



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Académico Farmacia y Bioquímica

**Desarrollo de técnica analítica de ketorolaco
trometamina y su validación en tabletas por el método
de cromatografía líquida**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Miguel Angel David VALDIVIA CORREA

ASESOR

Santiago TRUJILLO BERTRAN

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valdivia M. Desarrollo de técnica analítica de ketorolaco trometamina y su validación en tabletas por el método de cromatografía líquida [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académica Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2010.

RESUMEN

Ketorolaco Trometamina es un agente antiinflamatorio no esteroide con una acción analgésica, indicado para mitigar el dolor en corto tiempo y cuya acción la ejerce inhibiendo la síntesis de las prostaglandinas; presentado bajo comprimidos, ampollas (vía intramuscular) y solución oftálmica.

En este trabajo se presenta la validación de una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance para cuantificar al principio activo Ketorolaco Trometamina en materia prima, partiendo de su estructura química, la cuál nos lleva a un primer paso para determinar una longitud o longitudes de onda a la cual es posible detectar bajo condiciones espectrofotométricas, es decir frente a la luz ultravioleta, lográndose así determinar que presenta 2 longitudes de onda a 267 nm y 336nm cada una partiendo desde diferente base química.

El principio activo es soluble en una mezcla de metanol y agua (1:1). Este diluyente nos permite identificar al Ketorolaco Trometamina frente a una fase móvil que contiene agua, metanol y ácido acético (55:44:1) a una longitud de onda de 254 nm a 30°C, utilizando una inyección de 100 uL.

Así bajo estas condiciones se ha desarrollado la validación cumpliendo con los parámetros de linealidad de estándar con su coeficiente de correlación de 0.999, de selectividad a 101.8% de pureza, repetitividad con valor de 1, reproductibilidad con valor de 0.05 y exactitud al 98.52%

SUMMARY

Ketorolac Tromethamine is a non steroid anti-inflammatory agent with an analgesic properties, indicated to reduce pain in short time and its action to inhibit the prostaglandin synthesis.

This work present the steps obtained during the development and validation of an analytic methodology for High Performance Liquid Chromatography to quantify the active principle Ketorolac Tromethamine both raw material and its tablets presentation.

To development analytic technical in necessary to review of criteria to explain then work conditions so wavelength, column kind and length, injection volume and temperature, each one were tried and demonstrated to permit close to the work object.

An method analytic without valid don't sure the quality and homogeny of analysis, so should conduce false value, then a quality control laboratory must valid obligatorily all the analytic methods of product which control, so was study the following validation parameters as linearity, selectivity, precision, accuracy and ruggedness to begin of development result, so carry out with each one of either parameters successfully

For this work used machine specialized how UV-vis spectrophotometer and Liquids chromatographic of variable and invariable wavelength that permit to carry out the general object, with the chromatographic following conditions: column Lichrosphere Rp 18 125 x 4 mm for inverse phase, detector 254 nm, temperature of 30°C and flow of 1.2 ml / min.

INDICE

INTRODUCCIÓN

I. MARCO DE REFERENCIA

1. MARCO TEORICO
 - 1.1. BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA
BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO
 - 1.2. PROPIEDADES DE LOS SOLVENTES
 - 1.3. CROMATOGRAFÍA
 - 1.4. SISTEMA HPLC
 - 1.5. VALIDACIÓN. DESARROLLO DE UN METODO CROMATOGRAFICO
2. CONCEPTUALIZACIONES GENERALES
3. ANTECEDENTES

II. ANÁLISIS DEL PROBLEMA.

1. CONTEXTUALIZACION Y SISTEMATIZACION DE LA PROBLEMÁTICA
2. DECLARACIÓN DEL PROBLEMA

III. OBJETIVOS

1. GENERALES
2. ESPECIFICOS

IV. HIPÓTESIS

1. GENERALES
2. ESPECIFICOS

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. DESARROLLO DEL SISTEMA PRELIMINAR.

5.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

5.1.2. ELECCIÓN DEL DETECTOR

5.1.3. ELECCIÓN DE LA COLUMNA

5.1.4. ELECCIÓN DE LA FASE MOVIL. REALIZACIÓN DE GRADIENTE
EXPLORATORIO

5.1.5. ELECCIÓN DEL FLUJO

5.1.6. ELECCIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN

5.1.7. ELECCIÓN DE LA TEMPERATURA

5.2. OPTIMIZACION DE LA TECNICA

5.2.1. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

5.2.2. CONCLUSIONES PRELIMINARES

5.3. VALIDACIÓN

5.3.1. OBJETIVO

5.3.2. ALCANCE

5.3.3. JUSTIFICACIÓN

5.3.4. CALIFICACIÓN OPERACIONAL DEL CROMATOGRAFO LIQUIDO

5.3.5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO

5.3.5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

- LINEALIDAD DE ESTANDAR
- LINEALIDAD DE MUESTRA

5.3.5.2. SELECTIVIDAD

- DISOLVENTE
- PLACEBO

- MUESTRA A CONDICIONES AMBIENTALES (25°C)

- MUESTRA ESTRESADA (40°C)

5.3.5.3. PRECISION

- REPETITIVIDAD

- REPRODUCTIBILIDAD

5.3.5.4. EXACTITUD

5.3.5.5. ROBUSTEZ

5.3.6. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

5.4. RESULTADOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

VI. DISCUSIÓN

VII. CONCLUSIONES

VIII. RECOMENDACIONES

IX. ANEXOS

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INTRODUCCIÓN

Ketorolaco trometamina es un agente antiinflamatorio no esteroide con una acción analgésica potente comparable con los opiáceos sin formar parte de estos, indicado para mitigar el dolor en corto tiempo y cuya acción la ejerce inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, actualmente se presentan bajo comprimidos, ampollas (vía intramuscular) y solución oftálmica.

Para garantizar la calidad tanto en el insumo Ketorolaco trometamina como en el producto final es necesario cumplir con requisitos de análisis validados y debidamente documentados.

Para este efecto existen Farmacopeas, que exponen diversos métodos para el cumplimiento de estos requisitos, pero no son aplicables en algunos laboratorios de análisis, debido a que no cuentan con los equipos, dispositivos y otros materiales así como también reactivos descritos en dichos métodos y técnicas, por los que urge la necesidad de optar por otros métodos y técnicas que satisfagan en un 100% los requisitos de calidad.

El objetivo general es desarrollar y validar una técnica analítica alternativa capaz de cuantificar por el método de Cromatografía Líquida de Alta Performance al principio activo Ketorolaco trometamina, para tal efecto se requieren tener consideraciones para ser utilizadas como herramientas que ayudarán a obtener un buen desempeño para cumplir con el objetivo trazado y estas con: Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio, propiedades de los Solventes, Sistema HPLC, validación y estudios de Estabilidad en Productos Farmacéuticos.

I. MARCO DE REFERENCIA

1. MARCO TEORICO

1.1. BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (B. P. M.)

Según Benítez Palomeque (1996:1), define a las Buenas Prácticas de Manufactura como el conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar las medidas oportunas para garantizar que los medicamentos posean calidad necesaria según el uso a que se destinen.

Este conjunto de medidas es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al personal, locales, maquinaria, instalaciones, materias primas, productos terminados, fabricación, control de calidad, documentación y expedición de especialidades.

Coincidiendo Owen (1996:110) define a las Buenas Prácticas de Manufactura como documentos de verificación de buen funcionamiento de los sistemas o sub sistemas, los cuales son descritos a través de especificaciones operacionales.

A continuación Benítez Palomeque (1996:29) propone los 10 mandamientos de las Buenas Prácticas de Manufactura que expresan bastante fielmente lo que significa su gestión y aplicación:

- Escribirás todos los procedimientos y normas.
- Seguirás los procedimientos escritos.
- Documentarás el trabajo con los registros correspondientes.
- Validarás los procedimientos.

- Diseñarás y construirás las instalaciones y equipos adecuados.
- Darás mantenimiento a las instalaciones y equipos.
- Serás competente (como resultado de educación, adiestramiento y experiencia).
- Mantendrás limpias las instalaciones y equipos.
- Controlarás la calidad.
- Formarás y examinarás al personal para el cumplimiento de todo lo anterior.

Para Benítez Palomeque (1996:63) la aplicación correcta de las BPM comienza por el primer mandamiento que indica que es preciso escribir todos los procedimientos, métodos, normas o técnicas que deben ser cumplidos en el laboratorio. Aparece, pues la necesidad de disponer de un soporte donde exponer la normativa correspondiente de una forma normalizada, para que todos los procedimientos sean redactados de una manera equivalente y siguiendo un mismo criterio. Ya sea una norma de muestreo de materias primas, un método de análisis, un procedimiento de limpieza o la validación de un proceso de fabricación, todo documento debe seguir una normativa uniforme de redacción, publicación, descripción y control.

BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO

Definición.

Describe los principios que rigen los procesos de organización y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la planificación y ejecución de los análisis de laboratorio para control de calidad, incluyendo registros, informes y procedimientos de estas actividades.

Paralelo BPM (Buenas prácticas de manufactura) vs BPL (Buenas prácticas de laboratorio)

BPM	BPL
Contiene requisitos de manejo de datos de fabricación	Requisitos estrictos de archivo de muestras y de control de datos. Contiene apartes sobre productos fuera de especificaciones y sobre reanálisis.
Requieren personal capacitado para cada una de las actividades y organizado en jefaturas de áreas o secciones.	Emplean QAU (unidades de aseguramiento de calidad) para organizar todo el programa.
Su objetivo es evitar los errores o confusiones y la contaminación	Buscan generar datos experimentales de calidad que se mantengan en el tiempo.
Se refieren tanto a la producción como a control de calidad	Cubren actividades de investigación y desarrollo.

Necesidades de las BPL.

Se hace necesario las buenas prácticas de laboratorio por los siguientes motivos:

- Negligencia en la observación de prácticas correctas en el laboratorio.
- Estudios invalidados por utilizar protocolos inadecuados.
- No hay una verificación sistemática de los informes.
- No hay revisión crítica de los datos.
- Experimentos mal diseñados o ejecutados descuidadamente.

- Personal técnico que no se ciñe a los productos
- Administración inadecuada de las sustancias.
- Entrenamiento deficiente.

Documentos exigidos por las BPL.

- Listado de la calificación o entrenamiento, experiencia y descripción del trabajo de cada miembro.
- Historial del mantenimiento y calificación de equipos y calibración de instrumentos.
- El compendio completo y actualizado de los procedimientos normalizados de operación.
- Plan de análisis: datos básicos, muestras y el informe final interno de cada análisis.
- Historial de todas las inspecciones y auditorias realizadas.

1.2. PROPIEDADES DE LOS SOLVENTES

Según Snyder y Kirkland (1997:247) una separación satisfactoria en cromatografía líquida depende de una gran parte de la compatibilidad de la fase móvil correcta a la columna y muestra. En vista del gran número de posibles solventes, la selección dependerá de las propiedades de éstos.

A diferencia de la cromatografía gaseosa (que utiliza como fase móvil un único gas), la cromatografía líquida utiliza fase móvil de dos o más componentes. Además el tipo de cromatografía elegido y los detectores disponibles impone ciertas condiciones en la selección de los líquidos que han de utilizarse, por lo cuál no es suficiente empezar con una o dos posibilidades solamente. Inicialmente hay que esperar que deban controlarse diversas variables y a continuación reducirlas de acuerdo con los requerimientos del problema específico de separación.

En adición Owen (1996:67) indica que el solvente ideal para la preparación de muestras debería disolver todos los tipos de compuestos, debería de ser no inflamable y no tóxico, y ser completamente transparente a todas las longitudes de onda. El agua destilada e aproxima al solvente ideal, pero no es aconsejable para muchos compuestos orgánicos apolares.

Además Owen (1996:69) aclara que los efectos de pH sobre el espectro de absorbancia pueden afectar el equilibrio entre la posición y absorción de las bandas en las moléculas. Por ejemplo, los indicadores de pH cambian visualmente el color a diferentes valores de pH. Si el espectro de la muestra en estudio es afectado por el pH, una solución reguladora, llamada también buffer, podría ser utilizada para controlar este parámetro. Además muchos de los buffers mismos exhiben significativa absorbancia, que puede afectar el rango de longitud de onda.

Snyder y Kirkland (1997:251) refiere que en muchos casos un detector fotométrico o refractómetro podría usarse debido a que es importante conocer tanto al menor longitud de onda al cual el solvente transmite luz y el índice de refracción del solvente.

Los solventes altamente purificados presentan mínimas longitudes de onda de acuerdo a su propiedad (ej. Acetonitrilo: 190 nm, metanol: 380 nm), trazas de impurezas pueden incrementar éstas longitudes en 50 o 100 nm. Por ejemplo hidrocarburos similares al n-hexano son transparentes debajo de 190 nm, pero algunos solvente presentan porcentajes pequeños de compuestos de similar puntos de ebullición (ej. 1-hexeno). Esta contaminación es suficiente para que el solvente se opaque a menos de 260 nm.

Polaridad de la fase móvil.

Es la habilidad de una muestra o solvente de interactuar bajo una de las cuatro formas: dispersión, fuerzas dipolo, puentes de hidrógeno o interacciones dieléctricas.

La selección de la fase móvil se efectúa convenientemente con la ayuda de la llamada escala de Hildebrand, que clasifica los diferentes líquidos utilizados como fase móvil de acuerdo con un parámetro e° , que indica la fuerza como disolvente, estos valores son relativos al pentano, al cuál se le asigna valor cero.

Los líquidos normalmente utilizados son: acetonitrilo, metanol, agua, isooctano, hexano, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, isopropanol y n-propanol. De todo ellos, los cinco primeros pueden obtenerse con una gran pureza que da lugar a transparencia en UV hasta longitudes de onda muy bajas. Por otra parte, mediante el mezclado de los disolventes mencionados pueden obtenerse fases móviles de cualquier polaridad.

En la siguiente tabla se presenta una escala para determinados líquidos:

PROPIEDADES DE ALGUNAS SUSTANCIAS UTILIZADAS COMO FASE MOVIL.

