguna	Cápsulas 125mg/capsula Inyectable 100mg/2mL Tabletas 125mg/tableta	3.01
[26]	Stainless steel C ₁₈ ODS 250x4 mm. 5mcm tamaño partícula	Metanol/Búfer fosfatos 0.02 M, pH = 6.5, 70:30 (v/v)	0.8	280	*	*	*	Rango 6.25 – 100 mcg/mL	Plasma humano	*

LC: Límite de cuantificación (mcg/mL). LD: Límite de detección (mcg/mL). Flujo esta en mL/min. Tr: Tiempo de retención (minutos). *: No se reporta



4. Diagrama de actividades a realizar



5. Procedimiento experimental

5.1 Materiales y reactivos

- **Sustancias de referencia**

Clonixinato de lisina

Ketorolaco trometamina

- **Reactivos**

Acetonitrilo HPLC Marca Mallinckrodt®

Metanol HPLC Marca Mallinckrodt®

Agua HPLC Milli-Q Waters® systems

Ácido acético glacial marca J. T. Baker®.

Fosfato monobásico de sodio marca J. T. Baker®

Fosfato dibásico de sodio marca J. T. Baker®

- **Equipo e instrumentación**

Agitador con propela Caframo Modelo RZR1, Equipar®

Agitador con propela IKA Labortechnik® Modelo RW16 básico

Balanza analítica Mettler Toledo®

Potenciómetro Mettler Toledo®

Cromatógrafo de líquidos:

- Bomba Waters® 717
- Detector de arreglo de diodos® 996
- Controlador Waters® 600
- Software Empower®



5.2 Ensayo

Preparación del estándar

1. Revisar que el material de trabajo se encuentre perfectamente limpio y seco; etiquetar un matraz volumétrico de 250 mL como "A", un matraz volumétrico de 25mL como "B" y un matraz volumétrico de 200 mL como "C".
2. Pesar en un pesa muestras lo mas exacto posible 20 mg de Ketorolaco trometamina SR y transferirlos al matraz volumétrico etiquetado como "A" enjuagando el pesa muestras con aproximadamente 10 mL de agua desionizada.
3. Agregar aproximadamente 150 mL de agua desionizada al matraz volumétrico anterior etiquetado como "A", agitar manualmente hasta homogenizar, llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. [Ketorolaco trometamina 0.08 mg/mL]
4. Pesar en un pesa muestras lo más exacto posible 50 mg de Clonixinato de lisina SR y verter al matraz volumétrico etiquetado como "B" enjuagando el pesa muestras con aproximadamente 10 mL de agua desionizada.
5. Agregar aproximadamente 10mL de agua desionizada al matraz volumétrico anterior etiquetado como "B", agitar manualmente hasta homogenizar, llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. [Clonixinato 2 mg/mL]
6. Tomar con pipeta volumétrica 2 mL del matraz etiquetado como "A" y 2 mL del matraz etiquetado como "B", transferirlos al matraz volumétrico etiquetado como "C", agregar aproximadamente 150 mL de agua desionizada al matraz volumétrico anterior, agitar manualmente hasta homogenizar y llevarlo al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. [Ketorolaco trometamina 0.8 μ /mL, Clonixinato de lisina 20 μ /mL]
7. Tomar con una jeringa limpia 5 mL del matraz etiquetado como "C" y filtrarlos con filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro.
8. Desechar las primeras diez gotas de la solución filtrada y coleccionar el resto en un frasco vial.



Preparación de la muestra

1. Tomar con pipeta volumétrica 3 mL de la solución inyectable equivalente a 5mg de Ketorolaco trometamina y 125 mg de Clonixinato de Lisina y transferirlos a un matraz volumétrico de 250 mL.
2. Adicionar 150 mL de agua desionizada y agitar hasta homogenizar, llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. (Solución A)
3. Tomar con pipeta volumétrica 2 mL de la solución A y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL.
4. Adicionar aproximadamente 40 mL de agua desionizada y agitar hasta homogenizar, llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada.
5. Tomar con una jeringa limpia 5 mL y filtrarlos con filtro de 0.45 mcm de tamaño de poro.
6. Desechar las primeras tres gotas de la solución filtrada y coleccionar el resto en un frasco vial

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos (ver anexo 1 de preparación de soluciones)

Calcular la concentración de Clonixinato de lisina mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Area.muestraCL}}{\text{Area.STD_CL}} * [\text{STD_CL}] * \frac{50\text{mL}}{2\text{mL}} * \frac{250\text{mL}}{3\text{mL}} * \frac{1\text{mg}}{1000\text{mcg}} = [\text{CL_INY}]$$

En donde

Area.muestraCL = Área obtenida en la muestra de Clonixinato de lisina

Area.STD_CL = Área obtenida de la sustancia de referencia de Clonixinato de lisina

[STD_CL] = Concentración de Clonixinato de lisina estándar en la SOL. B. en μmL

[CL_INY] = mg/mL de Clonixinato de lisina por cada ampolla.



Calcular la concentración de Ketorolaco trometamina mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Area.muestraKT}}{\text{Area.STD_KT}} * [\text{STD_KT}] * \frac{50\text{mL}}{2\text{mL}} * \frac{250\text{mL}}{3\text{mL}} * \frac{1\text{mg}}{1000\text{mcg}} = [\text{KT_INY}]$$

En donde

Área.muestraKT = Área obtenida en la muestra de Ketorolaco trometamina

Área.STD_KT = Área obtenida de la sustancia de referencia de Ketorolaco trometamina

[STD_KT] = Concentración de Ketorolaco trometamina estándar en la SOL. B. en $\mu\text{g/mL}$

[KT_INY] = mg/mL de Clonixinato de lisina por cada ampolleta.

5.2.1 Condiciones cromatográficas

Columna	XBridge [®] C ₁₈ 5 μm , 4.6 x 150 mm.
Volumen de inyección	40 μL .
Fase móvil	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH 7 0.0128 M (60:40)
Flujo	0.9 mL/min.
Detección	322.7 nm (KT), 350 nm (CL)



6. Resultados y análisis

6.1 Selección de las condiciones óptimas de trabajo

Para obtener la longitud de onda se establecieron las longitudes de onda de máxima absorción de cada analito, tal y como se observa en la siguiente figura (figura 4):

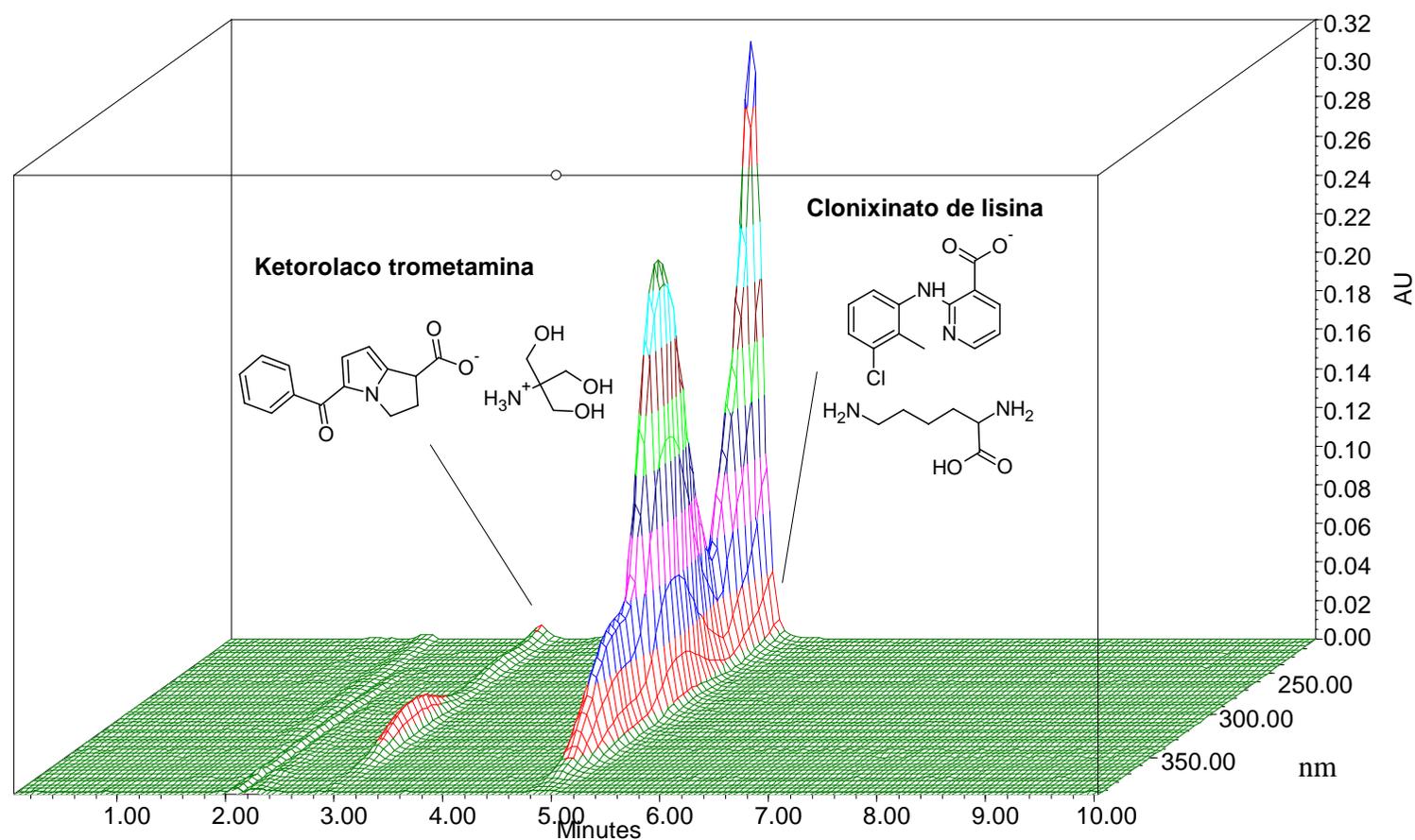


Figura 4. Topograma de una solución estándar de Clonixinato de lisina 20 $\mu\text{g/mL}$ y Ketorolaco trometamina 0.8 $\mu\text{g/mL}$. Eje de las X Tiempo de corrida cromatográfica; eje de las Y: Unidades de absorbancia obtenida ($\text{mV}\cdot\text{sec}$); eje de las Z: longitud de onda (nm).

Condiciones cromatográficas: ver procedimiento de ensayo, sección 4.3.1



En la figura 4 se observa el comportamiento de absorción de las moléculas con respecto al tiempo y a las diferentes longitudes de onda. Esta es una ventaja del detector de diodos ya que permite medir todo el espectro de absorción de la sustancia inyectada en tiempo real y elegir la mejor longitud de onda de trabajo. En este caso es 322.7 nm para Ketorolaco trometamina ya que es la longitud de onda de máxima absorción y 350nm para Clonixinato de lisina que es una longitud de onda que no corresponde a su máximo de absorción, sin embargo es suficiente para obtener una señal óptima. Estas longitudes de onda se seleccionaron considerando la proporción en que se encuentran un fármaco con respecto al otro (Ketorolaco trometamina en proporción 25 veces menor con respecto al Clonixinato de lisina).

En la figura anterior se puede ver que sus tiempos de retención son muy cortos, esto se debe a que los analitos se encuentran en su forma ionizada (ver fig. 5) y como la cromatografía que se está empleando es la de fase reversa (una fase móvil polar) los analitos se retienen muy poco.