Solvente	e°	PM	UV	Observaciones
2-propanol	0.82	60.1	210	Más viscoso que el metanol
Acetato de etilo	0.58	74.08	260	No ideal en UV.
Acetona	0.56	75.08	330	Barato, buen disolvente. No en UV
Acetonitrilo	0.65	41.06	190	Caro. Ideal.
Acido acético	Alta	60.05	--	Aditivo ácido. Util
Agua	Alta	18.02	--	Disolvente universal
Benceno	0323	78.12	280	No ideal en UV.
Cloroformo	0.40	119.39	245	No ideal en UV.
Dietilamina	0.63	73.14	275	Limitaciones en UV
Dimetilsulfóxido	0.62	78.13	--	Viscoso.
Dioxano	0.56	88.11	220	Para una buena detección en UV.
Etanol	0.88	46.07	210	Más viscoso que el metanol.
Metanol	0.95	32.04	205	Barato, excelente solvente
Metil etil cetona	0.51	72.11	330	No ideal en UV.
N-hexano	0.01	86.17	200	Muy bueno en UV.
N-pentano	0.00	72.15	210	Bajo punto de ebullición.
Tetracloruro de carbono	0.18	153.80	265	Bastante viscoso.
Tetrahidrofurano	0.45	72.10	215	Problemático: forma peróxidos.
Trietilamina	--	101.10	--	Carácter básico.

Datos tomados de la tabla publicada en P.A. Bristow: L. C. In practice, HETP, Inc, Wilmslow, 1976

UV: límite inferior de transparencia UV mm. Longitud de onda por debajo de la cuál los líquido dejan de ser transparentes a la radiación ultravioleta

1.3. CROMATOGRAFÍA

CLASIFICACION.

1. Según la naturaleza de la fase móvil.
 - 1.1. Cromatografía gaseosa
 - 1.2. Cromatografía líquida
 - 1.1.1. Capa fina (CCF)
 - 1.1.2. Columna (CC)
 - 1.1.3. Líquida de alta performance. (HPLC)
2. Según la naturaleza de la fase estacionaria.
 - 2.1. Líquido- líquido (CLL)
 - 2.2. Gas – líquido (CGL)
 - 2.3. Gas – sólido (CGS)
3. Según el fenómeno dentro de la columna
 - 3.1. Cromatografía de afinidad
 - 3.1.1. De fase normal
 - 3.1.2. De fase ligada
 - 3.1.3. De intercambio iónico
 - 3.2. Cromatografía por tamaño molecular

Cromatografía líquida (LC)

Según la Farmacopea Británica (2010: Apéndice III. A152) la cromatografía líquida se caracteriza principalmente por que la fase móvil es una líquido, puede desarrollarse bajo diferentes sistemas en función de la forma física de la fase estacionaria, pudiendo ser ésta última en forma de capa o empaquetadura en columna.

Además, Snyder y Kirkland (1997:2) sostienen que la Cromatografía líquida es una versión de la cromatografía, la técnica analítica más ampliamente utilizada. Los procesos cromatográficos tiene lugar como resultados de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

Adicionalmente, la Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2273) indica que en cromatografía líquida, un desarrollo óptimo se produce cuando la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra a ensayar a través del lecho de la fase estacionaria. Durante el trayecto las distintas moléculas de la muestra son retardadas por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra, la fase móvil. Estas interacciones son selectivas, lo cuál significa que para un determinado sistema de fase estacionaria – fase móvil serán diferente para cada componente de la muestra.

Curva gaussiana.

Según la Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2278) el soluto se aplica al frente de la columna en forma de banda muy delgada. Al eluirse de un extremo al otro la banda del soluto se va ensanchando. Este proceso se debe a diferentes razones relacionadas fundamentalmente con la lentitud del proceso de equilibrio entre las dos fases y con la difusión longitudinal. Debido a esta expansión de la banda, mientras la concentración del soluto de la banda inicial (inyector) es uniforme, posteriormente sigue, en el caso ideal, un perfil de distribución normal; como resultado de todo ello, el registro de la concentración en función del tiempo a la salida de la columna da lugar a un pico cuya forma es la curva gaussiana.

Características del pico cromatográfico.

Para la Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2278-2279) un pico cromatográfico corresponde de manera ideal a una curva de distribución normal, dicha curva se caracteriza por su desviación estándar. La anchura del pico, en cualquier punto puede expresarse en forma de múltiplo de la desviación estándar.

Las siguientes tres anchuras son las más útiles en cromatografía líquida:

- Anchura de la base del pico, que se obtiene trazando las tangentes en los puntos de inflexión y midiendo la longitud de la línea de base que queda comprendida entre los puntos donde la cortan las tangentes.
- Anchura del pico medida al 50% de la altura total o anchura del pico a media altura.
- Anchura del pico en los puntos de inflexión, medida en los puntos de inflexión, es decir a una altura igual al 60.7% del total

Los otros dos valores característicos en un pico cromatográfico son el área y la altura.

- Área de pico, o la integral bajo la curva, es proporcional a la cantidad de soluto, o su concentración según sea el modo de detección, y por lo tanto se utiliza para la cuantificación del análisis cromatográfico.
- Altura del pico, se mide en su punto máximo y corresponde a la máxima concentración de la zona. Tener presente que el tiempo de retención se mide en este punto.

La altura del pico es proporcional a su área y en casos ideales (o en primera opción) puede utilizarse para la cuantificación de un cromatograma. Puesto que los picos de un cromatograma solamente en casos ideales se corresponden exactamente a curvas de distribución gaussiana, es preferible utilizar valores de las áreas cuando se desee cuantificar.

Definiciones.

La Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2800-2281) describe los siguientes:

- *Tiempo de retención (tr)*.- Es el tiempo que permanece la muestra en la columna. Se mide desde el punto de inyección hasta el pico máximo. Es característico de la muestra y del tipo de empaque de la columna a una temperatura dada. Puede utilizarse para ayudar a identificar el pico.

- *Tiempo muerto (tm)*.- Es el tiempo que demora en atravesar el sistema cromatográfico un compuesto no retenido, es decir que no interactúa con el soporte ni con el eluyente cromatográfico.

- *Tiempo de retención corregido (tr')*.- Es el tiempo que le toma al analito interactuar entre las fases. Equivale al tiempo de retención menos el tiempo muerto.

$$tr' = tr - tm$$

- *Línea de base*.- Corresponde al nivel de respuesta al detector que tiene un eluyente cromatográfico. Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elusión de la fase móvil, sin señal debida al soluto.

- *Ancho de base (Wb)*.- Es el ancho de la base del pico cromatográfico medido al trazar las tangentes al pico que interceptan la línea de base.

- *Ancho medio de pico (Wh)*.- Es la medida del ancho de pico a la mitad de la altura del pico cromatográfico.

- *Factor de capacidad (k')*.- Es la expresión del grado de retención del analito en forma individual. Se expresa como el cociente entre la concentración del analito en la fase estacionarias respecto a la concentración del mismo en la fase móvil.

- *Selectividad (s)*.- Es la relación entre los factores de capacidad de dos compuestos que se eluyen en un mismo sistema cromatográfico, e indica si existe o no separación entre ellos.

$$s = k'2 / k'1$$

- *Eficiencia (N)*.- Mide el poder separativo de una columna en función del número de platos teóricos.

$$H = L / N$$

Donde:

H es la altura equivalente de plato teórico (HEPT)

L es la longitud de la columna

N es el número de platos teóricos.

- *Resolución (R)*.- Es la expresión cuantitativa de la calidad de la separación, se calcula por cada par de picos adyacentes.

$$R = 2 (t2 - t1) / (wb2 - wb1)$$

- *Asimetría del pico (As)*.- Mide la desviación del pico con respecto a la curva gaussiana medido a 5% de la altura de la base.

$$As\ 5\% = b' / a'$$

Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

Para la Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2278) la cromatografía Líquida de Alta Performance es una técnica basada en la separación de analitos de una solución en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación es llevada a cabo por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico dependiendo de las fase estacionaria a usar. La Cromatografía Líquida de Alta Performance tiene

distintas ventajas en relación a la cromatografía gaseosa, por ejemplo por analizar compuestos orgánicos.

Los compuestos a analizar son disueltos en un solvente determinado, muchas de éstas separaciones son realizadas a temperatura ambiente, así muchas drogas siendo no volátiles o no termoestables pueden cromatografiarse sin descomposición en otros derivados volátiles.

1.4. SISTEMA HPLC

RESERVORIOS DE FASE MOVIL.

Según Snyder y Kirkland (1997:88-89) los reservorios de solventes pueden tener como mínimo 500 ml de fase móvil para un análisis cromatográfico, pero pueden requerirse más volumen para otras aplicaciones. Estos reservorios son hecho de vidrio o de acero inoxidable.

La fase móvil debe estar homogenizada, es decir que los solventes se encuentren distribuidos proporcionalmente en todo el reservorio. La desgasificación es usada para eliminar gases disueltos en la fase móvil y reducir la posibilidad de microburbujas formadas en la bomba o detector durante la separación cromatográfica. La eliminación de oxígeno es también importante para prevenir reacciones con la fase móvil y/o fase estacionaria dentro de la columna. Debido a que las oportunidades de cambio resulta de la evaporación u oxidación, es recomendable el uso de fase móvil reciente para obtener una óptima separación.

BOMBA.

Para Snyder y Kirkland (1997:90-91) la función principal de la bomba o sistema contador en la cromatografía líquida es proveer un constante y reproducible abastecimiento de fase móvil a la columna. Debido a que las pequeñas partículas usadas para empaquetar las columnas cromatografías modernas proveen una sustancial resistencia al flujo a través de la columna, se requiere las bombas de alta presión para optimizar un flujo constante a través de ella. Las bombas en cromatografía líquida son requeridas para trasladar solventes a la columna a una tasa de flujo precisa, con un relativo rendimiento libre de pulsaciones y una presión por encima de los 5000 psi

Los requerimientos para un sistema de bombeo analítico moderno en cromatografía son:

- El sistema debe estar hecho de material químicamente resistente a la fase móvil.
- Debe ser capaz de rendir por lo menos 500 psi, preferentemente 5000 psi.
- Debe ser libre de pulsaciones.
- Debe de tener un flujo al menos de 3 ml/min.
- Debe trasladar la fase móvil con una reproducibilidad menor al 1%.

Las especificaciones de la función de la bomba más importante incluyen: repetitividad, precisión, pulsaciones o ruido de la bomba, ruido y exactitud,

Existen dos tipos disponibles de sistemas de bombas, aquellos que trasladan esencialmente flujos constantes y aquellos que trasladan a presión constante.

INYECTOR.

La introducción de la muestra puede llevarse a cabo de diferentes maneras. El método más simple consiste en la inyección a través de un septum con la ayuda de una microjeringa. Esta introducción, presenta problemas derivados fundamentalmente de la alta presión de la fase móvil. En consecuencia en los equipos de cromatografía líquida más sofisticados se han incorporado mecanismos en los que la introducción de la muestra

se lleva a cabo con al ayuda de válvulas de diversos tipos.

En la cromatografía líquida, las muestras líquidas se pueden inyectar directamente y las muestras sólidas deben disolverse en algún disolventes. El disolvente no debe ser necesariamente el líquido usado como fase móvil, aunque con frecuencia se elige el mismo para evitar interferencias en el detector, así como interferencias columnas-componentes. La cantidad de muestra necesaria puede variar bastante. Los detectores muy sensibles permiten con frecuencia el uso de muy

pequeñas cantidades de muestra, con lo que se logra una mayor eficacia de la columna. Puede apreciarse que en general, la cromatografía líquida requiere muy poca preparación de la muestra, puesto que los componentes no deseados, así como los que puedan interferir la determinación, suelen poder eliminarse mediante detección selectiva.

COLUMNA.

Según Snyder y Kirkland (1997:172-173) las columnas cromatográficas son consideradas el corazón de la cromatografía líquida modernas por cuanto es aquí en donde se produce la separación de los analitos.

Las columnas utilizadas tienen comúnmente una longitud de 25 a 50 cm. y están rellenas de partículas de diámetro interno muy pequeño (5 – 15 μm). El diámetro interno de las columnas está generalmente comprendido entre 2 y 5 mm. considerado como el óptimo para la relación entre capacidad de muestra, consumo de fase móvil, velocidad y resolución.

Como indica Snyder y Kirkland (1997:183) una gran variedad de columnas están disponibles para ayudar con éxito a la cromatografía líquida, la cuál clasificaremos como empaquetaduras compuestas de: micropartículas y pre empaquetaduras para cromatografía líquido-líquido y líquido-sólido, micropartículas para fase reversa, micropartículas para cromatografía de intercambio iónico, micropartículas para cromatografía por tamaño de exclusión, películas para cromatografía de adsorción y líquido-líquido, películas para cromatografía de partición.

En general una columna en cromatografía líquida tiene una duración razonable y cabe esperar una larga vida de servicio útil, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecas destructivas, como por ejemplo, con eluyentes extremadamente ácidos o básicos, o bien con inyecciones continuas de muestras crudas o biológicas "sucias".

DETECTOR.

Según la Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2279) en la actualidad los equipos de cromatografía líquida utilizan los detectores ópticos. En estos detectores se hacen pasar la corriente líquida a través de una microcubeta de pequeño volumen (aproximadamente 10 uL), donde la atraviesa un rayo de luz. Las variaciones en la intensidad causadas por la absorción UV, emisión de fluorescencia o cambio en el índice de refracción (según el tipo de detector utilizado), que resultan de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta, se registran en forma de variaciones del voltaje de salida.

Estas variaciones de voltaje se registran gráficamente en un registrador, si bien en muchas ocasiones se suministran a un integrador o computador que proporcionan tiempos de retención y áreas de los picos. El detector más usado en cromatografía líquida es el de adsorción ultravioleta. Un detector de este tipo, de longitud de onda variable, capaz de controlar desde 190 a 800 nm, resulta adecuado para la detección de casi todas las muestras.

SISTEMA DE REGISTRO.

Uno de los aspectos definidos por las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) es la documentación. Con respecto a los parámetros analíticos, la documentación deberá estar hecha sobre pruebas reproducibles.

En funciones cromatográficas, debemos tener en cuenta: Adquisición de datos, integración de picos, identificación de picos, cálculos de concentración de picos y generación de reportes.

1.5. VALIDACIÓN

DESARROLLO DE UN METODO CROMATOGRAFICO

El desarrollo de los métodos de cromatografía líquida se ha basado durante años en laboriosos ensayos de búsqueda de disolventes en diferentes columnas. En estos primeros estadios de aprendizaje de la técnica, este proceso de prueba y error puede ser frustrante. Esta pérdida de tiempo y de disolventes es innecesaria en la mayoría de veces, sin embargo para los analistas contemporáneos no siempre está claro el orden a seguir en las diferentes etapas que permiten establecer las condiciones de un método eficiente.

A continuación se va a describir un plan general sistemático para que el analista obtenga un buen método cromatográfico, teniendo presente que así es posible reducir en forma apreciable el tiempo para este fin.

1. Elección de la fase móvil.

En primer lugar es necesario seleccionar los posibles disolventes a utilizar como fase móvil, es necesario conocer que el tipo de cromatografía elegido y los detectores disponibles imponen ciertas condiciones en la selección de los líquidos que han de utilizarse en la composición de la fase móvil.

En la tabla perteneciente a las propiedades de algunos líquidos se detallan algunas características a conocer para su selección; pero también es importante tener a la mano datos como la viscosidad, índice de refracción, densidad y punto de ebullición.

Resulta obvio que no puede utilizarse como fase móvil un líquido en el cuál sea totalmente insoluble a la muestra a analizar. Por lo tanto el procedimiento sistemático

de selección debe empezar por la determinación de la solubilidad de la muestra en varios de los disolventes normalmente usados. Esta evaluación de las solubilidades es esencial para evitar que una fase móvil pueda precipitar en el instrumento a toda la muestra o parte de ella. La evaluación no resulta completa si no se ensaya también la estabilidad de la muestra en el disolvente.

2. Elección de la fase estacionaria

La elección de la fase estacionaria es una cuestión muy compleja y depende de varios factores, como las características y complejidad de la muestra, así como del tipo de separación elegido. Cuando el analista se enfrenta a un nuevo problema de separación siempre es muy importante revisar la literatura para averiguar si el mismo tipo de muestra ya ha sido analizado anteriormente. Aún en el caso que una copia directa de los parámetros analíticos publicados en la literatura no proporcione resultados adecuados (debido a que las muestras no son exactamente iguales), si proporciona un buen punto de partida para posteriores ajustes.

3. Elección de las dimensiones de la columna.

Las dimensiones variables de la columna son el diámetro y la longitud, la mayoría de las columnas de HPLC disponibles hoy en día tiene un diámetro de 2.0 – 2.6 mm. o de 2.6 – 5.0 mm. La elección dependerá si: se trata de un análisis de trazas o muestras cuyos componentes están a concentraciones mayores o la separación tiene como finalidad la obtención de fracciones o de un registro de las separaciones con propósitos cualitativos o cuantitativos.

La elección del diámetro de la columna dependerá de la concentración de un componente en el efluente y del volumen de la fase móvil que debe consumirse en un

análisis, todo lo cuál puede relacionarse con el caudal o más correctamente con la velocidad de la fase móvil.

Un proceso cromatográfico está en función de la velocidad lineal de la fase móvil, es decir la velocidad a la cuál pasa a través de la columna. Diversos parámetros cromatográficos, como eficacia y presión de la columna, tiempo de retención y resolución, son función de esta velocidad lineal. La propia velocidad lineal de la fase móvil es función del caudal volumétrico (ml/min.) de la fase móvil y del diámetro de la columna. Una consideración importante es la sensibilidad como en el caso del análisis de trazas, los componentes deberán eluirse en el mismo volumen de disolvente posible, por ello será preferible una columna de menor diámetro posible.

Para un manejo adecuado de las columnas es necesario tener presente algunas consideraciones que permitirán tener operativa la columna por mayor tiempo, además de evitar que agentes externos puedan influenciar en su operatividad. La mayoría de las columnas se expenden con tapones en ambos extremos, estos están formados de una tuerca y un precinto de PTPE (teflón) estando diseñados para conservar húmeda la columna y mantener la estructura del relleno durante el almacenamiento. Hay que asegurarse siempre que el flujo de la fase móvil vaya en la dirección indicada en la columna. Si hay que guardar la columna durante toda la noche o períodos más largos debe purgarse con agua de cualquier solución tampón y someterlas con acetonitrilo o metanol o mezclas de acetonitrilo-agua o metanol-agua para evitar posibles colonias de bacterias. Si se desea que la columna sólo contenga agua, ésta debe contener un 0.02% de azida sódica para inhibir el crecimiento.

4. *Elección del detector.*

El detector de uso más corriente es esencialmente un espectrofotómetro UV que puede trabajar a una longitud de onda fija (normalmente 254nm) o bien permitir la selección de la longitud de onda dentro de un intervalo determinado. Si se conocen las propiedades de los compuestos a separar, la elección del detector y de la longitud de onda resulta relativamente sencilla. Si los compuestos absorben dentro del intervalo del detector, se escoge esta longitud de onda. Naturalmente, lo mejor es conocer el espectro UV de los componentes de la muestra ya que así se puede operar en las condiciones óptimas. También resulta conveniente el uso de información bibliográfica ya que muchas veces es posible elegir la longitud de onda apropiada basándose en el trabajo efectuado por otros analistas en compuestos similares.

Si se pose poca información acerca de la muestra, es necesario utilizar un detector de tipo universal. La longitud onda variable en UV lejano (190 – 210 nm.) puede usarse, pero ésta tiene su limitación respecto a los líquidos que pueden utilizarse como fase móvil.

VALIDACION

Indica Benítez Palomeque (1996:383) que dentro de las gestiones que un laboratorio de análisis debe realizar para garantizar la calidad de sus procedimientos de control y, en definitiva, de su propio funcionamiento en general, se encuentra la de validar los métodos analíticos. En efecto, la práctica analítica diaria exige una absoluta seguridad en los procedimientos de análisis, de la misma manera que es necesaria una completa garantía de que el instrumental que se utiliza en el desarrollo del método está perfectamente calibrado. Un método analítico sin validar no asegura la calidad y homogeneidad de los análisis correspondientes y, en consecuencia, puede conducir a

valores falsos o erráticos, que comprometan la calidad de una materia prima o de un lote de producción, que obliguen a reprocesarlos innecesarios, etc.

La Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:2281) describe a la validación de un método analítico como el proceso por el cuál, mediante estudios de laboratorio, se cumplen los requerimientos para su aplicación analítica para lo cual ha sido desarrollada.

Las características de desempeño analítico que son consideradas en esta validación son las siguientes: Linealidad, selectividad, precisión, exactitud y robustez.

1. Linealidad

Linealidad de un analito es la capacidad de mostrar resultados que son directamente, o por fórmulas matemáticas bien establecidas, proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido.

Un rango de un método analítico es un intervalo entre el nivel más alto y más bajo (incluyendo esos valores) determinados y demostrados adecuadamente por una técnica analítica. Este rango es validado verificando que el método provee de manera aceptable cada una de las características de desempeño analítico.

La linealidad para una técnica analítica se demuestra realizando bajo dos sistemas:

1.1. Linealidad del estándar

El estándar a usar tendrá que ser grado USP o en su defecto un estándar secundario, es decir que haya sido dosado frente a un estándar U.S.P. Se preparan 5 muestras estándar de distintas concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, cada una preparada por duplicado como mínimo, bajo las mismas condiciones.

1.2. Linealidad de la muestra.

La muestra tendrá que ser una forma farmacéutica del mismo principio activo. Se preparan 3 muestras a distintas concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, cada una preparada por duplicado como mínimo, bajo las mismas condiciones.

Un ensayo satisfactorio resultaría que las concentraciones son directamente proporcionales a los resultados obtenidos (porcentajes en los estándares y concentración farmacéutica para las muestras). Una gráfica de dos ejes revelaría la linealidad del sistema.

2. Selectividad.

Se define como la habilidad de la técnica analítica para detectar únicamente la presencia del analito y no otros componentes distintos al principio activo tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. Esta característica asegura la identidad del analito. Para desarrollar esta prueba se ensayan con dos muestras sin principio activo, una de ellas recibe el nombre de placebo, es decir contiene la matriz (excipientes), y la otra son todos los disolventes que se usarán en la técnica analítica. Paralelamente se trabaja con la forma farmacéutica bajo dos condiciones: una de ellas recientemente preparada y la otra a condiciones de estrés, es decir la muestra sometida a una temperatura de 40°C. por el tiempo de 12 meses.

Un ensayo satisfactorio resultaría que la técnica, tanto para el placebo como para el disolvente, no reproduzca algún componente a la longitud de onda propuesta, además para la muestra a condiciones normales y de estrés se deben de desarrollar completamente proporcionando resultados de dopaje dentro de la especificación pre establecida.

3. *Precisión.*

La precisión de un método analítico se define como el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea.

La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa. La precisión puede ser medida ya sea por medio del grado de reproductibilidad o de repetitividad del método analítico bajo condiciones operativas normales.

3.1. *Reproductibilidad*

Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, la precisión expresa la variación dentro del mismo laboratorio en diferentes días, y con diferentes analistas y equipos.

3.2. *Repetitividad.*

Se refiere al uso del procedimiento analítico dentro del laboratorio durante un período corto, en el que se emplea al mismo analista con el mismo equipo. En la mayoría de los casos la repetitividad es el criterio de mayor preocupación en los procedimientos analíticos.

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, que permita una estimación estadísticamente válida de la desviación estándar relativa. En este contexto las valoraciones son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo sujetos al procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final de la muestra.

4. *Exactitud.*

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analito.

Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos, y que es verdadero para todos los fines prácticos.

La exactitud de un método analítico puede determinarse mediante la aplicación del método a muestras o mezclas de excipientes a las que se agregan cantidades conocidas del analito, tanto por encima como por debajo del nivel normal previsto. A partir de los resultados, se calcula la exactitud como el porcentaje del analito recuperado por medio de la valoración.

5. *Robustez*

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer no afectado por variaciones pequeñas, pero no premeditadas, en los parámetros del método y proporcionar una indicación de su confiabilidad.

2. CONCEPTUALIZACIONES GENERALES.

- *Analito*. Aquella estructura química que es sometida a una separación y detección de otros compuestos, generalmente es aquella que presenta una acción farmacológica.
- *Bomba*. Impulsa la fase móvil proveniente del reservorio del solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna.
- *Buenas Prácticas de Laboratorio*. Describe los principios y ejecución de los análisis de laboratorio para control de calidad, incluyendo registros, informes y procedimientos de estas actividades.
- *Buenas Prácticas de Manufactura*. Conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique.
- *Columna*. Es el corazón de la cromatografía líquida moderna por cuanto es aquí en donde se produce la separación de los analitos.
- *Cromatografía líquida*. Método físico de separación en el cuál los componentes se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho.
- *Detector*. Los detectores monitorean la fase móvil y el diluyente de la columna y miden una propiedad química o física de la muestra, tal como la absorbancia o fluorescencia.
- *Diluyente*. Solvente o mezclas de solventes utilizado para extraer y/o disolver al analito.
- *Dosaje*. Es un criterio de evaluación de un principio activo en una forma farmacéutica.

- *Estándar.* Aquel reactivo o principio activo de reconocida calidad analítica.
- *Exactitud.* Corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero.
- *Fase móvil.* Mezcla de solventes que cumplen la función de separación de analitos en una columna.
- *Inyector.* Permite introducir la muestra sin interrumpir el caudal del solvente a través del sistema.
- *Ketorolaco Trometamina.* Agente antiinflamatorio no esteroideo que posee propiedades antipiréticas y analgésicas. Tiene como base la estructura química del ácido Pirrolizina carboxílico.
- *Línea de base.* Corresponde al nivel de respuesta al detector que tiene un eluyente cromatográfico, donde sólo se aprecia la elusión de la fase móvil, sin señal debida al soluto.
- *Linealidad.* Es la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.
- *Longitud de onda.* Unidad de medida del espectro electromagnético, comprende los rayos cósmicos, gamma, X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas, radar, televisión, ultrasónico.
- *Polaridad.* Es la habilidad de una muestra o solvente de interactuar bajo una de las cuatro formas: dispersión, fuerzas dipolo, puentes de hidrógeno o interacciones dieléctricas.
- *Potencia.* Es el grado de pureza de un principio activo o reactivo.
- *Precisión.* Es la relación de la dispersión de los valores alrededor de su valor medio.
- *Repetitividad.* Se refiere al uso del procedimiento analítico dentro del laboratorio durante un período corto, en el que se emplea al mismo analista con el mismo equipo.

- *Reproductibilidad.* Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, expresa la variación dentro del mismo laboratorio en diferentes días, y con diferentes analistas y equipos.
- *Robustez.* Indica el grado de confiabilidad del ensayo a cambios de variables comunes
- *Selectividad.* Es la propiedad del método de producir una señal medible debido solo a la presencia del analito.
- *Tiempo de retención.* Es el tiempo que permanece la muestra en la columna. Se mide desde el punto de inyección hasta el pico máximo.
- *Validación.* Es la confirmación y documentación que los resultados por el producidos son confiables.

SIGLAS UTILIZADAS.