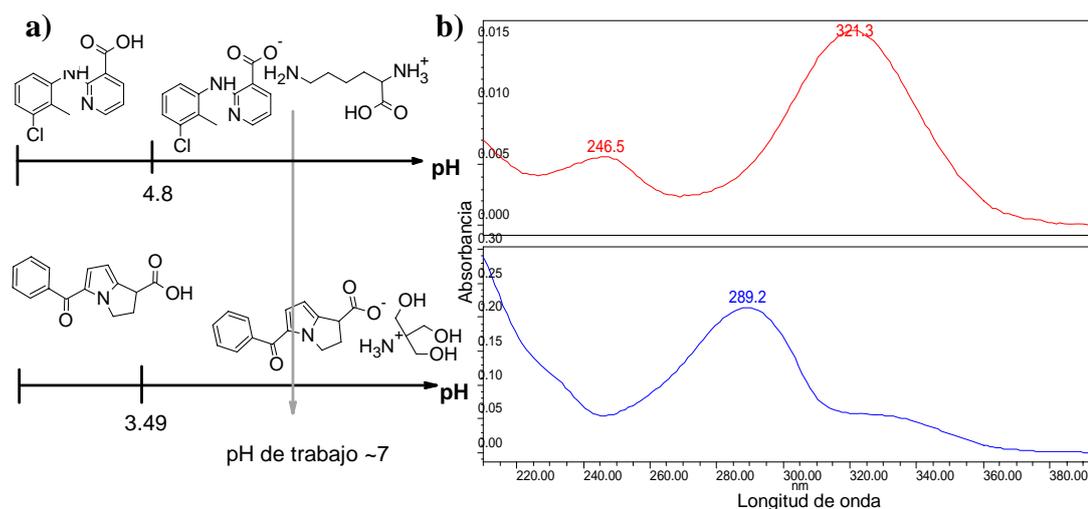


Fig. 5 a) Diagrama de especies presentes de los analitos en función del pH; debido a que la fase móvil de trabajo tiene un pH cercano a 7 la especie que se encuentra presente es la ionizada (parte superior: Clonixinato de lisina, parte inferior: Ketorolaco trometamina), **b)** espectro de absorción obtenido de acuerdo a las condiciones del ensayo (ver sección 4.3.1)

Otro aspecto que se tiene que considerar es el valor de su constante de partición, el cual es menor para el caso de ketorolaco trometamina, lo que indica que su interacción por la fase móvil es mayor que por la fase estacionaria y provoca un tiempo de retención menor; otro factor importante es el grado de ionización ya que entre más se encuentre la molécula alejada del valor de pKa, mayor será el grado de ionización obtenido, que

nuevamente indica que el ketorolaco trometamina es el que presenta un tiempo de retención mas corto.

6.2 Validación

6.2.1 Especificidad

Para demostrar la especificidad del método se inyectó una solución placebo, una solución estándar y un placebo adicionado con los analitos de interés (Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina) en una concentración equivalente al 100% de la muestra analítica (Clonixinato de lisina 20 µg/mL, Ketorolaco trometamina 0.8 µg/mL); Los resultados obtenidos son los siguientes:

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Plac Adic CL / Ket, Plac CL / Ket,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	6/16/2008 8:48:21 PM, 6/16/2008
Vial:	32, 33, 34	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1	Date Processed:	6/17/2008 10:47:37 AM, 6/23/2008
Injection Volume:	40.00 ul	Processing Method:	CL_K 130508
Run Time:	10.0 Minutes	Channel Name:	Wwin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo16Jun08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Timed Wavelength (0.00,

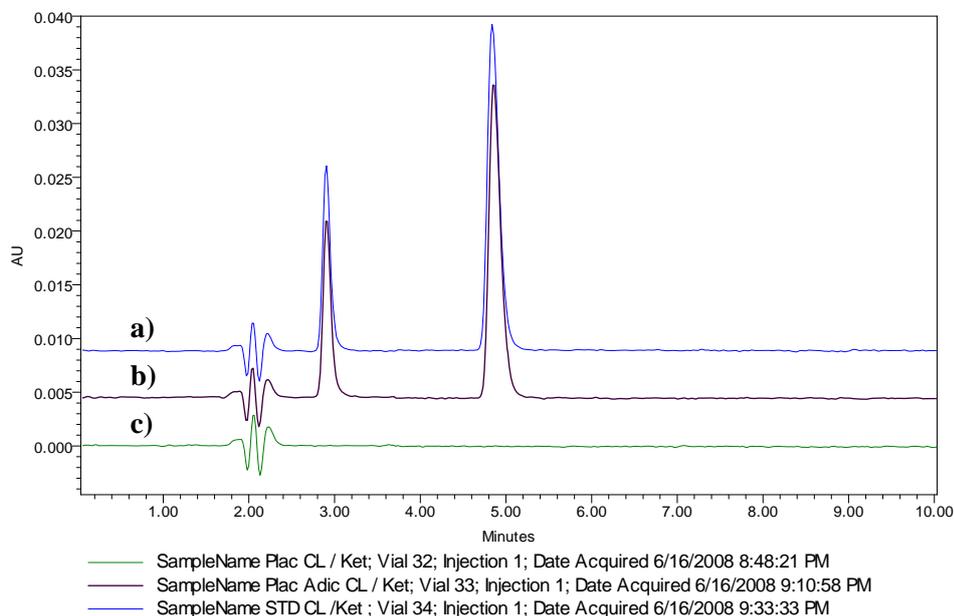


Fig. 6 Cromatogramas obtenidos para evaluar la prueba de especificidad del método, abreviaturas **Plac CL / Ket**: (c) Solución placebo; **STD CL / Ket**: (b) solución estándar de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina; **Plac Adic CL / Ket**: (a) solución placebo adicionado Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina.



Como se puede observar en el cromatograma no hay señal de sustancias que se encuentren presentes al mismo tiempo de retención que los analitos y se demuestra que ningún excipiente es detectado a estas longitudes de onda; para tener un análisis más detallado de que no hay interferencia de otros componentes en la respuesta analítica es necesario evaluar el ángulo de pureza (medición de la homogeneidad espectral mediante la comparación del espectro a cada longitud de onda, dando valores de 0 – 90°; a valores menores indican mayor homogeneidad) y el umbral de pureza (ángulo de pureza atribuido a la coelución, ruido de la línea base, error fotométrico –altas concentraciones de muestra- o la contribución al ruido provocada por el mismo solvente). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Fármaco	Muestra	Angulo de pureza	Umbral de pureza
CL	Plac CL / Ket	-----	-----
CL	Plac Adic CL / Ket	0.071	0.266
CL	STD CL /Ket	0.069	0.264
KT	Plac CL / Ket	-----	-----
KT	Plac Adic CL / Ket	48.645	0.935
KT	STD CL /Ket	0.846	0.959

Criterio de aceptación

Ángulo de pureza < Umbral de pureza: El pico se encuentra puro

Al realizar el estudio de pureza u homogeneidad de ambos picos de los cromatogramas de la figura anterior se determinó que el ángulo de pureza es menor al umbral de pureza para los picos cromatográficos, lo que indica que se encuentran puros, a excepción del cromatograma del placebo adicionado de Ketorolaco trometamina, el cuál presenta un ángulo de pureza alto debido a que este ángulo se encuentra en función del ángulo de ruido y a señales pequeñas de analito el ruido ejerce una mayor influencia, sin embargo no es tan cercana a los 90° (valor que indica impureza máxima) y con el cromatograma obtenido se demuestra que el método es específico para determinar los analitos de interés.



6.2.2 Adecuabilidad del sistema

Se evaluó inyectando por sextuplicado una solución estándar de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina con una concentración de 20 y 0.8 mcg/mL, respectivamente (ver sección 4.3 Ensayo, *Preparación del estándar*), esta prueba se realizó en cada ocasión que se comenzaba a trabajar en el cromatógrafo de líquidos, con la finalidad de asegurar que el sistema cromatográfico se encontraba en las condiciones adecuadas de trabajo y así evitar obtener resultados poco confiables. Como valores óptimos se considera que la adecuabilidad del sistema debe tener una variación en área menor al 1% y se demuestra que los resultados son menores (ver anexo 2. Resultados).

6.2.3 Precisión del sistema

Para evaluar la precisión del sistema se analizó la concentración de una solución estándar equivalente al 50, 100 y 150% de la muestra analítica y cada nivel se realizó por sextuplicado (Ver anexo 1. Preparación de soluciones), los resultados se muestran a continuación:

Porcentaje	Clonixinato de lisina			Ketorolaco trometamina		
	Concentración (mcg/mL)	Área (mcV*sec)	Área / conc.	Concentración (mcg/mL)	Área (mcV*sec)	Área / conc.
50%	10	143209	14320.9000	0.4	54176	135440
		144596	14459.6000		55908	139770
		144336	14433.6		54671	136677.5
		144680	14468.		55560	138900
		143744	14374.4		55787	139467.5
		147106	14710.6		55919	139797.5
100%	20	297440	14872.	0.8	112574	140717.5
		291869	14593.45		113894	142367.5
		291771	14588.55		115288	144110
		293606	14680.3		112694	140867.5
		292538	14626.9		113169	141461.25
		295964	14798.2		113790	142237.5



150%	30	437269	14575.6333	1.2	170770	142308.3333
		446672	14889.0667		171572	142976.6667
		436690	14556.3333		169209	141007.5
		445829	14860.9667		170038	141698.3333
		440806	14693.5333		171139	142615.8333
		439902	14663.4		170095	141745.8333
Promedio		14620.3019	Promedio		140787.0139	
S		169.0763	S		2184.9225	
CV		1.1564	CV		1.5519	

El sistema presentó un buen comportamiento en cuanto a la precisión del sistema ya que el coeficiente de variación obtenido para los dos analitos se encuentra dentro de los criterios de aceptación reportados en las guías de validación (<2%)^[3,4,5]; la variación más alta obtenida fue de Ketorolaco trometamina y esto se debe a que se encuentra en una menor cantidad con respecto al Clonixinato de lisina y que a esas bajas concentraciones la señal analítica se ve ligeramente influenciada por el ruido espectrofotométrico.

6.2.4 Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó una solución estándar, a partir de la cuál se prepararon cinco niveles de concentración, cada uno por triplicado; los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Nivel	Conc_KT [mcg/mL]	Área (mcV*sec)	Área/ Conc	Conc_CL [mcg/mL]	Área (mcV*sec)	Área/ Conc
1	0.4064	54435	133944.39	10.0	141698	14169.8
1	0.4064	57699	141975.886	10.0	143484	14348.4
1	0.4064	55919	137595.965	10.0	147106	14710.6
2	0.6096	84949	139352.034	15.0	218820	14588
2	0.6096	84369	138400.591	15.0	220781	14718.7333
2	0.6096	84534	138671.26	15.0	217031	14468.7333
3	0.8128	113169	139233.514	20.0	292538	14626.9
3	0.8128	113790	139997.539	20.0	295964	14798.2
3	0.8128	113714	139904.035	20.0	295488	14774.4
4	1.016	141548	139318.898	25.0	364920	14596.8
4	1.016	142512	140267.717	25.0	368478	14739.12



4	1.016	142014	139777.559	25.0	369099	14763.96
5	1.2192	170095	139513.615	30.0	439902	14663.4
5	1.2192	170406	139768.701	30.0	441757	14725.2333
5	1.2192	171572	140725.066	30.0	446672	14889.0667
Prom			139229.785	Prom		14638.7564
S			1776.765	S		186.984
CV			1.2761	CV		1.2773

Fármaco	CL	KT
Coefficiente de correlación múltiple	0.9998	0.9998
Coefficiente de determinación R ²	0.9996	0.9997
R ² ajustado	0.9996	0.9997
Observaciones	15	15

De acuerdo a los datos de regresión obtenidos de las ecuaciones de regresión observamos que el 99% de la variación de la señal analítica está explicada por los cambios de concentración de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina. Por otra parte se tiene establecido como criterio de aceptación de que el valor de coeficiente de variación concentración / área debe ser menor al 2%⁽³⁾ y los valores obtenidos son aceptables ya que se encuentran en 1.3%.