- B.P. Farmacopea Británica
- B.P.L. Buenas Prácticas de Laboratorio.
- B.P.M. Buenas Prácticas de Manufactura
- H.P.L.C. Cromatografía líquida de Alta Performance.
- U.S.P. Farmacopea de los Estados Unidos

3. ANTECEDENTES.

Los siguientes estudios tienen relación con el presente trabajo:

1. El trabajo titulado “Desarrollo y validación de una técnica analítica para el dosaje de Fluconazol en tabletas por HPLC”, realizado por Br. William Guerra Bernal en el año 2003, tiene como objetivo desarrollar y validar un método analítico por HPLC aplicado para Fluconazol tabletas, preparando un método analítico alternativo de cuantificación cuyos patrones no existen en obras oficiales. Para esto procedió a explorar para definir las condiciones cromatográficas, luego inicia los análisis de evaluación de los parámetros de validación y lo demuestra experimentalmente. Concluye demostrando que es posible la separación del Fluconazol por HPLC, que la técnica analítica alternativa es lineal, exacta, recuperable al 100.14%, precisa, reproducible y selecta.

2. El trabajo titulado “Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación Cuantitativa de Cisaprida en tabletas” realizado por la Br. Roxana Romero Rodas en el año 2004, tiene por objetivo desarrollar la Validación empleando el método de HPLC y demostrar con datos experimentales y fórmulas estadísticas que el método analítico es confiable y reproducible. Para tal efecto se desarrollaron cada uno de los parámetros estipulados en la USP respecto a validación, empleando para tal fin un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución con certificado de validación vigente. Con los datos obtenidos se calcularon los valores medios; varianzas / desviación estándar; curvas de calibración, parámetros de la curva: por regresión lineal (ajuste por cuadrados mínimos) y test estadísticos, para demostrar que cada uno de los parámetros cumplan con los criterios de aceptación. Los datos obtenidos en la validación del método analítico permiten

establecer que el método es confiable, es decir se obtuvieron los resultados que cumplen con los parámetros establecidos en la USP.

3. El trabajo titulado “Determinación de Amoxicilina en leche cruda entera de vaca por HPLC” realizado por las Br. Rocío Santibáñez Acosta y Merlín Estrella Mandujano en el año 2003 tiene por objetivo demostrar la presencia o ausencia de Amoxicilina en muestras de leche entera de vaca por HPLC. Este estudio se da por el impacto negativo que tienen los residuos de antibiótico en los alimentos preferentemente infantil. Las muestras en estudio fueron obtenidas en el Centro ganadero Agroindustrial San Isidro (ASISA) y de Centros de Abastecimientos de Leche en Cañete. En ASISA se realizó el estudio preliminar con 9 muestras de leche de vaca tratadas con Amoxicilina y se recolectaron 15 muestras de leche en Centros de Abastecimientos que fueron analizados en los laboratorios de Control de Calidad de ILENDER y ENACO. La determinación y cuantificación de Amoxicilina a partir de la USP 25 adaptado para determinación de Amoxicilina, indica la desproteización con Acetonitrilo, la separación cromatográfica en fase reversa utilizando buffer isocrático y detectado a UV 230 nm; los resultados han sido comparados con los niveles normales permisibles (4ug/kg). Se concluye que las muestras superan los límites permisibles, así que se hace una reflexión sobre posibles errores en los procesos de control veterinario en vacunos.

4. El trabajo titulado “Desarrollo y Validación del Método Analítico para la determinación de Pseudoefedrina Clorhidrato e Ibuprofeno por HPLC en tabletas recubiertas” realizado por la Br. Gladys Albarracín Celis en el año 1999, tiene por objetivo desarrollar y validar dicho método utilizando bibliografías oficiales. Este trabajo

por contener 2 principios activos en mezcla involucra una propuesta para determinar en forma simultánea ambos principios activos. La necesidad de desarrollar un método analítico por HPLC parte del hecho que hasta el suplemento V USP 23 no existía uno para la mezcla en cuestión, el análisis se aplica individualmente, siguiendo técnicas espectrofotométricas y volumétricas que podrían ser relegados por equipos de última generación. Se concluye en este trabajo que es posible separar los principios activos, es aplicable al análisis de contenidos, y cumple con los parámetros de validación.

5. El trabajo titulado “Validación de método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC y estudio comparativo in vitro de las diferentes marcas del producto comercializado en el país”, realizado por los Br. Natalí Valdez Arana y Erick Cuadros Quiroz en el año 1999, es respaldado por suficientes datos de laboratorio que documentan la validez de este procedimiento estableciendo que las características del desempeño del método fue aplicado en la determinación del contenido de Loratadina tabletas de diferentes marcas que se comercializan en el país. Este estudio fue complementado con los ensayos de otros parámetros fisicoquímicos como: identificación de la variación del peso, desintegración, dureza, uniformidad de contenido, disolución del principio activo, los mismos que nos podrán orientar hacia la bioequivalencia del producto. Concluyen que el método cumple con la linealidad, es preciso, exacto, sensible, selectivo y específico, además los procesos de fabricación se hallan bajo control.

II. ANÁLISIS DEL PROBLEMA

1. CONTEXTUALIZACION Y SISTEMATIZACION DE LA PROBLEMÁTICA

FARMACOLOGÍA DEL KETOROLACO TROMETAMINA

Según Goodman & Gilman (1998:661) los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos conocidos y comercializados incluyen muy diversos compuestos que casi nunca tiene relación química alguna (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comparten algunas actividades terapéuticas y efectos colaterales. El compuesto prototípico sería el ácido acetil salicílico (aspirina) y en algunos señalamientos se les conoce como “fármacos similares a aspirina” pero el nombre más usado es el de antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Según Goodman & Gilman (1998:665) la mayor parte de los AINES son ácidos orgánicos, y a diferencia del ácido acetil salicílico constituyen inhibidores competitivos reversibles de la actividad de la ciclooxigenasa.

Según Goodman & Gilman (1998:683) el Ketorolaco trometamina es un potente analgésico, pero sólo moderada eficacia antiinflamatoria. Es uno de los pocos antiinflamatorios no esteroides aprobados para administración parenteral.

Propiedades Farmacológicas.

El Ketorolaco trometamina inhibe la biosíntesis de prostaglandinas; posee actividad antipirética, antiinflamatoria y analgésica, pero en cuantificaciones de inflamación, su actividad analgésica sistémica es mucho mayor que la antiinflamatoria. A diferencia de los agonistas opioides, el Ketorolaco trometamina no genera tolerancia, efectos de abstinencia ni depresión respiratoria. Posee también actividad

antiinflamatoria si se aplica directamente en el ojo. Inhibe la agregación plaquetaria. Ketorolaco Trometamina fue aprobado por la FDA para uso parenteral en 1989 y ser disponible para uso oral en 1993.

Farmacocinética y Metabolismo.

Después de ingestión o aplicación intramuscular, el Ketorolaco Trometamina se absorbe con rapidez y alcanza concentraciones plasmáticas máximas en 30 o 50 minutos.

La biodisponibilidad después de ingerido es de 80% en promedio. Está unido casi totalmente a las proteínas plasmáticas y se excreta con una vida media de eliminación de cuatro a seis horas.

Aplicaciones terapéuticas.

El Ketorolaco trometamina se utiliza contra el dolor pos-operatorio en vez de los opioides y se administra por vía intramuscular u oral. Las dosis intramusculares características son de 30 a 90 mg y las orales 5 a 30 mg. Quizá no convenga utilizar el fármaco en analgesia obstétrica. El Ketorolaco trometamina por vía oral se ha usado para combatir estados de dolor crónico, y en ellos al parecer es superior a la aspirina. El fármaco de aplicación local puede ser útil en cuadros inflamatorios del ojo y ha sido probado para el tratamiento de la conjuntivitis alérgica estacional.

Efectos tóxicos.

Los efectos colaterales surgen casi con el doble de frecuencia con ketorolaco trometamina que con placebo; incluyen somnolencia, mareos, cefalea, dolor gastrointestinal, dispepsia y náusea, así como dolor en el sitio de la inyección.

ANÁLISIS DEL PROCESO CRITICO

Una técnica analítica debe de estar validada, puesto que nos brinda seguridad que los resultados son confiables; específicamente me refiero al dosaje, es decir a la cantidad de principio activo en una determinada presentación farmacéutica.

Las técnicas analíticas de las áreas de Control de calidad se basan en la mayoría de los casos de bibliografías oficiales como son la Farmacopea de los Estados Unidos, Farmacopea Británica, Farmacopea Europea y Farmacopea Española, a menos que sea el caso, en que la casa matriz envíe sus propias técnicas analíticas; pero dichas técnicas analíticas han sido desarrolladas y validadas bajo instrumentos, equipos, materiales y repuestos a que nuestro mercado no provee, es decir no se cuentan en stock para adquirirlos por nuestros laboratorios, por esta razón es necesario desarrollarlas y validarlas a nuestras condiciones, siempre atendiendo a cumplir con los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura y Buenas Prácticas de Laboratorio.

2. DECLARACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es posible desarrollar y validar una técnica analítica alternativa para Ketorolaco Trometamina materia prima y tabletas por el método de Cromatografía Líquida de Alta Performance, que cumplan con los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura y Buenas Prácticas de Laboratorio?

III. OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar y validar una técnica analítica alternativa capaz de cuantificar por el método de Cromatografía líquida al principio activo Ketorolaco Trometamina materia prima y su presentación en tabletas.

ESPECIFICOS

- Desarrollar una técnica analítica para la cuantificación del principio activo Ketorolaco Trometamina alternativa cumpliendo con cada uno de los ensayos requeridos en equipos de alta precisión (Espectrofotómetro UV-VIS y HPLC) en forma planificada y secuencial, utilizando los conocimientos teóricos y la experiencia al respecto.
- Validar la técnica analítica propuesta bajo los parámetros que indica la Farmacopea de los Estados Unidos.
- Seleccionar la alternativa más eficaz en relación a los costos operativos referente al análisis en Control de Calidad, es decir los reactivos, materiales, tiempo de uso de equipos y las horas de trabajo del analista.

IV. HIPÓTESIS

GENERAL

Es factible realizar el desarrollo y validación de una técnica analítica alternativa capaz de cuantificar por el método de Cromatografía líquida al principio activo Ketorolaco Trometamina materia prima y su presentación en tabletas.

ESPECIFICAS

- Es factible el desarrollo de una técnica analítica para la cuantificación del principio activo Ketorolaco Trometamina alternativa cumpliendo con cada uno de los ensayos requeridos en equipos de alta precisión (Espectrofotómetro UV-VIS y HPLC) en forma planificada y secuencial.
- Es posible validar la técnica analítica propuesta bajo los parámetros que indica la Farmacopea de los Estados Unidos.
- Es factible seleccionar alguna alternativa que sea la más eficaz en relación a los costos operativos referente al análisis en Control de Calidad.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. DESARROLLO DEL SISTEMA PRELIMINAR

KETOROLACO TROMETAMINA MATERIA PRIMA.

Características Físicas de Ketorolaco Trometamina. Según Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009), Index Merck (1996):

- Polvo cristalino blanco.
- Punto de Fusión : 160° - 165°C.
- Sensibilidad a la luz.
- Soluble en metanol, agua, ácido acético glacial y etanol.
- pH: 5.7 – 6.7, en una solución preparada al 1% en agua destilada.
- Pérdida por secado: Máximo 0.5% sometida a vacío por 3 horas a 60°C.
- Valoración: 98 – 102% sobre la sustancia seca.
- Pureza cromatográfica: Cumple requisito USP 32

Características Químicas de Ketorolaco Trometamina. Según Farmacopea de los Estados Unidos 32 (2009:1058), Index Merck (1996):

- Nombre Químico: 1H-pirrolizina- 1-ácido carboxílico,5-benzoil-2,3dihidro,(+/-)-
- Fórmula Química: C₁₅ H₁₃ NO₃ . C₄ H₄ NO₃
- Familia Química: Compuesto derivado del ácido Pirrolizin Carboxílico.
- Identificación: Positiva versus estándar, bajo el espectro de luz infrarroja.
- Metales pesados: Máximo 0.002%
- Impurezas Orgánicas Volátiles: Cumple los requerimientos de la USP 32.
- Residuo de Ignición: Máximo 0.1%

KETOROLACO TROMETAMINA. Según Farmacopea de los Estados Unidos 32
(2009:1059-1060)

- Aspecto : Tabletas redondas biconvexas color anaranjado, ranurada.
- Peso : 206 mg / tableta (90 – 110%)
- Dureza : Mayor a 3 Kp.
- Desintegración : Máximo 15 minutos en agua a 37°C.
- Friabilidad : Máximo 1%
- Dosaje : 10 mg / tableta
- Acción : Antipirético y analgésico.

Reactivos.

Se listan los precios de los reactivos comúnmente más utilizados.

Estos son valorizados en dólares por litro de reactivo.

- Metanol HPLC : 4.50
- Cloroformo : 7.75
- Acido acético glacial : 8.00
- Tolueno : 8.80
- Acetonitrilo HPLC : 10.25
- Etanol HPLC : 17.60
- Benceno : 27.20
- Tetracloruro de carbono : 34.00
- Tetrahidrofurano HPLC : 36.00
- Dioxano : 97.00

Equipos.

- Cromatógrafo líquido marca Hewlett Packard modelo 1050 / 1100, bomba cuaternaria modelo 79852A, detector ultravioleta VWD modelo G1314A, horno de columna, inyector automático, estación de trabajo e impresora.
- Cromatógrafo líquido marca Hewlett Packard modelo 1100 Ti / 50, bomba cuaternaria modelo G1311A, detector ultravioleta VWD modelo G1314A, horno de columna, inyector automático, estación de trabajo e impresora.
- Cromatógrafo líquido marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de diodos, bomba cuaternaria modelo G1311A, horno de columna, inyector automático, estación de trabajo e impresora.
- Espectrofotómetro UV-Vis
 Marca. Perkin Elmer
 Modelo. Lambda 2
- Agitador mecánico
 Marca. Burrell.
 Modelo. 75.
- Agitador magnético múltiple.
 Marca. Lab. Line.
 Modelo. 1278-1
- Bomba de vacío

Materiales.

- Fiolas ámbar x 25, 50, 100, 500 y 1000 ml.
- Beakers x 50, 500 y 1000ml.
- Pipetas volumétricas x2, 5, 10, 15, y 25 ml.

- Pipetas graduadas x 5 y 10 ml.
- Viales y tapas cromatográficas.
- Magnetos para agitación
- Filtros 22 um

Estándares de referencia.

- Estándar primario USP: Ketorolaco trometamina USP

CAS number : 74103-07-04

RTECS number : UY7759900

- Estándar secundario.

Ketorolaco trometamina materia prima.

Potencia tal cual : 99.87%

Lote : 1088001002

Ketorolaco trometamina materia prima.

Potencia tal cual : 100.87%

Lote : 1088001002

CONSIDERACIONES TEORICAS DE KETOROLACO TROMETAMINA.

Para lograr el objetivo de desarrollar una técnica que pueda cuantificar el principio activo Ketorolaco trometamina es necesario tener presente las características espectrofotométricas de la molécula, así como de los posibles solventes que intervendrán.

Para empezar se estimará a qué longitud de onda es posible detectarla, esto mediante el siguiente procedimiento:

- Se determina la estructura base de la molécula Ketorolaco trometamina:
Acido Pirrolozin carboxílico, tener presente que también se puede considerar a este principio activo como un derivado aromático carboxílico.
- Pretsch (1980:U20, U25, U40 y U45) hace referencia a la regla de Scott para la estimación de la posición de la banda K “Absorción de derivados carbonílicos aromáticos” (utilizando alcohol etílico como disolvente) y a las reglas de Woodward “absorción UV de derivados carbonílicos alfa, beta-insaturados”, las cuales nos muestran longitudes de onda para algunos grupos funcionales, así como dobles enlaces en cualquier posición y sustituyentes de distinto peso molecular:

Derivado carboxílico aromático	:	246 nm.
Por cada nuevo enlace conjugado	:	+ 30 nm.
Derivado carbonílico alfa y beta-insaturados	:	207 nm.

Considerando al ácido Pirrolozin carboxílico como base tendremos una longitud de onda estimada de 267nm., debido a que la molécula presenta 2 dobles enlaces conjugados ($207 + (2 \times 30) = 267$)

Considerando como base a un derivado aromático carboxílico, tendremos una longitud de onda estimada de 336nm, debido a que la molécula presenta 3 dobles enlaces ($246 + (3 \times 30) = 336$)

5.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se realiza ensayos de solubilidades del principio activo utilizando una cantidad de 100 mg. y adicionándole 5 ml. de distintos solventes o mezclas de solventes, según la siguiente tabla:

Solvente o mezcla de solventes	Resultado de solubilidad
1. Metanol	Soluble al 2%
2. Agua	Soluble al 2%
3. Acetonitrilo	Insoluble al 1% y 2%
4. Etanol.	Soluble al 2%
5. Acido acético glacial.	Soluble al 2%
6. Tetrahidrofurano	Insoluble al 1% y 2%
7. Metanol / agua (1:1)	Soluble al 2%
8. Acetonitrilo / agua (1:1)	Soluble al 2%
9. Metanol / acetonitrilo (1:1)	Soluble al 2%
10. Tetrahidrofurano / agua (1:1)	Soluble al 2%

Conclusión:

A partir de estos resultados se utilizan los solventes o mezclas de solventes que solubilicen al principio activo Ketorolaco Trometamina.

Estos solventes o mezclas de solventes serán mencionados ahora en adelante como diluyente, decir aquellos que son capaces de solubilizar a la muestra en este caso Ketorolaco trometamina.

Se han seleccionado tentativamente los siguientes diluyentes:

- Metanol
- Agua
- Etanol
- Metanol / agua (1:1)
- Acetonitrilo / agua (1:1)
- Metanol/ acetonitrilo (1:1)
- Tetrahidrofurano / agua (1:1)

5.1.2. ELECCIÓN DEL DETECTOR.

Con cada uno de los diluyentes mencionados se procede a preparar una batería de soluciones de Ketorolaco trometamina en diferentes solventes a una concentración determinada la cuál se ajustará a las condiciones espectrofotométricas del equipo.

Tener en consideración que cada principio activo se comporta de manera distinta frente a un diluyente, es decir que los resultados arrojados por el equipo dependen del comportamiento del principio activo con el diluyente a una determinada concentración.

Las concentraciones tentativas de Ketorolaco trometamina a trabajar son:

0.10 mg / ml.

0.30 mg / ml.

Esta batería de concentraciones y diluyentes serán sometidas al espectrofotómetro UV-Vis para identificar sus máximas de absorbancia, o también llamados picos; es decir podemos determinar longitudes de onda a la cuál el principio,

en un diluyente determinado, puede ser identificado y cuantificado a determinadas condiciones espectrofotométricas definidas.

Primera preparación tentativa de Ketorolaco Trometamina materia prima:

Colocar aproximadamente un peso de 50 mg de Ketorolaco trometamina en una fiola ámbar de 50 ml, adicionar 25 ml de diluyente, sonicar por 20 minutos (para reducir el tamaño de partículas), enrasar con diluyente. Homogenizar.

Trasvasar 5 ml de ésta solución a una fiola ámbar de 50 ml, enrasar con diluyente. Homogenizar.

Dilución: 500

Concentración de Ketorolaco trometamina: 0.1 mg/ml.

Conclusión:

A esta concentración de 0.1 mg/ml no se puede obtener absorbancias adecuadas, ni alguna gráfica que nos permita dilucidar a qué longitud o longitudes de onda máxima el principio activo Ketorolaco Trometamina puede ser cualificado y/o cuantificado.

Segunda preparación tentativa de Ketorolaco Trometamina materia prima:

Colocar aproximadamente un peso de 30 mg de Ketorolaco trometamina en una fiola ámbar de 100 ml, adicionar 50 ml de diluyente, sonicar por 20 minutos (para reducir el tamaño de partículas), enrasar con diluyente. Homogenizar.

Trasvasar 5 ml de ésta solución a una fiola ámbar de 50 ml, enrasar con diluyente. Homogenizar.

Dilución: 1000

Concentración de Ketorolaco trometamina: 0.03 mg/ml.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos a partir de la batería de diluyentes sometidas al espectrofotómetro UV-Vis, bajo las siguientes condiciones:

Rango de longitud de onda : 190 – 600 nm
 Orden de límite : 0.00 – 3.00
 Velocidad : 960 nm / min.
 Frecuencia de longitud de onda : 50 nm/ cm.

Diluyente	Longitudes de onda máxima
1. Metanol	318.0 nm
	243.2 nm
2. Agua	322.4 nm
	248.4 nm
3. Etanol	318.4 nm
	244.0 nm
4. Metanol / agua (1:1)	321.6 nm
	247.2 nm
5. Acetonitrilo / agua (1:1)	319.6 nm
	245.6 nm
6. Metanol / acetonitrilo (1:1)	315.6 nm
	242.4 nm
7. Tetrahidrofurano / agua (1:1)	320.4 nm
	244.8 nm

Ver anexos No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7. Gráficas a la luz Ultravioleta de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Espectrofotómetro UV-Vis. Marca Perkin Elmer. Modelo Lambda 2.

Conclusiones.

1. Para los diluyentes:

Metanol

Agua

Etanol

Metanol / agua (1.1)

Acetonitrilo / agua (1.1)

Metanol / acetonitrilo (1:1)

A las longitudes de onda obtenidas por cada diluyente se obtiene un pico máximo de absorbancia que indica presencia del principio activo. Estas longitudes de onda mostraron distintas absorbancias, siendo cada una de ellas directamente proporcional a su concentración, por tal motivo se tendrá que preparar muestras a distintas concentraciones para cada longitud de onda.

Estas longitudes de onda con sus respectivas concentraciones deberán ser ajustadas en el Cromatógrafo líquido con arreglo de diodos hasta obtener una longitud de onda que cuantifique al principio activo con un alto grado de pureza.

2. Para el diluyente.

Tetrahidrofurano / agua (1:1)

Las gráficas nos muestran picos máximos de absorbancia con longitudes de onda variada, descartando el factor del tiempo de preparación; esto nos indica que el principio activo Ketorolaco Trometamina no se comporta de manera estable en el diluyente.

5.1.3. ELECCIÓN DE LA COLUMNA.

Teniendo en cuenta que la fase móvil tendrá un carácter polar, la columna tendrá que ser apolar, esto para que el trabajo se constituya en una Cromatografía en fase inversa.

Según la bibliografía encontrada y considerando que la estructura molecular de Ketorolaco Trometamina presenta un anillo aromático además de otros anillos de 5 y 6 carbonos con dobles enlaces se utilizará una columna RP-18, la cuál está constituida por una cadena alquílica de octadecilsilano, ya sea de medidas 125 x 4mm o 250 x 4 m; así esto nos servirá como punto de partida para la búsqueda de alguna fase móvil capaz de identificar y luego cuantificar éste principio activo.

Conclusión.

La columna Lichrosphere Rp 18 ha dado buenos resultados en resolución y pureza del principio activo para la medida de 125 x 4 mm como 250 x 4 mm; pero se prefiere trabajar con la columna de medida más pequeña por cuanto en el cromatograma se obtiene un tiempo de retención menor en comparación con la columna de mayor longitud, lo que se traduce en menos tiempo de análisis y menor gasto de reactivo, haciendo más eficaz la técnica en relación al costo de análisis.

5.1.4 ELECCIÓN DE LA FASE MOVIL. REALIZACIÓN DE UNA GRADIENTE EXPLORATORIA

Por utilizar columna RP 18, es decir octadecilsilano, de carácter apolar y teniendo los resultados de solubilidad, la cuál nos indica que el principio activo Ketorolaco Trometamina es polar, se preparan fases móviles muy polares, de tal forma que se tenga una Cromatografía líquida en fase inversa.

En esta etapa de la investigación se preparan, según la segunda técnica tentativa, un estándar por cada disolvente señalado en el punto 5.1.2 (elección del detector) de tal forma que se tendrán 6 estándares para analizarlos por Cromatografía líquida.

ESTANDAR	DISOLVENTE
ST1	Metanol
ST2	Agua
ST3	Etanol
ST4	Metanol / Agua (1:1)
ST5	Metanol / Acetonitrilo (1:1)
ST6	Acetonitrilo / Agua (1:1)

Cada estándar será expuesto a una determinada fase móvil, de tal forma que se pueda visualizar el comportamiento del principio activo Ketorolaco trometamina en un diluyente frente a una fase móvil determinada y a cada una de las longitudes de onda máxima tentativas mostradas en el cuadro del punto 5.1.2

Se utilizará un Cromatógrafo líquido con arreglo de diodos, para dilucidar mediante su espectro en tercera dimensión la longitud de onda que resuelva con mayor pureza.

El procedimiento para tal fin será de la siguiente manera:

- a. Acondicionamiento de la columna Lichrosphere Rp 18 125 x 4 mm con la primera fase móvil.
- b. Seleccionar las longitudes de onda máxima determinadas en el punto 1.2 correspondiente para cada diluyente.

- c. Inyección de cada uno de los estándares.
- d. Conclusiones para la primera fase móvil.
- e. Acondicionamiento de la columna Lichrosphere Rp 18 125 x 4 mm con la segunda fase móvil.
- f. Repetir los pasos “b” y “c”

La composición de las fases móviles estudiadas para la determinación de Ketorolaco Trometamina por HPLC en fase inversa se presentan de la siguiente manera:

1.- FASE MOVIL: METANOL. 100%

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, no se reproduce utilizando como fase móvil metanol en presencia del principio activo Ketorolaco trometamina en distintos diluyentes

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Negativo
	248.4 nm	Negativo
St3	318.4 nm	Negativo
	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Negativo
	247.2 nm	Negativo

St5	319.6 nm	Negativo
	245.6 nm	Negativo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil Metanol no reproduce, es decir no es posible detectar al principio activo en ninguno de los disolventes trabajados.

2.- FASE MOVIL: METANOL / AGUA (90% : 10%)

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, no se reproduce utilizando como fase móvil la mezcla: metanol / agua (90% – 10%) en presencia del principio activo Ketorolaco trometamina en distintos diluyentes

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Negativo
	248.4 nm	Negativo
St3	318.4 nm	Negativo

	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Negativo
	247.2 nm	Negativo
St5	319.6 nm	Negativo
	245.6 nm	Negativo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 14, 15, 16, 17, 18 y 19. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil metanol / agua (90% – 10%) no reproduce, es decir no es posible detectar al principio activo en ninguno de los disolventes trabajados.

3.- FASE MOVIL: METANOL / AGUA (50% : 50%)

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, no se reproduce utilizando como fase móvil la mezcla: metanol / agua (50% – 50%) en presencia del principio activo Ketorolaco trometamina en distintos diluyentes

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Negativo
	248.4 nm	Negativo
St3	318.4 nm	Negativo
	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Negativo
	247.2 nm	Negativo
St5	319.6 nm	Negativo
	245.6 nm	Negativo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 20, 21, 22, 23, 24 y 25. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil metanol / agua (50% – 50%) no reproduce, es decir no es posible detectar al principio activo en ninguno de los disolventes trabajados.

4.- FASE MOVIL: METANOL / AGUA / ACIDO ACETICO (45% : 45% : 10%)

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, la fase móvil la mezcla: metanol / agua / ácido acético (45% : 45% : 10%) reproduce a los estándares de Ketorolaco trometamina sólo con los diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Positivo
	248.4 nm	Positivo
St3	318.4 nm	Negativo
	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Positivo
	247.2 nm	Positivo
St5	319.6 nm	Positivo
	245.6 nm	Positivo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 26, 27, 28, 29, 30 y 31. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil metanol / agua / ácido acético (45% : 45% : 10%) reproduce, es decir es posible detectar al principio activo en los siguientes diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

Para continuar con el ensayo hay que tener presente lo siguiente:

- Esta fase móvil tiene un pH muy bajo, de 2.5, esto perjudicaría la vida útil de la columna, rompiendo los enlaces entre la cadena carbonada y la molécula de sílice, por cuanto no la mantendría operativa por mayor tiempo.
- Esto nos llevaría a ensayar con una fase móvil similar a ésta última pero con un valor de pH no muy bajo.
- Si es el caso que otra fase móvil no detecte al principio activo, se procederá con ésta fase móvil metanol / agua / ácido acético (45% : 45% : 10%) a realizar una linealidad del estándar con el objetivo de hallar su comportamiento a distintas concentraciones.