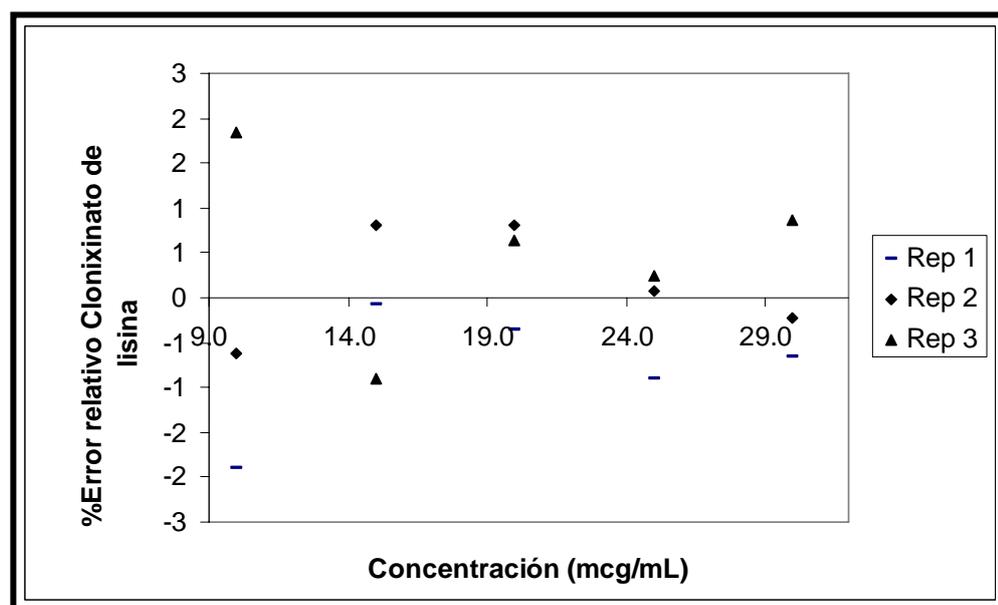


Fig. 7 Gráfico de error relativo de Clonixinato de lisina. Abreviaturas: **Rep**: Repetición



Con el valor de porcentaje de error relativo (Ver anexo 2. Fórmula 1) es posible demostrar si existe una tendencia en los datos; una situación ideal implica que no exista tendencia alguna entre los datos, en este caso se puede observar que no existe una tendencia y que en el valor de concentración más bajo de Clonixinato de lisina es en donde el error asociado al pipeteo es más notable, ya que es donde se toma una alícuota de menor volumen.

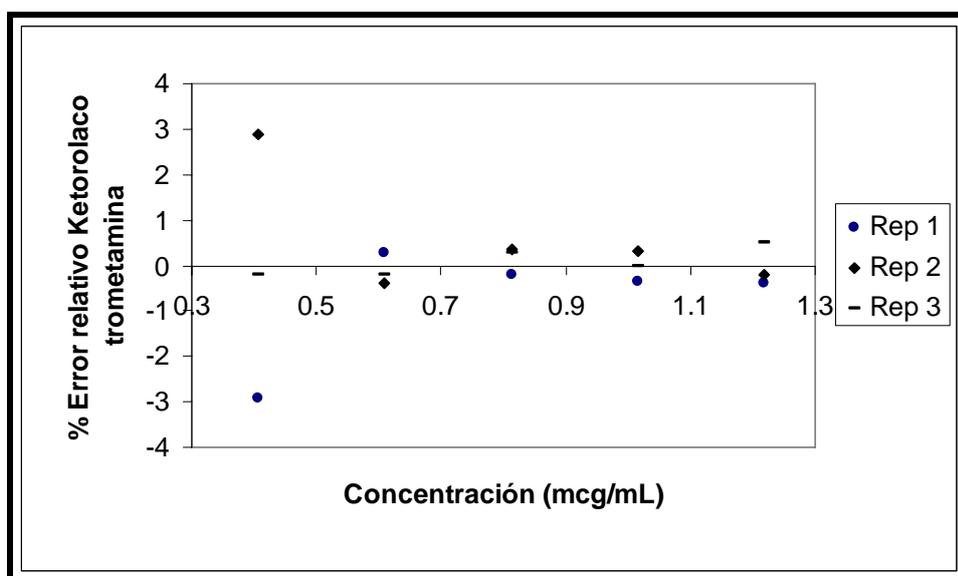


Fig. 8 Gráfico de error relativo de Ketorolaco trometamina. Abreviaturas: **Rep:** Repetición

En este gráfico de error relativo de Ketorolaco trometamina (Fig. 8) se demuestra que el error asociado al pipeteo para preparar el primer nivel de concentración es muy alto y que se encuentra muy cercano a los valores límite de error considerados como óptimos (error no mayor al $\pm 3\%$), sin embargo en los otros puntos se muestra que no existe mucho error en la preparación de estos sistemas (porcentajes de error muy cercanos a cero), además de que no existe una tendencia en los datos obtenidos.

Para demostrar que existe una relación entre la concentración de cada uno de los analitos con el valor de área obtenido se realizó la prueba de análisis de variancia, y se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y el valor de área obtenido.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y el valor de área obtenido.



*Criterios de aceptación:*Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H_0 Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H_0

Tabla 10. Análisis de varianza de la regresión para la linealidad del sistema(nivel de significancia seleccionado para la prueba $\alpha=0.05$)					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{cal}	Valor crítico de F
<i>Clonixinato de lisina</i>					
Regresión	1	1.6695E+11	1.6695E+11	31480.1686	2E-23
Residuos	13	68942367.7	5303259.05		
Total	14	1.6702E+11			
<i>Ketorolaco trometamina</i>					
Regresión	1	2.4668E+10	2.4668E+10	42461.5122	3E-24
Residuos	13	7552454.53	580958.041		
Total	14	2.4676E+10			

De acuerdo a los valores obtenidos se rechaza H_0 en ambos casos, debido a que el valor de F_{cal} es mayor al valor $F_{crítico}$ (obtenido mediante la herramienta de análisis de regresión del software Excel®), por lo tanto se puede decir que para ambos analitos existe una relación lineal entre la concentración y el valor de área obtenido, esto con un nivel de significancia del 0.05.

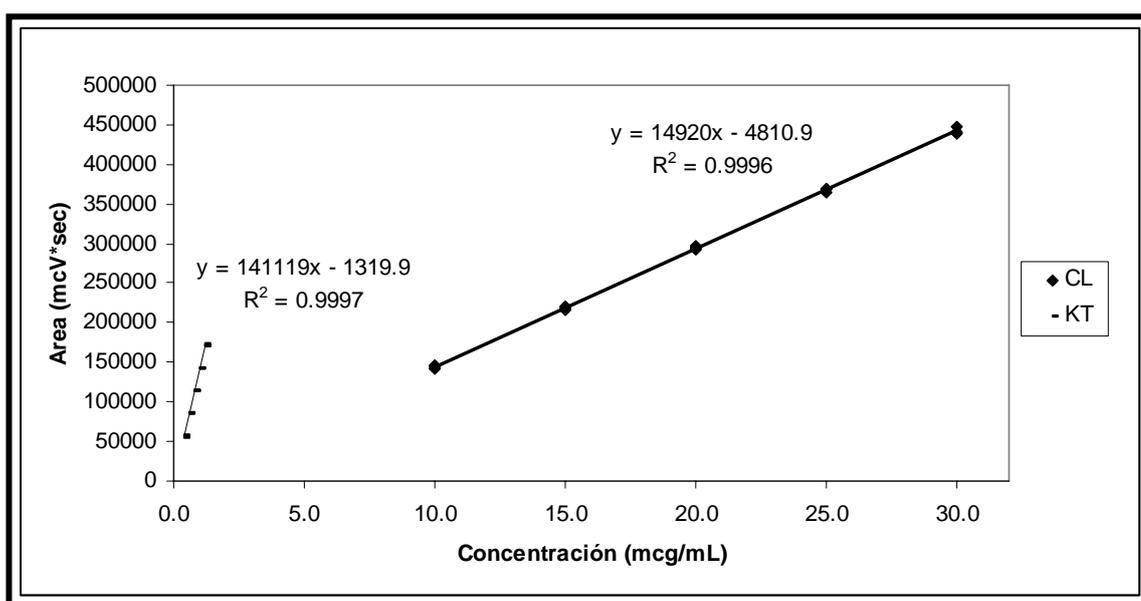


Fig. 9 Curva de regresión global de Ketorolaco trometamina (Izquierda) y Clonixinato de lisina (Derecha)

En este gráfico de regresión (Fig. 9) se demuestra el comportamiento lineal de ambos analitos y las diferencias en área obtenidas debidas a la concentración empleada de cada uno de estos en la formulación, ya que el Clonixinato de lisina se encuentra en una proporción 25 veces mayor en comparación con respecto al Ketorolaco trometamina (20 y 0.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Los valores obtenidos del modelo de regresión para los dos fármacos fue la siguiente:

Tabla 11. Valores obtenidos de la ecuación de regresión		
Parámetros estadísticas de la regresión		
Fármaco	CL	KT
r	0.9998	0.9998
r^2	0.9996	0.9997
b_0	-4810.9333	-1319.9333
b_1	14919.6733	141119.094
IC (b_1)	14738 - 15101	139639 - 142598
Observaciones	15	15

Los coeficientes de correlación obtenidos (r), explican que existe un 99% de relación entre los datos de cada nivel para ambos fármacos y el coeficiente de regresión del modelo (r^2) demuestran que el modelo lineal empleado ($y=b_1x+b_0$) explica que el cambio en el valor de área es provocado por el cambio en el valor de concentración, esto con un nivel de confianza del 99.9%.

6.2.5 Precisión y exactitud del método

Para evaluar la precisión del método se prepararon tres placebos adicionados con las cantidades equivalentes al 80,100 y 120% de la muestra analítica de Clonixinato de lisina (16, 20 y 24 $\mu\text{g/mL}$) y 120, 100 y 80% de Ketorolaco trometamina (0.96, 0.8 y 0.64 $\mu\text{g/mL}$), esto con el fin de asegurar que no existe colinealidad, es decir, que los cambios en el valor de área obtenido no sean provocados por la influencia del otro analito; a cada uno de los placebos adicionados se les realizó por sextuplicado el procedimiento de ensayo (la forma de calcular el valor de porcentaje de recobro se encuentra en el anexo 2. Fórmula 2). Los resultados obtenidos fueron los siguientes (ver tabla 12):



Tabla 12. Valores obtenidos de precisión del método				
Nivel	% CL	% Recobro	% KT	% Recobro
1	80	99.0777	120	99.1745
	80	99.4695	120	98.8188
	80	100.0865	120	99.5621
	80	100.7811	120	100.5723
	80	100.8285	120	99.1487
	80	97.5152	120	98.9997
	Promedio	99.6264	Promedio	99.3793
	S	1.2469	S	0.6341
	CV	1.2515	CV	0.6380
2	100	98.8519	100	99.6046
	100	101.1717	100	99.9311
	100	99.3138	100	99.7486
	100	99.7393	100	98.4912
	100	98.7554	100	100.0880
	100	99.4436	100	100.1136
	Promedio	99.5460	Promedio	99.6628
	S	0.8777	S	0.6065
	CV	0.8817	CV	0.6086
3	120	99.9028	80	99.2011
	120	99.8158	80	100.3744
	120	100.6586	80	99.9990
	120	100.5302	80	99.7906
	120	99.6377	80	100.7175
	120	99.3086	80	98.3801
	Promedio	99.9756	Promedio	99.7438
	S	0.5223	S	0.8447
	CV	0.5224	CV	0.8468
GLOBAL	Promedio	99.7160	Promedio	99.5953
	S	0.8949	S	0.6798
	CV	0.8975	CV	0.6826

Los resultados obtenidos demuestran que el método es preciso, debido a que los valores obtenidos tienen una variación menor al 2% que se encuentra establecida como criterio de aceptación para métodos cromatográficos^(3,5).



Al determinar los coeficientes de variación globales se observa que el Clonixinato de lisina es el que presenta una variación un poco más alta. Los valores de desviación estándar están directamente relacionados con los intervalos de confianza obtenidos (ver anexo 2. Fórmula 3).

Los resultados obtenidos de IC posteriormente se sumaron y restaron al valor promedio de porcentaje de recobro obtenido (ver tabla 13).

Para evaluar la exactitud del método se realizó la prueba de t asumiendo varianzas desconocidas o desiguales (ver anexo 2. Fórmula 4 para el cálculo del valor de t_{calc} –calculada-)

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Ho: El promedio del % adicionado es igual al promedio del % recuperado

Ha: El promedio del % adicionado es diferente al promedio del % recuperado

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza H_0

Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza H_0

Tabla 13. Valores de límites de confianza obtenidos a partir del valor promedio de porcentaje de recobro y valores de t_{calc} y $t_{crítica}$ obtenidos.