5.- FASE MOVIL: METANOL / AGUA / ACIDO ACETICO (55% : 40% : 5%)

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, la fase móvil la mezcla: metanol / agua / ácido acético (55% : 40% : 5%) reproduce a los estándares de Ketorolaco trometamina sólo con los diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Positivo

	248.4 nm	Positivo
St3	318.4 nm	Negativo
	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Positivo
	247.2 nm	Positivo
St5	319.6 nm	Positivo
	245.6 nm	Positivo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 32, 33, 34, 35, 36 y 37. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil metanol / agua / ácido acético (55% : 40% : 5%) reproduce, es decir es posible detectar al principio activo en los siguientes diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

Para continuar con el ensayo hay que tener presente lo siguiente:

- Esta fase móvil tiene aún un pH muy bajo, de 2.8, esto perjudicaría la vida útil de la columna, por cuanto no la mantendría operativa por mayor tiempo. Se considera un pH de 3.0 como mínimo para el trabajo.
- Esto nos llevaría a ensayar con una fase móvil similar a ésta última pero con un valor de pH no muy bajo.

- Si es el caso que otra fase móvil no detecte al principio activo, se procederá con ésta fase móvil metanol / agua / ácido acético (55% : 40% : 5%) a realizar una linealidad del estándar con el objetivo de hallar su comportamiento a distintas concentraciones.

6.- FASE MOVIL: METANOL / AGUA / ACIDO ACETICO (55% : 44% : 1%)

Al realizar un barrido de luz ultravioleta que incluyen las longitudes de onda obtenidas, la fase móvil la mezcla: metanol / agua / ácido acético (55% : 44% : 1%) reproduce a los estándares de Ketorolaco trometamina sólo con los diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

La siguiente tabla muestra los resultados de este ensayo:

Estándar	Longitud de onda	Resultado
St1	318.0 nm	Negativo
	243.2 nm	Negativo
St2	322.4 nm	Positivo
	248.4 nm	Positivo
St3	318.4 nm	Negativo
	244.0 nm	Negativo
St4	321.6 nm	Positivo
	247.2 nm	Positivo
St5	319.6 nm	Positivo
	245.6 nm	Positivo
St6	315.6 nm	Negativo
	242.4 nm	Negativo

Ver anexos No. 38, 39, 40, 41, 42 y 43. Gráficas de Ketorolaco trometamina en cada diluyente en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

La fase móvil metanol / agua / ácido acético (55% : 44% : 1%) reproduce, es decir es posible detectar al principio activo en los siguientes diluyentes: agua, metanol-agua (1:1) y metanol-acetonitrilo (1:1)

El pH de esta fase móvil es de 3.2, cuyo valor es aceptable para exponerla a una columna.

Al trabajar con los 3 diluyentes, presentando resultados positivos en relación a la detección del principio activo, empezaremos a optimizar la técnica teniendo en cuenta la linealidad de estándares, el coeficiente de determinación, así como también el costo de los reactivos a utilizar.

Evaluación del costo de reactivos

Los reactivos en cuestión son metanol y acetonitrilo, cuyos precios con los siguientes, valorizados en dólares por litro de reactivo:

- Metanol HPLC : 4.50
- Acetonitrilo HPLC : 10.25

Así, se tiene que el precio del metanol es menor en 2.28 veces que el de acetonitrilo, por lo que en el siguiente paso de evaluación, se priorizará el uso del reactivo metanol.

Evaluación de linealidad de estándares en los siguientes diluyentes:

Objetivo.

Determinar en qué diluyente el principio activo sometido a la fase móvil metanol / agua / ácido acético (55% : 44% : 1%) presenta un coeficiente de determinación mayor a 0.99, para ello se trabajará bajo las mismas condiciones que la técnica propuesta.

Los diluyentes a trabajar serán:

- Agua. Ver anexos No. 44, 45, 46 y 47
- Metanol / agua (1:1). Ver anexos No. 48, 49, 50 y 51.

Resultados.

Diluyente	Coficiente de determinación
Agua	0.9892
Metanol / agua (1:1)	0.9976

Conclusión.

El diluyente Metanol / agua (1:1) se puede considerar hasta el momento como la óptima, puesto que es lineal a distintas concentraciones con un determinación mayor que 0.99, valor aceptable para una validación de técnica.

5.5.5. ELECCIÓN DEL FLUJO

Se muestran los diferentes caudales de flujo ensayados:

	Flujo	Resultados	
		Tiempo de retención	Presión (psi)
1	0.50 ml / min.	9.55 minutos	900
2	0.75 ml / min.	6.40 minutos	1150
3	1.00 ml / min.	4.83 minutos	1550
4	1.20 ml / min.	4.80 minutos	1900

Ver anexos No. 56, 57, 58, y 59. Gráficas de Ketorolaco trometamina a diferentes flujos en el Cromatógrafo líquido de alta Performance marca Lachrom Merck Hitachi, con detector ultravioleta y con arreglo de Diodos.

Conclusión.

- A todos los flujos el principio activo es detectable y lineal, es decir que a diferentes concentraciones muestran un coeficiente de determinación aceptable para empezar una validación.
- Esto nos lleva a decidir que el uso de un mayor flujo reducirá el tiempo de análisis y el costo operativo del mismo, objetivo perseguido en esta investigación, por cuanto se decide el flujo de 1.20 ml/min.
- Un flujo mayor al propuesto tendría la dificultad que la presión llegaría al límite superior para un Cromatógrafo Líquido (2990 psi), ésta presión aumenta aun más si la columna no es mantenida en condiciones aceptables.

5.5.6. ELECCIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN

El volumen de inyección debe ser seleccionado tomando en consideración la longitud y diámetro de poros de la columna, evitando así que se sature los radicales de sílice. El volumen de inyección cuando no es tomado en cuenta puede arrojar resultados falsos positivos. Este volumen de inyección está relacionado en forma inversa a la concentración del principio activo en el diluyente.

Teniendo en cuenta que el volumen del loop en la mayoría de los laboratorios de control de calidad es de 10 a 400 uL, es preferible la utilización de un loop con un volumen menor a la mitad del loop de la bomba (generalmente 400 uL) y mayor o igual a 10 uL.

Además esto es verificable con los volúmenes utilizados en las Farmacopeas Oficiales Estadounidense y Británica, así como en los análisis realizados en la experiencia laboral.

Conclusión.

Se utilizará un volumen de inyección de 100 uL.

5.5.7. ELECCIÓN DE LA TEMPERATURA

La bibliografía consultada, Farmacopeas oficiales, no indica que el principio sufra alguna degradación a temperaturas de 30°C

Una temperatura de 25°C es algo limitante por cuanto ésta variaría en mayor grado a los cambios de temperatura producidos en el área de trabajo.

Conclusión.

Se utilizará la temperatura de 30°C

5.2. OPTIMIZACION DE LA TÉCNICA ANALITICA

5.2.1. AJUSTE DE LOS PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Dosaje: 10 mg/tab (9.0 – 11.0 mg/tab)

Condiciones cromatográficas

Columna	:	Lichrosphere Rp 18 125 x 4 mm
Fase móvil	:	Metanol : agua : ácido acético (55 : 44 : 1)
Longitud de onda	:	254 nm
Flujo	:	1.2 ml/minuto
Volumen de inyección	:	100 uL
Temperatura	:	30°C

PROCEDIMIENTO.

OBS. Mantener la muestra en todo momento protegido de la luz.

Preparación del diluyente.- Mezclar en proporciones iguales Metanol y agua.

Preparación del estándar.

Colocar aproximadamente un peso de 25 mg de Ketorolaco Trometamina en fiola de 100 ml, adicionar 50 ml del diluyente, sonicar 20 minutos, enrasar con diluyente. Homogenizar.

Trasvasar 5 ml de esta solución a una fiola de 50 ml, enrasar con diluyente. Homogenizar.

Dilución: 1000

Filtrar a través de filtro 0.22 um

Concentración del estándar: 0.025 mg / ml

Preparación de la muestra.

Separar 20 tabletas al azar. Pesar y obtener el peso promedio por tableta. Colocar aproximadamente un peso de 500 mg de muestra pulverizada (equivalente a dos y media tableta) en fiola de 100 ml, adicionar 5 ml de agua, dejar humectar, agregar 50 ml del diluyente, sonicar 20 minutos y agitar mecánicamente 30 minutos. Enrasar con diluyente. Homogenizar.

Trasvasar 5 ml de esta solución a una fiola de 50 ml, enrasar con diluyente. Homogenizar.

Dilución: 1000

Filtrar a través de filtro 0.22 um

Concentración de la muestra: 0.025 mg / ml

Cálculos:

$$Fst = \frac{(Wst) (Pot. St)}{(Dil. St) (100)}$$

$$Fm = \frac{(Dil. Mp) (W prom)}{(W mp)}$$

$$mg / tab = \frac{(A. mp) (Fst) (Fm)}{(A. st)}$$

Donde:

Fst : Factor de concentración del estándar

Wst : Peso de Ketorolaco trometamina estándar en mg.

Pot. St : Potencia tal cuál del estándar

Dil. St : Dilución del estándar

Fm : Factor multiplicador

Dil.mp : Dilución de la muestra pulverizada

- W prom : Peso promedio por tableta (20 tbaletas)
- Wmp : Peso de muestra pulverizada
- A.mp : Area bajo la curva de Ketorolaco trometamina muestra
- A.st : Area bajo la curva de Ketorolaco trometamina estándar

5.2.2. CONCLUSIONES PRELIMINARES.

1. La técnica promete cumplir con los parámetros de validación, puesto que da resultados satisfactorios de linealidad utilizando un estándar como referencia.
2. Se han utilizado solventes polares, que además de ser compatibles con el principio activo, tiene valores ϵ° (energía de unión) altos , esto nos permite realizar variaciones de proporción de solventes o cambios de solventes con polaridades menores.
3. Las gráficas que se han desarrollados bajo esta técnica son similares a un pico gaussiano y simétrico, los cuales se constituyen en un factor importante al momento del análisis, puesto que permiten cuantificar en forma segura y confiable al principio activo.

5.3. VALIDACIÓN EN LA FORMA DE TABLETAS DE KETROLACO TROMETAMINA.

5.3.1. OBJETIVO.

El objetivo del siguiente protocolo es de garantizar que los resultados proporcionados por el método analítico de cuantificación de Ketorolaco Trometamina en tabletas, por HPLC reúna las características y atributos de calidad exigidos por la USP 27 y cumpla con las especificaciones establecidas.

5.3.2. ALCANCE.

Este protocolo describe la validación de la Técnica analítica Cuantitativa por HPLC de Ketorolaco Trometamina en tabletas.

5.3.3. JUSTIFICACIÓN DEL METODO ANALÍTICO.

Al no existir documento oficial para la cuantificación de Ketorolaco Trometamina, se ha desarrollado un método de análisis cuantitativo con alta fiabilidad como lo es la utilización de la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

5.3.4. CALIFICACION OPERACIONAL DEL CROMATOGRAFO LIQUIDO.

El primer requisito en un análisis es asegurarse que el equipo o instrumento a utilizar esté operativo, es decir que se encuentre calificado, dentro de su frecuencia del mismo. El siguiente cuadro indica los ensayos y sus especificaciones para la calificación del Cromatógrafo Líquido, realizado por Laboratorios Merck semestralmente.

Ensayo	Especificación	Resultado	Conforme
1. Calificación de comunicación del sistema.	Todos los módulos conectados deben comunicarse.	OK	Si
2. Cualificación de procesamiento de datos.	Pico No. 2 Antraceno		
	Tiempo de retención: 2.34 min.	2.34	Si
	Area de pico: 708614	708614	Si
3. Ruído / deriva.	Ruído: Máximo 100 uV	63	Si
	Deriva: Máximo 150 uV / min.	13	Si
4. Reporte confidencial - System Suitability Test - Reporte de la Performance de los módulos.	Metil Parabeno		
	Tiempo de retención: pico identificado	3.05	Si
	Asimetría: 0.8 – 1.4	1.20	Si
	No. Platos teóricos: Mayor a 1500	2915	Si
	Presión clave:0	0	Si
	Fluctuación de presión: Max. 4%	1.07%	Si
	Precisión de longitud de onda: ± 1 nm	--	Si

	Energía de lámpara D2: Mayor a 50% inicial.	31220	Si	
5. Repetitividad	Area de picos: DSR max. 1%	0.40%	Si	
	Tiempo de retención: DSR max. 1%	0.18%	Si	
6. Linealidad	- Linealidad	Coeficiente correlación: Min. 0.999	0.9999	Si
	- Muestra Carry-over	Carry-over: Max. 0.1%	0	Si
7. Cualificación del control del sistema	Correcto control en un procedimiento	OK	Si	

5.3.5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO

5.3.5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

LINEALIDAD DE ESTANDAR 1

Se procede a realizar el parámetro de linealidad de estándar utilizando 5 concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de estándar de Ketorolaco trometamina tomando como referencia de 100% el sobredosaje del principio activo con el que cuenta la tableta en estudio, es decir 10 mg / tableta.