Fármaco	Nivel	LSC	LIC	Promedio	IC	t calc	t crítica
CL	1	100.9349	98.3179	99.6264	1.3085	-0.7339	2.5706
	2	100.4670	98.6249	99.5460	0.9211	-1.2672	
	3	100.5237	99.4275	99.9756	0.5481	-0.1143	
KT	1	100.0447	98.7139	99.3793	0.6654	-2.3977	
	2	100.2994	99.0263	99.6628	0.6365	-1.3616	
	3	100.6302	98.8573	99.7438	0.8864	-0.7431	

$t_{crítica} = \text{alfa } 5\%, 6-1 \text{ grados de libertad}$

El método es exacto ya que los límites de confianza del porcentaje de recobro se incluyen en el intervalo 98-102% que se encuentra reportado como aceptable⁽³⁾ y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor al 2%, de manera gráfica se demuestra que el porcentaje de recobro en Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina sí incluye al 100% en su intervalo (ver Fig. 10).



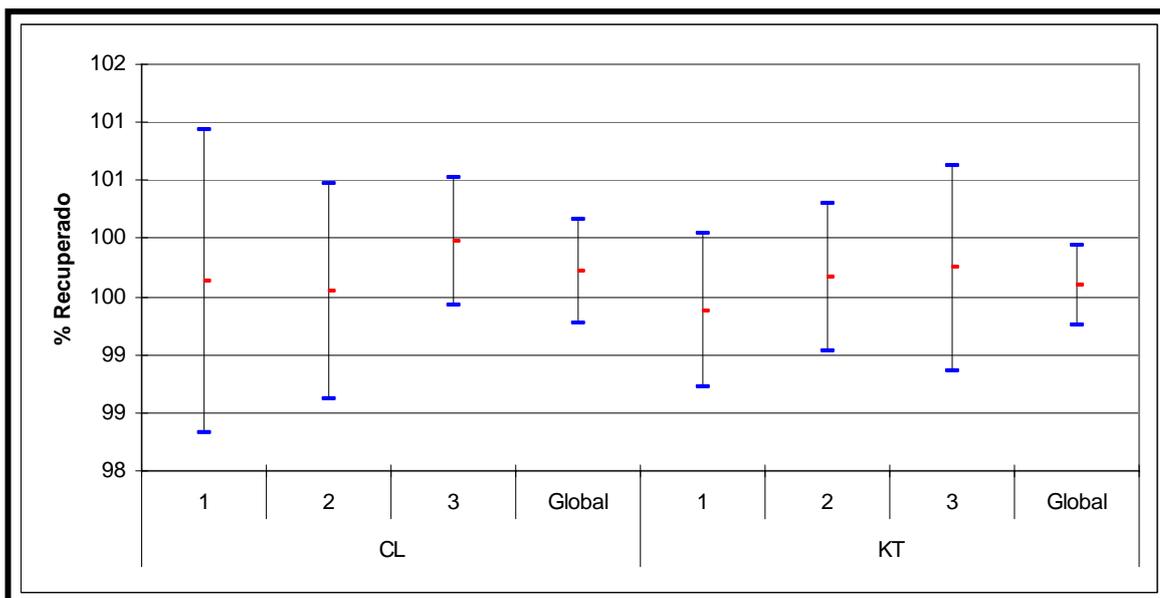


Fig. 10 Gráfico de porcentaje recuperado promedio +/- IC de los dos analitos en función del día de trabajo y de manera global

6.2.6 Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se prepararon 5 placebos adicionados (Ver anexo 2. Preparación de placebos adicionados), con las siguientes proporciones 80, 90, 100, 110 y 120% de la cantidad presente en la muestra analítica y a cada uno se realizó a cada nivel tres veces el procedimiento de ensayo. En la siguiente tabla se presentan los datos obtenidos de concentración adicionada (concentración teórica) con respecto el área obtenida:

Tabla 14. Valores de área obtenidos para evaluar linealidad del método			
Clonixinato de lisina		Ketorolaco trometamina	
Concentración adicionada (µg/mL)	Área (µV*sec)	Concentración adicionada (µg/mL)	Área (µV*sec)
15.9974	233961	0.63744	87730
	231675		88971
	234972		87459
17.9971	265845	0.71712	100610
	257426		98385
	257798		98924
19.9968	289565	0.7968	109008
	288185		109969
	283009		110262

21.9965	305825	0.87648	118072
	300504		117767
	315040		121180
23.9962	345808	0.95616	130058
	340792		127449
	344917		130638

Con estos datos se obtuvo la ecuación de la recta, graficando concentración adicionada con respecto al área obtenida; los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Fármaco	Pendiente	Ordenada al origen
CL	13471	17675
KT	128460	6742.1

A partir de estas ecuaciones de regresión obtenidas se determinaron los valores de concentración recuperada de cada analito (ver anexo 2.Fórmula 5):

Clonixinato de lisina		Ketorolaco trometamina	
Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)
15.9974	16.0557	0.63744	0.6305
	15.8860		0.6401
	16.1307		0.6283
17.9971	18.4225	0.71712	0.7307
	17.7976		0.7134
	17.8252		0.7176
19.9968	20.1834	0.7968	0.7961
	20.0809		0.8036
	19.6967		0.8059
21.9965	21.3904	0.87648	0.8667
	20.9954		0.8643
	22.0745		0.8908



Tabla 16 (Continuación)			
23.9962	24.3585	0.95616	0.9600
	23.9861		0.9396
	24.2923		0.9645

A partir de estos datos se obtuvieron los coeficientes del modelo de regresión, los cuales se presentan en los siguientes gráficos (Fig. 11 y 12):

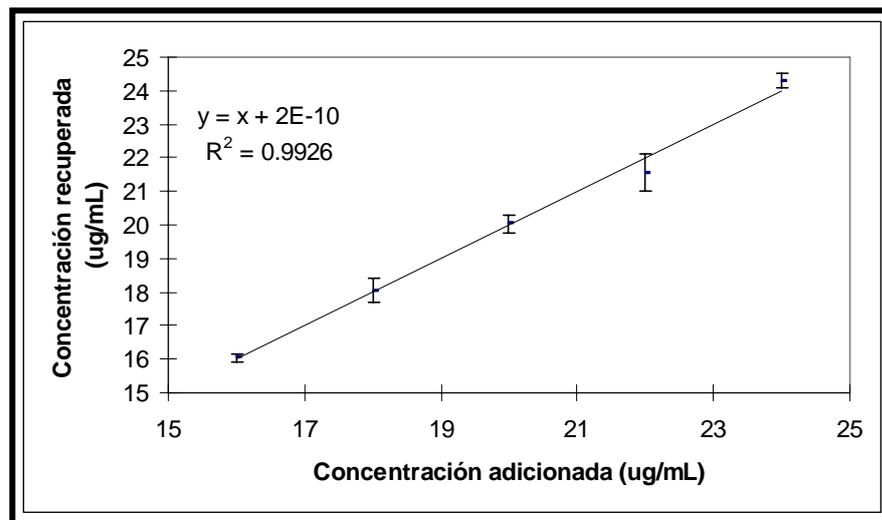


Fig. 11 Gráfico de concentración recuperada promedio +/- desviación estándar, con respecto a la concentración adicionada de Clonixinato de lisina

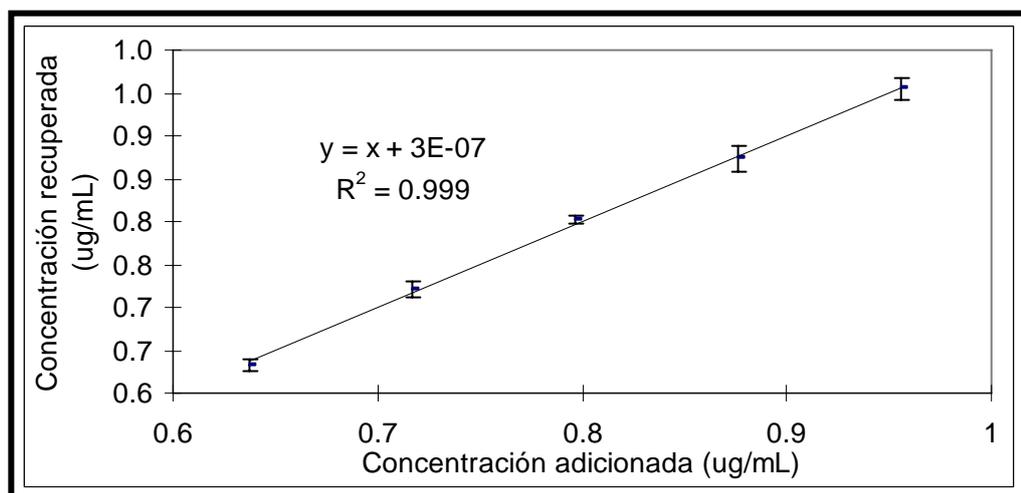


Fig. 12 Gráfico de concentración recuperada promedio +/- desviación estándar, con respecto a la concentración adicionada de Ketorolaco trometamina

Para demostrar que existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada en ambos analitos se estableció la siguiente hipótesis:



Hipótesis

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ No se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ Se rechaza Ho

Tabla 17. Análisis de variancia de la regresión para la linealidad del sistema (nivel de significancia seleccionado para la prueba $\alpha=0.05$)					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{cal}	Valor crítico de F
<i>Clonixinato de lisina</i>					
Regresión	1	118.1832	118.1832	782.3657	5.3293E-13
Residuos	13	1.9638	0.1511		
Total	14	120.1469			
<i>Ketorolaco trometamina</i>					
Regresión	1	0.1905	0.1905	1943.3489	1.53E-15
Residuos	13	0.0013	9.8009E-05		
Total	14	0.1917			

Los valores obtenidos de F_{cal} en ambos casos son mayores a $F_{crítica}$ por lo tanto se establece que existe una relación lineal entre la concentración adicionada con respecto a la concentración recuperada a un nivel de significancia (α) del 5%

Tabla 18. Parámetros obtenidos de la regresión de concentración adicionada con respecto a la concentración recuperada de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina		
	Clonixinato de lisina	Ketorolaco trometamina
Coefficiente de correlación (r)	0.9918	0.9967
Coefficiente de determinación (r²)	0.9837	0.9934
CV Conc_rec/Conc_adic	1.7735	1.1675
Pendiente (b₁)	1	1
IC (b₁)	0.9228 – 1.0772	0.9510 – 1.049
Intercepto (b₀)	2E-10	3E-07
IC (b₀)	-1.5599 – 1.5599	-0.0394 – 0.0394
Abreviaturas : Conc_rec : Concentración recuperada; Conc_adic : Concentración adicionada		



Los coeficientes obtenidos de la regresión indican que en ambos casos la regresión explica el 99% de la variación de la concentración recuperada en función del cambio de la concentración adicionada.

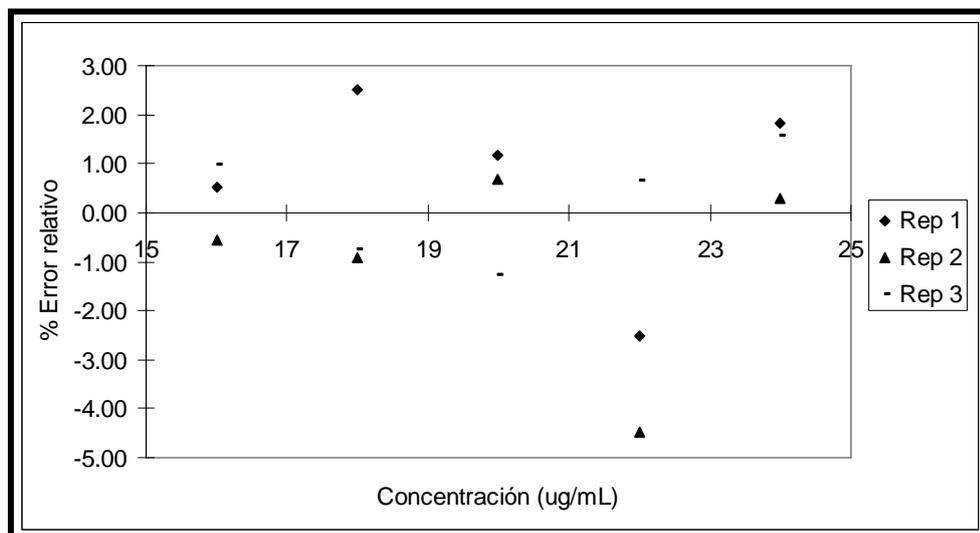


Fig. 13 Gráfico de Porcentaje de error relativo de Clonixinato de lisina en función de la concentración adicionada

El gráfico de error relativo de Clonixinato de lisina en función de la concentración adicionada (Fig. 13) muestra que no se encuentra una tendencia en los datos, ya que se encuentran de manera dispersa y que en la concentración de 18 y 22 $\mu\text{g/mL}$ es en donde se encuentran valores con un mayor porcentaje de error, principalmente en la concentración de 22 $\mu\text{g/mL}$, estos valores se ven reflejados en el valor de coeficiente de variación obtenido, el cuál es muy cercano al 2%.

Por otra parte los valores de error relativo en los niveles de concentración adicionada 16, 20 y 24 $\mu\text{g/mL}$ demuestran precisión en los datos obtenidos en estos niveles ya que no hay una dispersión muy grande en los datos, sin embargo, para ampliar el análisis es necesario ver los resultados de error relativo obtenidos para Ketorolaco trometamina, los cuales se muestran en el siguiente gráfico (Fig. 14):

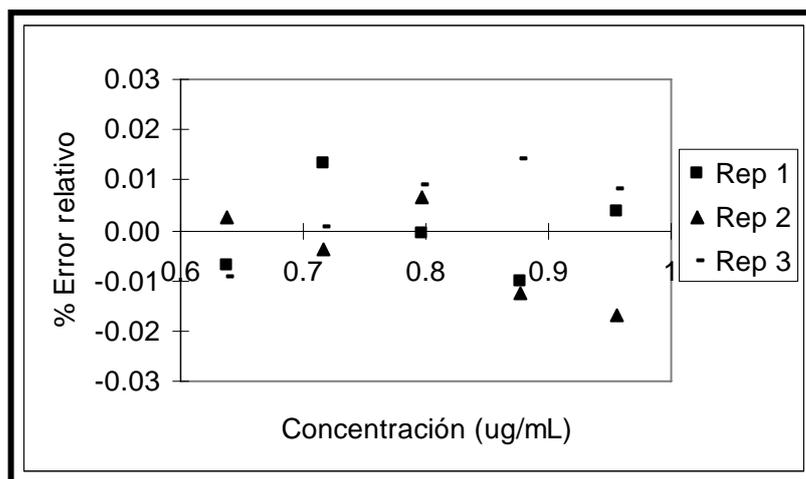


Fig. 14 Gráfico de error relativo de Ketorolaco trometamina en función de la concentración adicionada

Los valores de error relativo de Ketorolaco trometamina muestran que no existe alguna tendencia en los datos entre cada nivel de concentración y que la dispersión entre un mismo nivel es menor que en el caso de Clonixinato de lisina, pero se presenta la misma tendencia que en el caso anterior, los niveles de concentración 0.7 y 0.86 $\mu\text{g/mL}$ son los que presentan un mayor grado de dispersión (los cuales son los niveles equivalentes a los de Clonixinato de lisina).

Los valores altos de porcentaje de error relativo se ven reflejados en los coeficientes de variación obtenidos (1.8013 para Clonixinato de lisina y 1.1672 para Ketorolaco trometamina) e incluso se pueden ver reflejados en el valor obtenidos de la ordenada al origen (0.970 y 0 para Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina, respectivamente) y la pendiente (0.9926 y 1 para Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina, respectivamente), por lo tanto, es necesario realizar un análisis estadístico de prueba de hipótesis para demostrar que estos parámetro cumplen con los criterios de aceptación, los cuales son: el intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero y el intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir el cero; para evaluar estos parámetros se planteo la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Ho: La ordenada al origen es igual a cero

Ha: La ordenada al origen es diferente a cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{crítica}}$ no se rechaza Ho (probabilidad >0.05)

Si $t_{\text{cal}} > t_{\text{crítica}}$ se rechaza Ho



Tabla 19. Resultados obtenidos del análisis estadístico para ambos analitos

Fármaco	Parámetro	t cal	t crítica	Probabilidad	LIC	LSC
CL	Intercepto	0.1354	2.1448	0.8944	-1.4512	1.6453
	Pendiente	0.9926		5E-13	0.9159	1.0692
KT	Intercepto	0		0.9999	-0.0394	0.0394
	Pendiente	1		1E-15	0.9510	1.0490

De acuerdo a la hipótesis establecida los resultados indican que el cero se encuentra incluido en dentro del intervalo de confianza del intercepto, esto con un nivel del 95% de confianza, mientras que en el intervalo de confianza la pendiente no se encuentra incluido el cero y si incluye la unidad (ver tabla 19).

6.2.7 Repetibilidad y reproducibilidad del método

Para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad del método se prepararon tres placebos a tres diferentes niveles de concentración, equivalentes al 100% en la muestra, un nivel superior y un nivel inferior y se le realizó el procedimiento de ensayo por triplicado en dos días y por dos analistas; los resultados obtenidos de porcentaje de recobro son los siguientes:

Tabla 20 Valores de porcentaje de recobro obtenidos para evaluar repetibilidad y reproducibilidad del método

	Analista 1		Analista 2		CV % Recobro	
	% Recobro		% Recobro			
	CL	KT	CL	KT	CL	KT
Día 1	99.9928	100.5321	99.5897	99.4754	1.1627	1.0073
	102.1468	101.6315	99.8315	100.0793		
	100.0613	100.0073	99.2804	100.9088		
	100.3505	100.9032	99.8654	100.6762		
	99.5416	100.8533	102.0816	102.9939		
	100.6853	100.0056	102.2972	102.3632		
	101.9490	99.2696	101.1592	100.1130		
	102.1663	100.7119	100.1438	99.1902		
98.8406	101.6683	102.1123	100.5855			
CV	1.1964	0.7737	1.1995	1.2458		



Día 2	102.2519	100.7853	100.4017	99.1863	1.0333	1.4162
	100.8429	101.7609	100.6755	99.0435		
	103.2253	102.4817	102.3580	100.4109		
	100.7536	101.7569	100.4521	99.0923		
	99.2971	100.5402	99.6486	100.9986		
	101.5129	101.8655	101.6352	98.7076		
	99.3730	101.4417	100.4743	97.2479		
	100.6471	100.2900	101.1610	98.5104		
	100.6277	100.5466	101.8473	99.1055		
CV	1.2458	0.7472	0.8466	1.0844		
CV GLOBAL					1.0932	1.2319

El criterio de aceptación establecido reportado es el de un coeficiente de variación menor al 2% ⁽³⁾, por lo cual se puede ver que los valores se aceptan y que el método es reproducible. Al graficar los valores promedio de porcentaje de recobro +/- desviación estándar se observa que los intervalos son muy parecidos entre analistas y días:

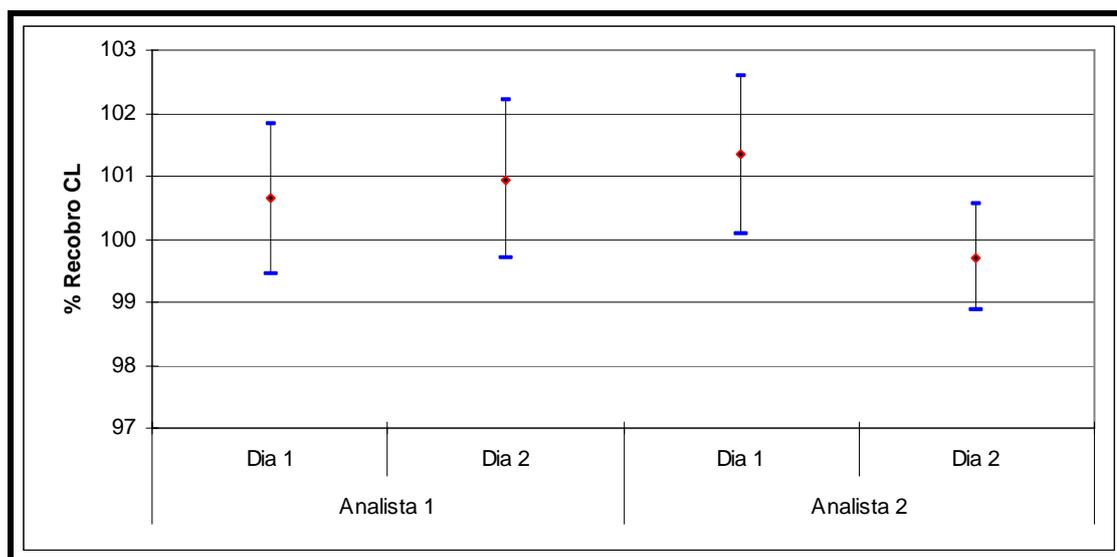


Fig. 15 Gráfico de porcentaje de recobro obtenido por dos analistas en dos días para Clonixinato de lisina.

En el caso de Clonixinato de lisina (Fig. 15) los intervalos establecidos son muy semejantes entre el día de análisis y los dos analistas:

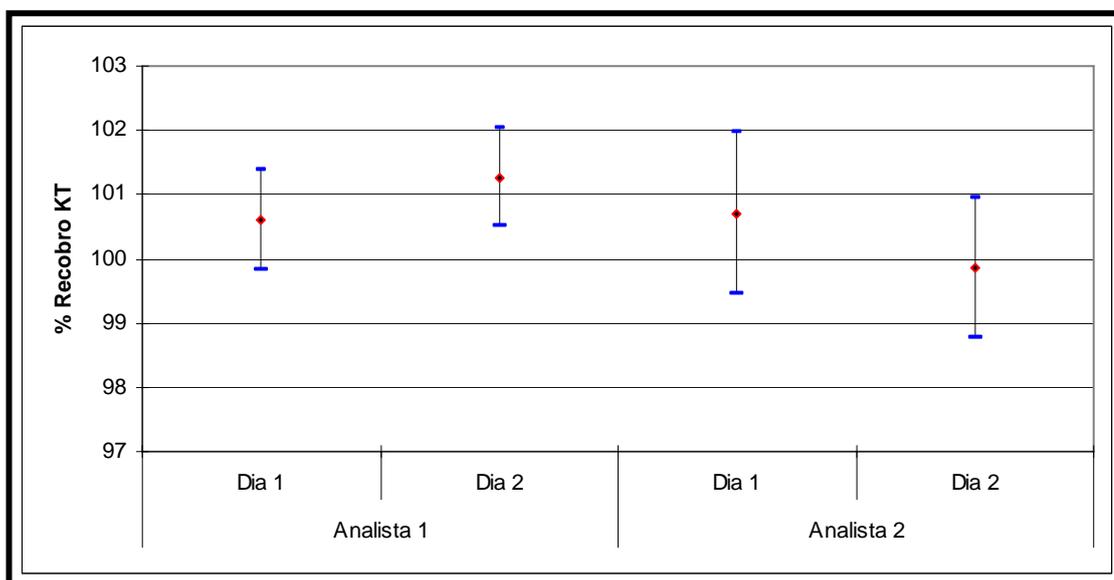


Fig. 16 Gráfico de porcentaje de recobro obtenido por dos analistas en dos días para Ketorolaco trometamina

En el caso del Ketorolaco trometamina (Fig. 16) la desviación de los datos es muy pequeña, lo cual indica que entre los datos de un mismo día no existió mucha variación; el día que se obtuvo una variación mas alta fue el día 1 del analista 2, sin embargo los intervalos son muy parecidos en su mayoría; un análisis estadístico útil para confirmar si existe o no diferencia en el porcentaje de recobro de cada uno de los analistas durante los dos días de trabajo es el “Modelo de diseño anidado” ^[33], en el cual se tienen dos factores de estudio (A: analista, D: día de trabajo) con nueve réplicas obtenidas para cada analista y en cada día (Ver anexo 3. Fórmulas y procedimiento de cálculo del modelo de diseño anidado). Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 21 Tabla de análisis de varianza para el diseño anidado de dos etapas para KT y CL						
Análisis de varianza para Ketorolaco trometamina						
	Suma cuadrados del analista	gl	Cuadrado medio	F calc	F crítica	p value
<i>Analista</i>	3.9752	1	3.9752	4.0505	4.1491	0.3419
<i>Día(analista)</i>	5.2036	2	2.6018	2.6511	3.315	0.086
<i>Error</i>	31.4048	32	0.9814	-----	-----	-----
<i>Total</i>	40.5836	35	-----	-----	-----	-----