Siguiendo la técnica propuesta, la concentración final al 100% es 0.025 mg / ml.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

Estándar	:	Ketorolaco trometamina
Potencia tal cuál	:	99.87%
Lote	:	1088001002

Utilizando fiolas color ámbar, para protegerlo de la luz, agregar pesos del estándar de Ketorolaco trometamina, de tal forma que se obtengan las siguientes concentraciones en base a la técnica propuesta:

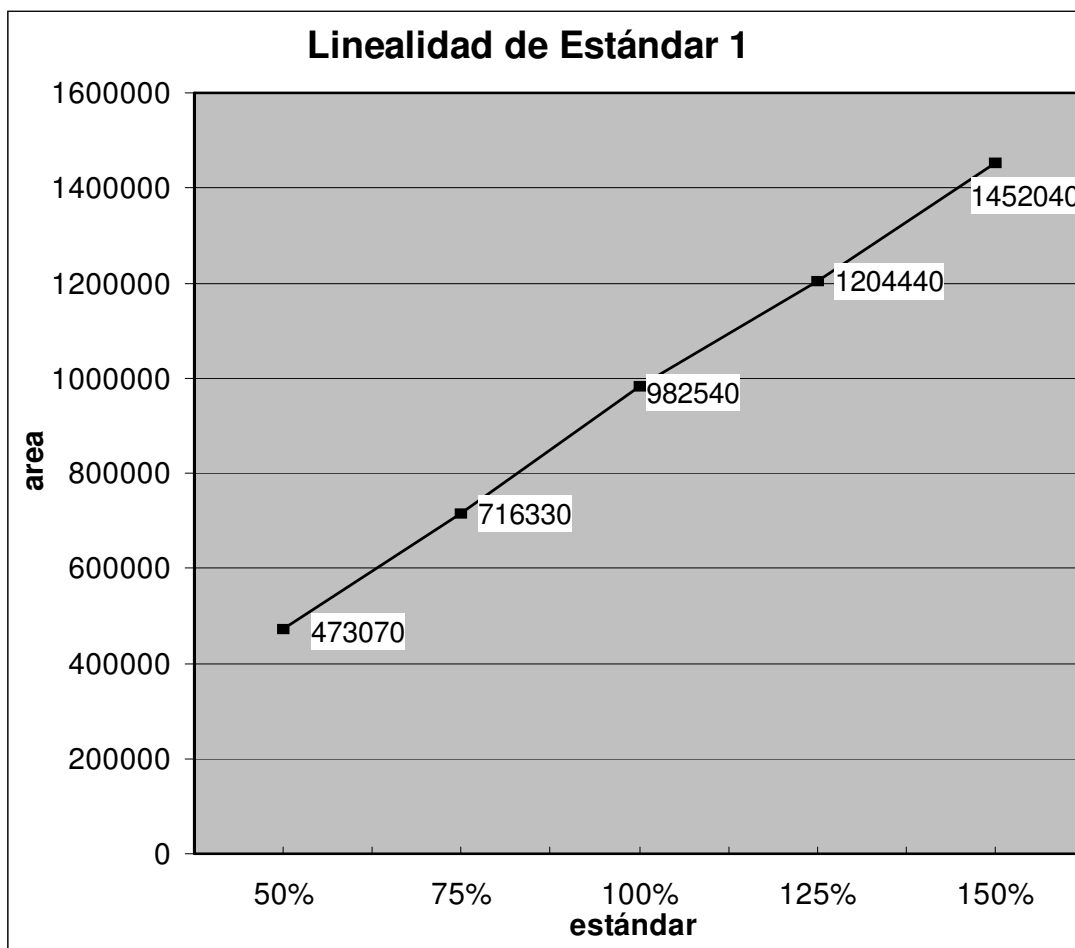
St 50%	:	0.01250 mg / tab
St 100%	:	0.01875 mg / tab
St 150%	:	0.02500 mg / tab
St 125%	:	0.03150 mg / tab
St 150%	:	0.03750 mg / tab

El siguiente cuadro registra las áreas para cada estándar sometido a las condiciones cromatográficas propuestas en la técnica.

ESTANDARES	CONC. (mg/ml)	AREA	PROMEDIO
St 1 (50%)	0.0126	476280	473070
		469860	dsr: 0.23
St2 (75%)	0.0185	727880	716330
		704780	dsr: 0.19
St3 (100%)	0.0251	972620	982540
		992460	dsr: 0.17
St4 (125%)	0.0313	118900	1204440
		1219880	dsr: 1.18
St5 (150%)	0.0378	1469040	1452040
		1435040	dsr: 0.06

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
 Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
 Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
 Flujo : 1.2 ml / min.
 Longitud de onda : 254 nm.
 Presión : 1710 psi.
 Volumen de inyección : 100 uL.
 Temperatura : 30°C



Gráfica. Linealidad de estándar 1

RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LINEALIDAD DE ESTÁNDAR 1

El siguiente cuadro muestra los valores estadísticos:

- Coeficiente de correlación.
- Coeficiente de determinación.

Estándar	X	Y	X*Y	X2	Y2	y/x
50%	0.0126	477030	6010.578	0.00015876	2.27558E+11	37859523.81
75%	0.0185	716330	13252.105	0.00034225	5.13129E+11	38720540.54
100%	0.0251	982540	24661.754	0.00063001	9.65385E+11	39145019.92
125%	0.0313	1204440	37698.972	0.00097969	1.45068E+12	38480511.18
150%	0.0378	1452040	54887.112	0.00142884	2.10842E+12	38413756.61
Suma	0.1253	4832380	136510.521	0.00353955	5.26517E+12	192619352.1
Promedio	0.0251	966476				38523870.41
	n	5			desvest f	469006.2182
	b1	15411.0782			dsr%f	1.22
	b2	0.000399532				
	b	38572825.71				

a	-159.0121943
r	0.999715076
r2	0.999430233
S2XY	33889036.87
sb2	84821833718

SXY	5821.429109
SB	76.29829034
DSR%B	0.000197803

tepx	132.443
t	7.45

LINEALIDAD DE ESTANDAR 2

Se procede a realizar el parámetro de linealidad de estándar utilizando 5 concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de estándar de Ketorolaco trometamina tomando como referencia de 100% el sobredosaje del principio activo con el que cuenta la tableta en estudio, es decir 10 mg / tableta.

Siguiendo la técnica propuesta, la concentración final al 100% es 0.025 mg / ml.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

Estándar	:	Ketorolaco trometamina
Potencia tal cuál	:	100.87%
Lote	:	1088001002

Utilizando fiolas color ámbar, para protegerlo de la luz, agregar pesos del estándar de Ketorolaco trometamina, de tal forma que se obtengan las siguientes concentraciones en base a la técnica propuesta:

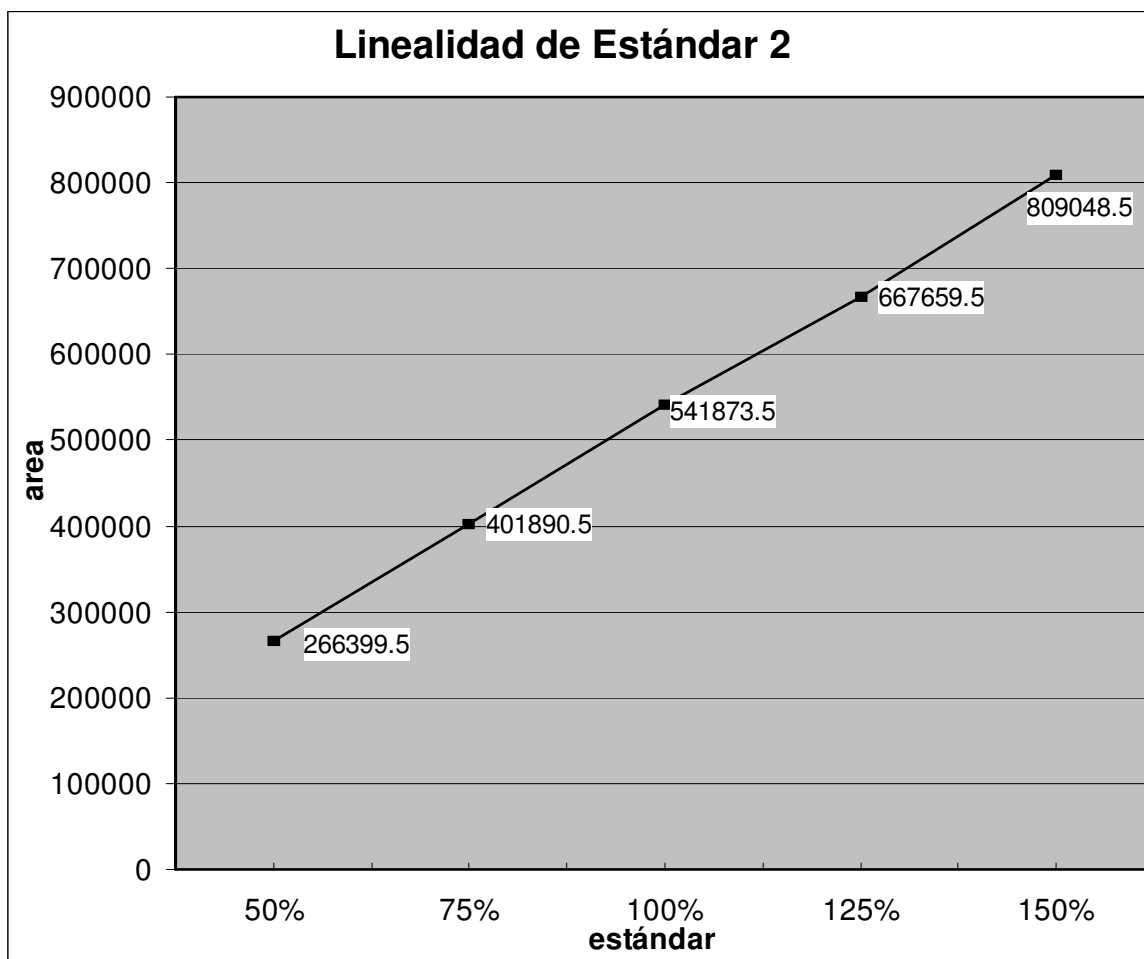
St 50%	:	0.01250 mg / tab
St 100%	:	0.01875 mg / tab
St 150%	:	0.02500 mg / tab
St 125%	:	0.03150 mg / tab
St 150%	:	0.03750 mg / tab

El siguiente cuadro registra las áreas para cada estándar sometido a las condiciones cromatográficas propuestas en la técnica.

ESTANDARES	CONC. (mg/ml)	AREA	PROMEDIO
St 1 (50%)	0.0125	265963	266399.5
		266936	dsr: 0.23
St2 (75%)	0.0187	402420	401890.5
		401361	dsr: 0.19
St3 (100%)	0.0251	541214	541873.5
		542533	dsr: 0.17
St4 (125%)	0.0311	662087	667659.5
		673232	dsr: 1.18
St5 (150%)	0.0380	809366	809048.5
		808731	dsr: 0.06

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
 Columna : Lichrosphere100 Rp 18 125 x 4mm
 Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
 Flujo : 1.2 ml / min.
 Longitud de onda : 254 nm.
 Presión : 1900 psi.
 Volumen de inyección : 100 uL.
 Temperatura : 30°C



Gráfica. Linealidad de estándar 2

RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LINEALIDAD DE ESTÁNDAR 2

El siguiente cuadro muestra los valores estadísticos:

- Coeficiente de correlación.
- Coeficiente de determinación.

Estándar	X	Y	X*Y	X2	Y2	y/x
50%	0.0125	266399.5	3329.99375	0.00015625	70968693600	21311960
75%	0.0187	401890.5	7515.35235	0.00034969	1.61516E+11	21491470.59
100%	0.0251	541873.5	13601.0249	0.00063001	2.93627E+11	21588585.66
125%	0.0311	667659.5	20764.2105	0.00096721	4.45769E+11	21468151.13
150%	0.0380	809048.5	30743.843	0.001444	6.54559E+11	21290750
Suma	0.1254	2686871.5	75954.4244	0.00354716	1.62644E+12	107150917.4
Promedio	0.0251	537374.3				21430183.47
	n	5			desvest f	126201.6126
	b1	8567.68718			dsr%f	0.59
	b2	0.000402128				
	b	21305870.72				

a	3023.062398
r	0.999883571
r2	0.999767155
S2XY	4251397.533
sb2	10572249465

SXY	2061.891736
SB	45.40805806
DSR%B	0.000213125

tepx	207.212
t	7.45

Ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

- x : Concentración del analito
- y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico.
- b : Valor de la pendiente de la recta.
- a : Valor del intercepto de la recta con el eje y

INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL.

Coefficiente de correlación "r" :

Ho : r es diferente de 1

Criterio de aceptación : r no debe ser significativamente diferente de 1

Resultado: (transcripción de los resultados estadísticos de estándar 1 y 2)

Linealidad de estándar 1: $r = 0.99971508$

Linealidad de estándar 2: $r = 0.9998836$

Coefficiente de determinación (r²):

Según la Farmacopea de los Estados Unidos 27 (2004:2274-2275) es el cuadrado del coeficiente de correlación "r" e indica la proporción de la varianza total de "y", esto debe ser mayor o igual a 0.997 para ingredientes activos en una fórmula

Resultado: (transcripción de los resultados estadísticos de estándar 1 y 2)

Linealidad de estándar 1: $r^2 = 0.99943023$

Linealidad de estándar 2: $r^2 = 0.9997671$

Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación "r":

Ho = no hay correlación entre x e y

Criterios de aceptación:

Si el valor de "t" obtenido es mayor que el "t" de la tabla, calculado para (n-2) grados de libertad y un nivel de significación del 99.5 % (probabilidad p = 0.05%), entonces si hay correlación entre x e y.

Resultado: (transcripción de los resultados estadísticos de estándar 1 y 2)

t exp linealidad 1: 132.442578

t exp linealidad 2: 207.20646

Test de Linealidad.