Tabla 22 (Continuación)						
Análisis de varianza para Clonixinato de lisina						
	Suma cuadrados del analista	gl	Cuadrado medio	F calc	F crítica	p value
<i>Analista</i>	3.0861	1	3.0861	2.3725	4.1491	0.3795
<i>Día(analista)</i>	4.9313	2	2.4656	1.8955	3.2945	0.1667
<i>Error</i>	41.6246	32	1.3008	-----	-----	-----
<i>Total</i>	49.6419	35	-----	-----	-----	-----
Nota: <i>Analista</i> $F_{crítica}(0.5\%,1,32\text{ gl})$; <i>Día(analista)</i> $F_{crítica}(0.05\%,2,32\text{ gl})$						

A partir de los datos obtenidos es necesario plantear una serie de hipótesis para establecer si existe alguna diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de recobro de los analistas, así como el día de trabajo asociado a cada uno; las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Ho: $A_1 = \dots = A_i = 0$ (el factor *analista* no influye en el porcentaje de recobro obtenido)

H₁ : algún $A_i \neq 0$ (el factor *analista* influye)

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} = \frac{SC_A}{SC_E} > F_{crítica(a-1),(r-1)ab, 0.5\%}$ Se rechaza Ho a un nivel del 95% de confianza

Al realizar el mismo tratamiento de análisis de variancia los datos obtenidos para Ketorolaco trometamina ($F_{calc}=4.0505$) y Clonixinato de lisina ($F_{calc}=2.3725$) se obtuvieron valores de F calculada menores a F crítica (4.1491) en ambos casos por lo tanto se puede decir que el método es reproducibile entre analistas ya que ambos obtuvieron porcentajes de recobro parecidos al realizar el mismo ensayo y bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Es necesario, una vez que se ha demostrado que el analista no ejerce influencia sobre el resultado obtenido demostrar si el día de análisis presenta una influencia debido a variables que no siempre se pueden controlar (humedad relativa, hora de análisis y temperatura del ambiente diferente entre días); para esto se plantean la siguiente hipótesis:



Ho: $D_{1(i)} = \dots = D_{j(i)} = 0$ (el factor *día(analista)* no influye en el porcentaje de recobro obtenido)

H₁: algún $A_i \neq 0$ (el factor *día(analista)* influye)

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} = \frac{SC_{D(A)}}{SC_E} > F_{crítica (b-1)a,(r-1)ab, 0.5\%}$ Se rechaza Ho a un nivel del 95% de confianza

Los resultados obtenidos para F calculada de Ketorolaco trometamina ($F_{cal} = 2.6511$) y de Clonixinato de lisina ($F_{cal} = 1.8955$) fueron menores que los del valor crítico de F ($F_{crítica} = 3.315$) esto demuestra que el día de análisis no es un factor de influencia en el valor de porcentaje de recobro obtenido realizando el ensayo, por lo tanto el método es repetible entre días.



De manera resumida, las cualidades del método evaluado durante la validación y sus criterios de aceptación fueron los siguientes ⁽³⁾:

Tabla No. 22 Resultados obtenidos en la evaluación de las cualidades del método y los criterios de aceptación establecidos para la validación del método analítico utilizado para cuantificar simultáneamente Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina en una solución inyectable					
PARÁMETRO DE VALIDACIÓN		RESULTADOS		CRITERIO DE ACEPTACIÓN ^[3]	OBSERVACIÓN
		CL	KT		
Especificidad		El método es específico para la detección y cuantificación de CL y KT		El método debe ser específico	Cumple
Adecuabilidad	R T K	no aplica 1.4 1.2	8 1.1 1.3	R > 2 T < 2 K > 2	Cumple
Linealidad del sistema	r ² r IC(β ₁)	0.9996 0.9998 14738 – 15101	0.9997 0.9998 139639 – 142598	r ² > 0.98 r > 0.999 IC(β ₁) no debe incluir el cero	Cumple
Precisión del sistema	CV _{y/x}	1.28	1.28	CV < 1.5%	Cumple
Linealidad del método	CV _{y/x} = r ² r = b ₀ = b ₁ =	1.2761 0.9996 0.9998 2.49E-09 1	1.2773 0.9997 0.9998 2.59E-10 1	CV < 2% r ² > 0.98 r > 0.999 b ₀ = 0 b ₁ = 1	Cumple
Precisión del método	CV _{N1} CV _{N2} CV _{N3}	1.2515 0.8817 0.5224	0.638 0.6086 0.8468	CV < 2	Cumple
Exactitud y repetibilidad	t _{critica} N1 N2 N3 IC % Rec obr o CV _{%Rec}	-0.73 -1.27 -0.11 99.3 – 10 0.2 0.8975	-2.4 -1.4 -0.7 99.9 – 99. 3 0.6826	t _{cal} < t _{critica} (α=0.05 , n-1 gl)= 2.57 %Recobro 97- 103% CV _{global} < 2%	Cumple
Reproducibilidad	CV	1.0932	1.2399	CV _{global} < 2 %	Cumple

7. Conclusiones

Se validó un método analítico para determinar el contenido químico de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina en una solución inyectable, usando para esto el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Se realizó una investigación de los antecedentes teóricos y normativos sobre la validación de métodos analíticos y con esta información se realizó un protocolo de validación, por medio del cual se realizaron los estudios de laboratorio pertinentes.

Se evaluó el desempeño de las siguientes cualidades del método: especificidad, precisión del sistema, precisión del método, linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad a partir de la información obtenida con los estudios de laboratorio, demostrando que las cualidades del método son adecuadas para obtener resultados confiables.



8. Anexos

Anexo 1. Preparación de soluciones

Preparación del placebo

Preparar 100 mL de formulación placebo cargado:

Componente	%	Cantidad
Excipientes c. b. p.	100	100 mL

Preparación del placebo adicionado

Preparar 100 mL de formulación placebo cargado de acuerdo a la siguiente composición:

Componente	%	Cantidad
Ketorolaco trometamina	0.166	0.166 g
Clonixinato de lisina	4.166	4.166 g
Excipientes c. b. p.	100	100 mL

Procedimiento de preparación de los tres niveles de precisión del sistema

1. Pesar en un pesa muestras aproximadamente exacto 25mg de ketorolaco trometamina SR y transferirlo a un matraz volumétrico de 250mL, etiquetarlo como SOL. KET, enjuagar el pesa muestra con aproximadamente 1mL de agua desionizada.
2. Llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. (ketorolaco trometamina 0.1mg/mL).
3. Pesar en un pesa muestra aproximadamente exacto 62.5 mg de Clonixinato de lisina SR y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, etiquetarlo como SOL. CL.
4. Enjuagar el pesa muestra con aproximadamente 1mL de agua desionizada.
5. Llevar el matraz etiquetado como SOL. CL al volumen de la marca de aforo con agua desionizada, (Clonixinato 2.5mg/mL).
6. Tomar de la SOL. CL. con pipeta volumétrica 5 mL y transferirlo a un matraz volumétrico de 100mL, esta es la SOL. A.
7. Tomar con pipeta volumétrica 5mL de la SOL. KET y transferirlos al matraz volumétrico de 100mL etiquetado como SOL. A
8. Llevar el matraz etiquetado como SOL. A al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. (Clonixinato de lisina 125 µg/mL; ketorolaco trometamina 5 µg/mL).
9. Tomar de la SOL. A los siguientes volúmenes: 2, 4 y 6 mL de alícuota y transferirlas a un matraz volumétrico de 25mL, respectivamente.
10. Llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada



11. Tomar con una jeringa 5mL de alícuota del matraz anterior y filtrar con filtro de tamaño de poro 0.5 μm de diámetro, desechar las primeras tres gotas y depositar el resto en un frasco vial e inyectar en el cromatógrafo.

%	Vol. Alícuota (mL)	Vol. Total (mL)	Conc. KT Final ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. CL Final ($\mu\text{g/mL}$)
50	2	25	0.4	10
100	4	25	0.8	20
150	6	25	1.2	30

Procedimiento de preparación de cinco niveles de precisión del sistema

1. Pesar en un pesa muestras exactamente 25 mg de ketorolaco trometamina SR y transferirlo a un matraz volumétrico de 250 mL, etiquetarlo como SOL. KET, enjuagar el pesa muestra con aproximadamente 0.5 mL de agua desionizada.
2. Llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. (ketorolaco trometamina 0.1 mg/mL).
3. Pesar en un pesa muestra exactamente 62.5 mg de Clonixinato de lisina SR y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, etiquetarlo como SOL. CL.
4. Enjuagar el pesa muestra con aproximadamente 0.5 mL de agua desionizada.
5. Llevar el matraz etiquetado como SOL. CL al volumen de la marca de aforo con agua desionizada, (Clonixinato 2.5 mg/mL).
6. Tomar de la SOL. CL. con pipeta volumétrica 5 mL y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 mL, esta es la SOL. A.
7. Tomar con pipeta volumétrica 5 mL de la SOL. KET y transferirlos al matraz volumétrico de 100 mL etiquetado como SOL. A
8. Llevar el matraz etiquetado como SOL. A al volumen de la marca de aforo con agua desionizada. (Clonixinato de lisina 125 $\mu\text{g/mL}$; ketorolaco trometamina 5 $\mu\text{g/mL}$).
9. Tomar de la SOL. A los siguientes volúmenes: 2, 3, 4, 5 y 6 mL de alícuota y transferirlas a un matraz volumétrico de 25mL, respectivamente.
10. Llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada
11. Tomar con una jeringa 5mL de alícuota del matraz anterior y filtrar con filtro de tamaño de poro 0.5 μm de diámetro, desechar las primeras tres gotas y depositar el resto en un frasco vial e inyectar en el cromatógrafo.



%	Vol. Alícuota (mL)	Vol. Total (mL)	Conc. KT Final ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. CL Final ($\mu\text{g/ML}$)
50	2	25	0.4	10
75	3	25	0.6	15
100	4	25	0.8	20
125	5	25	1	25
150	6	25	1.2	30

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.0128 M pH 7.00

1. Pesar lo mas exacto posible en la balanza analítica y sobre papel encerado 0.883 g de fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
2. Verter esta sal en un matraz volumétrico de 1 L y enjuagar el papel encerado con aproximadamente 1 mL de agua desionizada, depositando el líquido en el matraz volumétrico
3. Pesar lo más exacto posible 1.714 g de fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
4. Verter esta sal en el mismo matraz volumétrico de 1 L y enjuagar el papel encerado con aproximadamente 1 mL de agua desionizada, depositando el líquido en el matraz volumétrico
5. Adicionar agua desionizada por las paredes del matraz volumétrico, hasta arrastrar todas las sales.
6. Agitar vigorosamente el matraz, hasta disolver totalmente las sales (si es necesario agregar mas agua desionizada)
7. Llevar al volumen de la marca de aforo con agua desionizada (invertir el matraz 3 veces)
8. Filtrar con el embudo especial de membrana para el HPLC (usar la membrana resistente a solventes orgánicos de tamaño de poro de 2 μm) y coleccionar en el matraz Kitasato.
9. Tomar una muestra y medir el pH



Anexo 2. Fórmulas

Fórmula 1. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de error relativo.

$$\% \text{Error.relatoivo} = \left(\frac{\text{Area.estimada} - \text{Area.real}}{\text{Area.real}} \right) * 100$$

Fórmula 2. Fórmula empleada para determinar el porcentaje de recobro.

$$\% \text{Re cobro} = \left(\frac{\text{Concentracion.adicionada}}{\text{Concentracion.recuperada}} \right) * 100$$

Fórmula 3. Fórmula empleada para determinar el intervalo de confianza del porcentaje de recobro obtenido.

$$IC = t_{\text{alfa},n-1} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

En donde:

IC: Intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro.

alfa: Grado o nivel de incertidumbre, en este caso 0.05, debido a que este intervalo considera que la muestra tiene una distribución *t* y que se consideran las dos colas de la distribución como zonas de rechazo.

n: número de ensayos realizados.

Fórmula 4. Fórmula para determinar el valor de la distribución *t* calculado a partir de los datos obtenidos de porcentaje de recobro.

$$t.calc = \frac{(\% \text{ Recuperado} - 100\%)}{S / \sqrt{n}}$$

Fórmula 5. Fórmula para determinar el valor de concentración recuperada en base a la ecuación de regresión obtenida de área con respecto a la concentración adicionada

$$\text{Concentración}_\text{recuperada} = \frac{(\text{Area} - \text{ordenada.al.origen})}{\text{pendiente}}$$



Anexo 3. Fórmulas y procedimiento de cálculo del “Modelo de diseño anidado”

Este análisis estadístico es realizado cuando dos factores tienen una relación entre sí, en este caso el factor “día” tiene una relación con respecto a los dos “analistas”, de modo que un analista realizó su análisis en dos días de trabajo pero no en un solo día trabajo el mismo analista; se dice entonces que el día se encuentra anidado con el analista, es decir $D(A)$, y el modelo obtenido para explicar el porcentaje de recobro obtenido es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

En donde

y_{ijk} = porcentaje de recobro real (respuesta analítica obtenida)

μ = Valor promedio

A_i = Influencia del analista en el porcentaje de recobro obtenido

$D_{j(i)}$ = Influencia del día en el porcentaje de recobro obtenido

$\varepsilon_{k(ij)}$ = Error asociado a la medición

Una vez que el modelo se ha planteado y se ha considerado que por cada día de trabajo se encuentran dos analistas implicados en la medición $D_{j(i)}$, además de que se ha considerado que en el error asociado también se encuentra influenciado por el día de trabajo y el analista involucrado $\varepsilon_{k(ij)}$ es posible realizar un análisis de variancia como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 21 Análisis de variancia para evaluar precisión intermedia <small>(adaptado de Ref. 33)</small>				
Factor de estudio	g. l.	SC	CM	F _{cal}
Analista	a-1	SC _A	SC _A /g.l. analista = CM _A	CM _A /CM _D
Día (analista)	(b-1)a	SC _{D(A)}	SC _{D(A)} /g.l. día = CM _{D(A)}	CM _D /CM _E
Error	(r-1)ab	SC _E	SC _E /g.l. error = CM _E	-----
Total	n-1	SC _T	-----	-----
Abreviaturas n : número de observaciones				

En donde la suma de cuadrados totales (SC_T) corresponde a la suma de los cuadrados de los analistas, días y el error asociado:

$$SCT = SC_A + SC_{D(A)} + SC_E$$



En donde:

Suma de cuadrados del analista (SC_A) para Ketorolaco trometamina

$$SC_A = \frac{\sum_{i=1}^a y_{i..}^2}{b \cdot r} - \left(\frac{\sum_{ijk=a}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^k y_{ijk}}{a \cdot b \cdot r} \right)^2$$

Que al darle una interpretación con respecto a los datos obtenidos:

$$SC_A = \left(\frac{(\text{analista1.Dos.Días})^2 + (\text{analista2.Dos.Días})^2}{\text{Días} \cdot \text{respuestas}} \right) - \left(\frac{\text{Todas.respuestas}^2}{\text{analistas} \cdot \text{días} \cdot \text{respuestas}} \right)$$

En donde

analista.Dos.Días = suma del porcentaje de recobro de los dos días de un solo analista

Días = Días de trabajo utilizados para evaluar reproducibilidad y repetibilidad para cada analista

Respuestas = mediciones de porcentaje de recobro obtenidas por un analista en un día de trabajo

Todas.respuestas = suma total de porcentajes de recobro (dos días y dos analistas)

Al sustituir los datos obtenidos de porcentaje de recobro de Ketorolaco trometamina:

$$SC_A = \left(\frac{(1817.0516)^2 + (1805.0888)^2}{2 \cdot 9} \right) - \left(\frac{3622.1404^2}{2 \cdot 2 \cdot 9} \right)$$

Suma de cuadrados del Día (analista) para Ketorolaco trometamina

$$SC_D = \frac{\sum_{ij=1}^a y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum_{i=1}^a y_{i..}^2}{b \cdot r}$$

Al darle una interpretación con respecto a los datos obtenidos:

$$SC_{D(A)} = \left(\frac{(D1A1^2 + D2A1^2 + D1A2^2 + D2A2^2)}{\text{respuestas}} \right) - \frac{\sum_{i=1}^a y_{i..}^2}{b \cdot r}$$

En donde:

$D_n A_n$ = Suma del porcentaje de recobro del día n y del analista n .

Sustituyendo los valores obtenidos de porcentaje de recobro de Ketorolaco trometamina

$$SC_{D(A)} = \left(\frac{(905.5827^2 + 911.4689^2 + 906.3856^2 + 898.8033^2)}{9} \right) - \left(\frac{3622.1404^2}{2 \cdot 2 \cdot 9} \right)$$



Suma de cuadrados del error asociado con la medición para Ketorolaco trometamina

$$SC_E = \sum_{ijk=1}^a y_{ijk}^2 - \frac{\sum_{ij=1}^a y_{ij}^2}{r}$$

Al darle una interpretación con respecto a los datos obtenidos se obtiene:

$$SC_E = Cuad.Todas.respuestas - \frac{\sum_{ij=1}^a y_{ij}^2}{r}$$

En donde:

Cuad.Todas.respuestas = suma de todos los porcentajes de recobro obtenidos; elevando cada uno de los valores de porcentaje de recobro al cuadrado

Sustituyendo los valores obtenidos de porcentaje de recobro de Ketorolaco trometamina

$$SC_E = 364482.2846 - \left(\frac{(905.5827^2 + 911.4689^2 + 906.3856^2 + 898.8033^2)}{9} \right)$$

Finalmente al sustituir los datos obtenidos de suma de cuadrados y considerando a=2 b=2 y r=9 para determinar los grados de libertad se obtienen los resultados de la tabla 22.



Anexo 4. Resultados

Resultados obtenidos en la evaluación de la adecuabilidad del sistema

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inj	Analito	RT (min)	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	K	USP T
20.0	1	CL	4.715	144604	1.299911	1.42
20.0	2	CL	4.627	146178	1.257154	1.42
20.0	3	CL	4.651	148740	1.268735	1.46
20.0	4	CL	4.663	146714	1.274528	1.42
20.0	5	CL	4.681	145729	1.283487	1.40
20.0	6	CL	4.697	145184	1.291344	1.40
Promedio			4.672	146191.553	1.3	1.40
S			0.032	1450.383	0	0.00
CV			0.7	1	1.2	1.40

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inyección	Analito	RT (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	K	USP T
0.80	1	KT	2.84	55249	0.385204	1.42
0.80	2	KT	2.813	55143	0.372334	1.40
0.80	3	KT	2.815	54708	0.373121	1.44
0.80	4	KT	2.821	55011	0.376233	1.41
0.80	5	KT	2.828	54652	0.379595	1.41
0.80	6	KT	2.831	55767	0.381118	1.43
Promedio			2.825	55088.483	0.4	1.40
S			0.01	407.513	0	0.00
CV			0.4	0.7	1.3	1.10



Valores obtenidos de exactitud y repetibilidad del método

Nombre	RT	Área	Nombre	RT	Área
CL	4.92	223521	KT	2.903	130476
CL	4.908	224405	KT	2.898	130008
CL	4.918	225797	KT	2.903	130986
CL	4.908	227364	KT	2.899	132315
CL	4.932	227471	KT	2.902	130442
CL	4.93	219996	KT	2.905	130246
CL	4.901	278808	KT	2.901	108601
CL	4.895	285351	KT	2.898	108957
CL	4.894	280111	KT	2.897	108758
CL	4.893	281311	KT	2.897	107387
CL	4.891	278536	KT	2.896	109128
CL	4.892	280477	KT	2.896	109156
CL	4.875	337612	KT	2.895	86155
CL	4.875	337318	KT	2.893	87174
CL	4.88	340166	KT	2.896	86848
CL	4.875	339732	KT	2.895	86667
CL	4.87	336716	KT	2.893	87472
CL	4.875	335604	KT	2.893	85442

Valores obtenidos de linealidad del método

Nombre	Área CL	Área KT
PC 80% CL KT	233961	87730
PC 80% CL KT	233311	88846
PC 80% CL KT	231675	88971
PC 80% CL KT	235103	87319
PC 80% CL KT	234972	87459
PC 80% CL KT	233120	88077
PC 90% CL KT	265845	100610
PC 90% CL KT	258058	97747
PC 90% CL KT	257426	98385
PC 90% CL KT	260770	98110
PC 90% CL KT	257798	98924
PC 90% CL KT	262120	100316



Valore obtenidos de linealidad del método (continuación)		
PC 100% CL KT	289565	109008
PC 100% CL KT	291980	110320
PC 100% CL KT	288185	109969
PC 100% CL KT	289030	109409
PC 100% CL KT	283009	110262
PC 100% CL KT	286533	109119
PC 110% CL KT	305825	118072
PC 110% CL KT	311164	118484
PC 110% CL KT	300504	117767
PC 110% CL KT	307568	119534
PC 110% CL KT	315040	121180
PC 110% CL KT	315216	121909
PC 120% CL KT	345808	130058
PC 120% CL KT	340520	126761
PC 120% CL KT	340792	127449
PC 120% CL KT	345823	127732
PC 120% CL KT	344917	130638
PC 120% CL KT	345746	128866
Abreviaturas PC : Placebo adicionado CL : Clonixinato de lisina; KT : Ketorolaco trometamina		

Valores obtenidos de área para evaluar repetibilidad y reproducibilidad Del método

Día/Analista	CL			KT		
	Área	Conc rec.	Conc adic.	Área	Conc rec.	Conc adic.
D1A1	222085	16.02	16.02	128749	0.96	0.96
	226869	16.36	16.02	130157	0.98	0.96
	222237	16.03	16.02	128077	0.96	0.96
	278140	20.06	19.99	107131	0.80	0.80
	275898	19.90	19.99	107078	0.80	0.80
	279068	20.13	19.99	106178	0.80	0.80
	339161	24.46	24.00	84386	0.63	0.64
	339884	24.52	24.00	85612	0.64	0.64
	328820	23.72	24.00	86425	0.65	0.64



Valores obtenidos para evaluar repetibilidad y reproducibilidad del método (cont.)						
D1A2	222795	15.93	15.99	128913	0.95	0.96
	223336	15.96	15.99	129692	0.96	0.96
	222103	15.88	15.99	130762	0.96	0.96
	279373	19.97	20.00	109143	0.80	0.80
	285573	20.41	20.00	111642	0.82	0.80
	286176	20.46	20.00	110962	0.82	0.80
	339005	24.23	23.96	86623	0.64	0.64
	335602	23.99	23.96	85830	0.63	0.64
	342199	24.46	23.96	87029	0.64	0.64
D2A1	229403	16.00	16.37	130888	0.96	0.97
	226242	16.00	16.14	132155	0.96	0.98
	231587	16.00	16.52	133091	0.96	0.98
	282643	20.01	20.16	109644	0.80	0.81
	278557	20.01	19.87	108333	0.80	0.80
	284773	20.01	20.32	109761	0.80	0.81
	333737	23.96	23.81	87375	0.64	0.65
	338016	23.96	24.11	86383	0.64	0.64
	337951	23.96	24.11	86604	0.64	0.64
D2A2	225146	16.00	16.06	130371	0.96	0.96
	225760	16.00	16.11	130559	0.96	0.97
	229533	16.00	16.37	128781	0.96	0.95
	281637	20.00	20.09	109301	0.80	0.81
	279384	20.00	19.93	107238	0.80	0.79
	284954	20.00	20.33	109727	0.80	0.81
	337429	23.96	24.07	88404	0.64	0.65
	339735	23.96	24.24	87271	0.64	0.65
	342040	23.96	24.40	86747	0.64	0.64
Nota: La concentración se encuentra reportada en $\mu\text{g/mL}$						



Anexo 5. Definiciones

Absorbancia.

Grado de absorción de la luz o de otra energía radiante a su paso a través de un medio^[1].

Adecuabilidad del sistema.

Verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Analito.

Componente específico a medir de una muestra.

Estabilidad analítica de la muestra.

Propiedad de una muestra preparada, para conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas.

Especificidad.

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés

Exactitud.

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Especificaciones.

Descripción del material que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Intervalo.

Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Ley de Beer.

Ley que afirma que la absorbancia es directamente proporcional y lineal a la concentración de la especie absorbente^[1,2]

Linealidad del sistema.

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito.



Linealidad del método

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos a partir de la preparación de placebos adicionados son proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra

Metodología de prueba.

Procedimiento para determinar si un producto o materia prima cumple con las especificaciones establecidas.

Método analítico.

Descripción de la secuencia de actividades, materiales y criterios que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Método analítico desarrollado internamente.

Método desarrollado por el propio laboratorio.

Método analítico indicativo de estabilidad.

Método cuantitativo capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado, debido a las condiciones de almacenaje.

Método analítico oficial.

Método que aparece en la literatura oficial reconocida.

Método analítico no oficial.

Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

Muestra.

Porción del material a evaluar.

Muestra analítica.

Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

Muestra adicionada.

Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.

Parámetros de desempeño.

Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Placebo analítico.

Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Placebo adicionado.

Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.



Precisión.

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea

Precisión intermedia.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Protocolo de validación.

Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Rango.

Es el intervalo entre los niveles de concentración alto y bajo del analito estudiado.

Recobro.

Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado, empleando el método analítico.

Repetibilidad.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

Reproducibilidad o precisión intermedia.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Revalidación.

Comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico.

Robustez.

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Validación del método analítico.

Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



Tolerancia.

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos del método.

Sustancia de referencia.

Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales se comparan con la sustancia en evaluación.

Sustancia de referencia primaria.

Sustancia que es designada por tener la más alta calidad microbiológica, física y química, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

Sustancia de referencia, sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación.

Sustancia de referencia secundaria.

Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido



Anexo 6. Símbolos y abreviaturas

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
[]	Concentración
$ d_i $	Diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto del análisis inicial
®	Marca registrada
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANADEVA	Análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en ingles)
b_0	Ordenada al origen
b_1	Pendiente
CG	Cromatografía de gases
CL	Clonixinato de lisina SR
CM	Cuadrado medio
CNQFB	Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos A. C.
conc	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
CV	Coefficiente de variación
F_{cal}	Valor calculado correspondiente a la distribución F
F_{critico}	Valor critico de la distribución F, encontrado en tablas
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
g l	Grados de libertad
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía de líquidos de alta resolución, CLAR)
IC(μ)	Intervalo de confianza del promedio
K	Factor de capacidad
KT	Ketorolaco trometamina
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LIC	Límite inferior de confianza
LSC	Límite superior de confianza
Log P	Coefficiente de partición (octanol/agua)
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
min	Minutos
MTRA	Muestra
N	Platos teóricos
nm	Nanómetros



NOM	Norma Oficial Mexicana
PG	Prostaglandina
pH	Índice de acidez
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación
PREC	Precisión
Prom	Promedio
r^2	Coefficiente de determinación
Rs	Resolución
S	Desviación estándar
SC	Suma de cuadrados
SNC	Sistema Nervioso Central
SOL	Solución
SR	Sustancia de referencia
STD	Estándar
Tr	Tiempo de retención
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
v/v	Volumen/volumen



Anexo 7. Índice de tablas

Título	Pág.
Tabla 1. Parámetros de validación a emplear para contenido químico de acuerdo a distintas referencias	5
Tabla 2. Tipos de cromatografía y condiciones de fase móvil y fase estacionaria	11
Tabla 3. Clasificación de la cromatografía y su fundamento	11
Tabla 4. Condiciones reportadas de separación de Ketorolaco trometamina	16
Tabla 5. Condiciones reportadas de separación de Clonixinato de lisina	21
Tabla 6. Análisis de pureza de tres muestras para demostrar especificidad	30
Tabla 7. Valores obtenidos de precisión del sistema	31
Tabla 8. Valores de área obtenidos para evaluar la linealidad del sistema	32
Tabla 9. Parámetros estadísticas de la regresión	33
Tabla 10. Análisis de varianza de la regresión para la linealidad del sistema	35
Tabla 11. Valores obtenidos de la ecuación de regresión	36
Tabla 12. Valores obtenidos de precisión del método	37
Tabla 13. Valores de límites de confianza obtenidos a partir del valor promedio de porcentaje de recobro	38
Tabla 14. Valores de área obtenidos para evaluar linealidad del método	39
Tabla 15. Parámetros obtenidos de la regresión: área obtenida con respecto a la concentración adicionada	40
Tabla 16. Valores obtenidos de la linealidad del método a partir de las ecuaciones de regresión	41
Tabla 17. Análisis de varianza de la regresión para la linealidad del sistema	42
Tabla 18. Parámetros obtenidos de la regresión de concentración adicionada con respecto a la concentración recuperada de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina	42
Tabla 19. Resultados obtenidos del análisis estadístico para ambos analitos	45
Tabla 20. Valores de porcentaje de recobro obtenidos para evaluar repetibilidad y reproducibilidad del método	45
Tabla 21. Tabla de análisis de varianza para el diseño anidado de dos etapas para KT y CL	47
Tabla 22. Criterios de aceptación para la validación del método analítico utilizado para cuantificar simultáneamente Clonixinato de Lisina y Ketorolaco trometamina en una solución inyectable	50



Anexo 8. Índice de figuras

Nº Figura	Título	Página
1	Tipos de cromatografía de líquidos	10
2	Estructura del Ketorolaco trometamina y aspecto físico	13
3	Estructura del Clonixinato de lisina y aspecto físico	18
4	Topograma de una solución estándar de Clonixinato de lisina y Ketorolaco trometamina	27
5	Diagrama de especies presentes de los analitos en función del pH y espectro de absorción	28
6	Cromatogramas obtenidos para evaluar la prueba de especificidad del método	29
7	Gráfico de error relativo de Clonixinato de lisina	33
8	Gráfico de error relativo de Ketorolaco trometamina	34
9	Curva de regresión global de Ketorolaco trometamina y Clonixinato de lisina	35
10	Gráfico de porcentaje recuperado promedio +/- IC de los dos analitos en función del día de trabajo y de manera global	39
11	Gráfico de concentración recuperada promedio +/- desviación estándar, con respecto a la concentración adicionada de Clonixinato de lisina	41
12	Gráfico de concentración recuperada promedio +/- desviación estándar, con respecto a la concentración adicionada de Ketorolaco trometamina	41
13	Gráfico de Porcentaje de error relativo de Clonixinato de lisina en función de la concentración adicionada	43
14	Gráfico de error relativo de Ketorolaco trometamina en función de la concentración adicionada	44
15	Gráfico de porcentaje de recobro obtenido por dos analistas en dos días para Clonixinato de lisina.	46
16	Gráfico de porcentaje de recobro obtenido por dos analistas en dos días para Ketorolaco trometamina	47



9. Referencias

1. Babylon. Absorbancia. 2007 Disponible:
<http://www.babylon.com/definicion/Absorbancia/Spanish>
2. Universidad Nacional de Colombia. 2005 Disponible en
http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap09/05_01_01.htm
3. CNQFB, Comisión de validación de métodos analíticos. Guía de Validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.: Comisión de validación de métodos analíticos. 123 páginas.
4. FDA, Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation, CDE.R, Editor. 2000.
5. FDA, Validation of chromatographic methods, CDER, Editor. 1994.
6. Secretaría de salud (SSA). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. 1993.
7. Unites States Pharmacopeical Convention, USP 30 Farmacopea de los Estados Unidos, edición en español, ed. C. Press. Vol. 1. 2007, Estados Unidos de América.
8. FDA, Validation of chromatographic methods, CDER, Editor. 1994.
9. ICH, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), in International Conference of Harmonization 2005, ICH harmonized tripartite guideline.
10. Waters. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Primer. 2008 Disponible en:
<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGBH#b1>.
11. Joachim Ermer, J.H.M.M., Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH, Editor. 2005: Weinheim, Republic of Germany. Págs.: 15-19, 21,30,55,63,80,120,170.
12. Quattrocchi, O.A., Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. 1992, Argentina. 407 págs.
13. History of HPLC 2008 [cited; Available from:
<http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html>.



14. Wikipedia. Cromatografía. 2008 Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa>.
15. Tsina, Y.L.T., Aileen Boyd, Cynthia Rocha, Ian Massey, Thomas Tarnowski., 1An indirect (derivatization) and a direct HPLC method for the determination of the enantiomers of ketorolac in plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1996. 15: p. 403-417.
16. Zhao Wang, R.M.D., Michael J. Avram, Determination of ketorolac in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of chromatography B*, 2001. 755: p. 383-386.
17. Ibrahim A. Alsarra, A.A.B., S. M. Ahmed, G. M. Mahrous, Proniosomes as a drug carrier for transdermal delivery of ketorolac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005. 59: p. 485-490.
18. Cardoso, O.C.L., Estudio de biodisponibilidad de ketorolaco en población mexicana, Facultad de química. 2001, UNAM.
19. Lunn, G., HPLC methods for pharmaceutical analysis ed. W. Interscience. Vol. 2, 3. 2000, USA.
20. António Bica, A.F., Henning Blume, Carlos Maurício Barbosa, Determination of clonixin in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000. 889: p. 135-141.
21. I. Pineros, P.B., J. L. Lastres, Extraction and LC determination of lysine clonixinate salt in water/oil emulsions. *Journal of pharmaceutical and biomedical Analysis*, 2002. 755: p. 383-386.
22. Mendez, H.B., Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de Clonixinato de lisina en diferentes formas farmacéuticas, FES ZARAGOZA. 1998, UNAM.
23. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004, M.D.O. Anthony C Moffat, Brian Widdop, Laurent Y Galichet., Editor. 2004, Pharmaceutical press. Versión electrónica
24. Ster, D.E.R., PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 50va edición ed. 2004: THOMPSON. Págs.: 717, 721, 1080, 1096, 1097, 1123, 1127, 1320, 1338, 2089, 2432.



25. Yeon Kima, H.-J.D., et al., Dae-Duk Kime, Ketorolac amide prodrugs for transdermal delivery: stability and in vitro rat skin permeation studies. *Internacional journal of pharmaceutics*, 2005. 273: p. 193-202.
26. Cinthya Morano, Inés Fuentes, and Lauro M. del Rivero. 1998. HPLC method for quantification of lisien clonixinate in human plasma, using ultraviolet detection, AAPS (Annual meeting & expositions, San Francisco, California) Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
27. E. Grippa , L. Santini , G. Castellano , M.T. Gatto , M.G. Leone , L. Sasoa. Simultaneous determination of hydrocortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 738 (2000) 17–25
28. Parvin Zakeri-Milani, Mohammad Barzegar-Jalali, Hosniyeh Tajerzadeh, Yadollah Azarmi, Hadi Valizadeh. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 624–630
29. Shun-Jin Lin, Yi-Ru Chena, Yu-Hui Sua, Hsing-I Tseng, Su-Hwei Chen. Determination of indomethacin in plasma by micellar electrokinetic chromatography with UV detection for premature infants with patent ducts arteriosus. *Journal of Chromatography B*, 830 (2006) 306–313
30. V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo and F. Botrè. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. *Journal of Chromatography A*. Volume 1135, Issue 2, 1 December 2006, Pages 219-229
31. ACD/ChemSketch Freeware Version. Advanced Chemistry Development, Inc. Copyright 1194-2008. Product version 11.02 (Build 25941, 21 Mayo 2008), disponible en: www.acdlabs.com
32. A. Álvarez-Lueje; J. C. Sturm; L. J. Núñez-Vergara; J. Carbajo; J. A. Squella. Voltammetric Behaviour of Clonixin and its Differential Pulse Polarographic Determination in Tablets. *Analytical Letters*, 33:1, 53 — 68
33. Douglas C., Montgomery. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Iberoamericana. USA. Págs.: 393-402