Desviación estándar relativa de los factores de respuesta "f"

Criterio de aceptación. DSR menor o igual al 5%

Resultado: (transcripción de los resultados estadísticos de estándar 1 y 2)

Linealidad de estándar 1: 1.217

Linealidad de estándar 2: 0.589

LINEALIDAD DE MUESTRA

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

Estándar : Ketorolaco trometamina
Potencia tal cuál : 99.87%
Lote : 1088001002

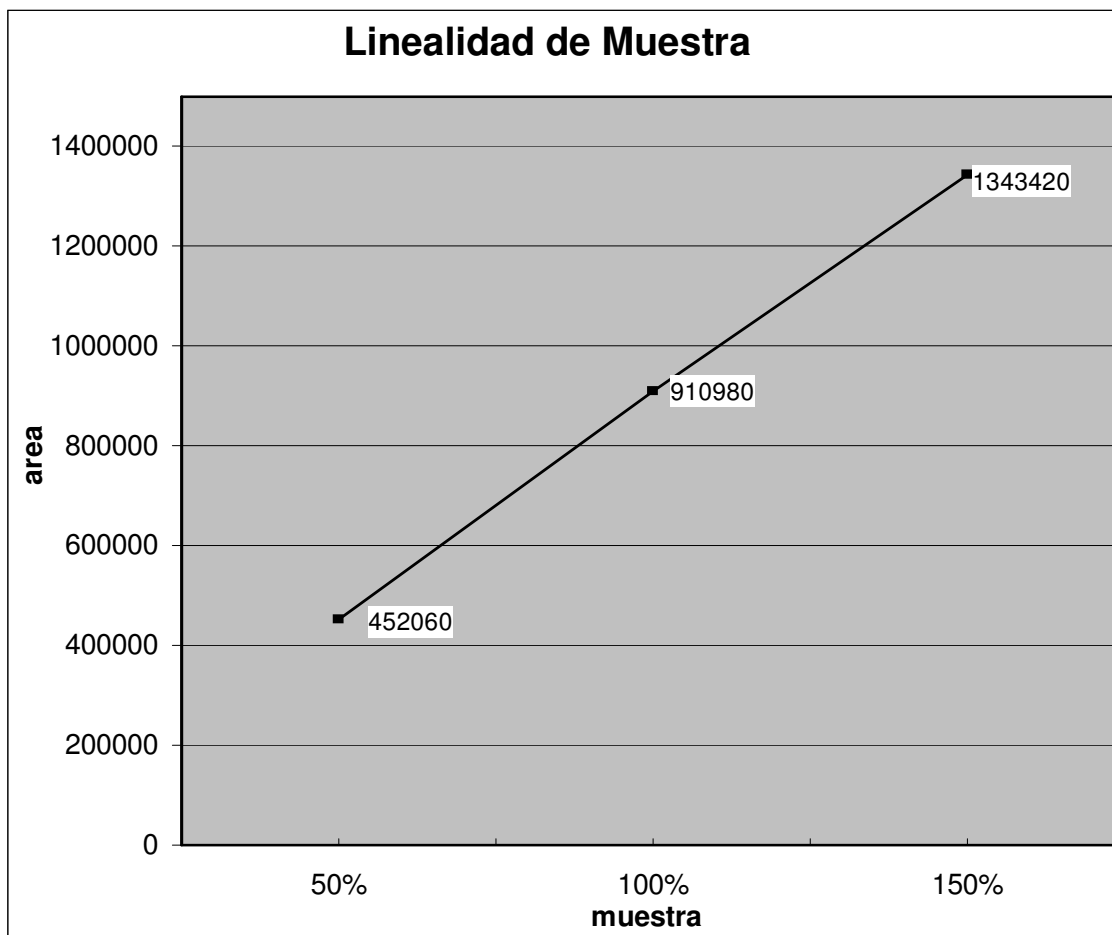
Utilizando 3 fiolas color ámbar, agregar pesos del estándar de Ketorolaco trometamina, de tal forma que se obtengan las siguientes concentraciones en base a la técnica propuesta:

Muestra al 50% : 0.01250 mg / tab
Muestra al 100% : 0.02500 mg / tab
Muestra al 150% : 0.03750 mg / tab

ESTANDARES	CONC. (mg/ml)	AREA	PROMEDIO
M 1 (50%)	0.2506	452010	452060
		452110	dsr: 0.23
M 2 (100%)	0.5073	910952	910980
		911008	dsr: 0.17
M 3 (150%)	0.7468	1343402	1343420
		1343438	dsr: 0.06

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido	:	LACHROM con arreglo de diodos
Columna	:	Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil	:	Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo	:	1.2 ml / min.
Longitud de onda	:	254 nm.
Presión	:	1850 psi.
Volumen de inyección	:	100 uL.
Temperatura	:	30°C



Gráfica. Linealidad de muestra 1

RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LINEALIDAD DE MUESTRA

El siguiente cuadro muestra los valores estadísticos:

- Coeficiente de correlación.
- Coeficiente de determinación.

Muestra	X	Y	X*Y	X ²	Y ²	y/x
50%	0.2506	452060	113286.236	0.06280036	2.0436E+11	1803910.61
100%	0.5073	910980	462140.154	0.25735329	8.2988E+11	1795742.16
150%	0.7468	1343420	1003266.06	0.55771024	1.8048E+12	1798901.98
Suma	1.5047	2706460	1578692.45	0.87786389	2.839E+12	5398554.76
Promedio	0.5016	902153				1799518.25
	n	3			desvest f	4118.9486
	b1	221222.3253			dsr%f	0.229
	b2	0.123156527				
	b	1796269.604				

a	1204.375833
r	0.999995909
r²	0.999991818
S²XY	325123.7994
sb²	2639923.422

SXY	570.196281
SB	23.8787831
DSR%B	0.00132935

t exp	1105.544
t	127.32

5.3.5.2. SELECTIVIDAD

Se procede a realizar el parámetro de Selectividad utilizando las siguientes muestras:

1. Placebo, es decir los excipientes que intervienen en la tableta; este ensayo nos permitirá descartar que la técnica pueda detectar algunos de estos excipientes.
2. Diluyente, es decir la mezcla de agua – metanol (1:1) en que se solubilizó y preparó al principio activo Ketorolaco trometamina, este ensayo nos permitirá descartar que la técnica pueda detectar el diluyente.
3. Pureza de pico en muestra a condiciones ambientales, se preparan 3 muestras de Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas de un lote recientemente fabricado, según la técnica a validar.
4. Pureza de pico en muestra a condición estresada, se preparan 3 muestra de Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas de un lote sometido a condiciones de estrés, es decir a la temperatura de 40°C x 15 meses, según la técnica a validar.

PLACEBO

Producto : Excipientes

Equipo : LACHROM con arreglo de diodos

PLACEBO	CONCENTRACION	AREA
1	0	0
2	0	0
3	0	0

DISOLVENTE

Producto : Agua – metanol (1:1)

Equipo : LACHROM con arreglo de diodos

DILUYENTE	CONCENTRACION	AREA
1	0	0
2	0	0
3	0	0

PUREZA DE PICO EN MUESTRA A CONDICIONES AMBIENTALES (25°C)

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010010
Equipo : LACHROM con arreglo de diodos

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	PUREZA DE PICO (%)	AREA
M 1	0.5053	101.790	101.845
		101.900	DSR: 0.08
M 2	0.5170	101.724	101.737
		101.750	DSR: 0.02

PROMEDIO	101.80%
DSR	0.08

PUREZA DE PICO EN MUESTRA ESTRESADA (40°C)

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010010
Condiciones : 40°C x 15 meses
Equipo : LACHROM con arreglo de diodos

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	PUREZA DE PICO (%)	AREA
M 1	0.5112	99.990	100.474
		100.957	DSR: 0.68
M 2	0.5150	100.551	100.632
		100.713	DSR: 0.11

PROMEDIO	100.553%
DSR	0.11

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 1980 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

5.3.5.3. PRECISION

La precisión de un método analítico es definida como el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea.

La precisión puede ser medida ya sea por medio del grado de repetitividad o de reproductibilidad del método analítico bajo condiciones operativas normales.

REPETITIVIDAD

Se procede a realizar el parámetro de repetitividad preparando 5 muestras de un lote de Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas, en el que se emplea al mismo analista con el mismo equipo, según la técnica a validar.

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010010
Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.4996	10.0286	10.021
		10.0125	DSR: 0.11
M 2	0.5003	10.08959	10.138
		10.1872	DSR: 0.68
M 3	0.5022	10.1491	10.138
		10.1268	DSR: 0.16

M 4	0.5046	10.1173	10.149
		10.1798	DSR: 0.44
M 5	0.5092	10.2803	10.305
		10.3297	DSR: 0.34

PROMEDIO	10.15 mg/tab
DSR	1.0

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido	:	LACHROM con arreglo de diodos
Columna	:	Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil	:	Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo	:	1.2 ml / min.
Longitud de onda	:	254 nm.
Presión	:	1720 psi.
Volumen de inyección	:	100 uL.
Temperatura	:	30°C

REPRODUCTIBILIDAD

Se procede a realizar el parámetro de reproductibilidad preparando muestras de un mismo lote de Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas, en distinto días, y por distintos analistas utilizando diferentes equipos, según la técnica validar, de la siguientes manera:

- Analista 1. Día 1. Equipo Cromatógrafo Líquido marca Hewlett Packard modelo 1050 / 1100.
- Analista 2. Día 2. Equipo Cromatógrafo Líquido marca Hewlett Packard modelo 1100 Ti / 50.
- Analista 3. Día 3. Equipo Cromatógrafo Líquido marca Lachrom Merck Hitachi.

Analista No. 1

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010020
Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.5077	10.158	10.171
		10.183	DSR: 0.17
M 2	0.5126	10.089	10.090
		10.091	DSR: 0.01

PROMEDIO	10.13 mg/tab
DSR	0.56

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : Cromatógrafo Líquido Hewlett Packard 1050/ 1100
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2290 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Analista No. 2

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010020
Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.5030	9.933	9.913
		9.893	DSR: 0.28
M 2	0.5066	10.060	10.065
		10.070	DSR: 0.07
M 3	0.5142	10.020	10.110
		10.099	DSR: 1.25

PROMEDIO	10.03 mg/tab
DSR	1.02

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : Cromatógrafo Líquido Hewlett Packard 1100Ti / 50.
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2200 psi.

Volumen de inyección : 100 uL.

Temperatura : 30°C

Analista No. 3

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas

Lote : 010020

Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.5041	10.1737	10.174
		10.1739	DSR: 0.01
M 2	0.5057	10.057	10.056
		10.054	DSR: 0.02

PROMEDIO	10.115 mg/tab
DSR	0.83

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : Cromatógrafo Líquido Lachrom con arreglo de diodos

Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm

Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)

Flujo : 1.2 ml / min.

Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2400 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Resultados de los 3 analistas:

	MG /TAB
Analista 1	10.130
Analista 2	10.030
Analista 3	10.115
Promedio	10.092
dsr	0.05

5.3.5.4. EXACTITUD

Se procede a realizar el parámetro de exactitud al 50%, 100% y 150% del principio activo Ketorolaco trometamina agregadas a una mezcla de excipientes, tomando como referencia que el 100% de este parámetro corresponde a 10 mg / tab.

Este parámetro indica la proximidad entre los resultados obtenidos y el valor real como porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analito.

Exactitud al 50%

Producto : Ketorolaco trometamina estándar
Excipientes csp 1 tableta.

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	PUREZA DE PICO (%)	AREA
M 1	0.5012	101.688	101.728
		101.768	DSR: 0.06
M 2	0.5027	98.223	98.473
		98.223	DSR: 0.36
M 3	0.5137	96.521	96.629
		96.737	DSR: 0.16

PROMEDIO	98.943 mg/tab
----------	---------------

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2300 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Exactitud al 100%

Producto : Ketorolaco trometamina estándar
Excipientes csp 1 tableta.

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	PUREZA DE PICO (%)	AREA
M 1	0.5055	96.944	96.938
		96.932	DSR: 0.01
M 2	0.5120	99.999	99.979
		99.959	DSR: 0.03
M 3	0.5148	102.559	102.630
		102.700	DSR: 0.09

PROMEDIO	99.849 mg/tab
----------	---------------

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2300 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Exactitud al 150%

Producto : Ketorolaco trometamina estándar
Excipientes csp 1 tableta.

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	PUREZA DE PICO (%)	AREA
M 1	0.5012	98.835	98.881
		98.926	DSR: 0.07
M 2	0.5027	98.168	98.103
		98.037	DSR: 0.09
M 3	0.5137	97.876	97.671
		97.466	DSR: 0.30

PROMEDIO	98.218 mg/tab
----------	---------------

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido	:	LACHROM con arreglo de diodos
Columna	:	Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil	:	Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo	:	1.2 ml / min.
Longitud de onda	:	254 nm.
Presión	:	2300 psi.
Volumen de inyección	:	100 uL.
Temperatura	:	30°C

DATOS Y RESULTADOS EN EXACTITUD

Producto	:	Ketorolaco trometamina
Potencia (tal cuál)	:	99.87%
Lote	:	010020

Se procede a realizar el parámetro de exactitud al 50%, 100% y 150% del principio activo Ketorolaco trometamina agregadas a una mezcla de excipientes, tomando como referencia que el 100% de este parámetro corresponde a 10 mg / tableta, es decir

- El placebo al 50% tendrá una concentración de 5 mg / tableta.
- El placebo al 100% tendrá una concentración de 10 mg / tableta.
- El placebo al 150% tendrá una concentración de 15 mg / tableta.

Así se tiene el siguiente cuadro con los datos preliminares:

PLACEBO AL 50%		
1. Peso del placebo	3.9095	g
2. Peso de Ketorolaco trometamina	101.2	mg
3. Peso total x 20 tabletas = Pto. 1 + Pto. 2	4.0107	g
4. Peso promedio teórico x tableta	200.535	mg
5. Concentración teórica = (Pto. 2 x Pot.) / (100 x 20)	5.053422	mg
6. % concentración teórica = Pto. 5 x 100 / 5.0	101.068	%
PLACEBO AL 100%		
1. Peso del placebo	3.8102	g
2. Peso de Ketorolaco trometamina	202.0	mg
3. Peso total x 20 tabletas = Pto. 1 + Pto. 2	4.0122	g
4. Peso promedio teórico x tableta	200.61	mg
5. Concentración teórica = (Pto. 2 x Pot.) / (100 x 20)	10.08687	mg
6. % concentración teórica = Pto. 5 x 100 / 5.0	100.869	%
PLACEBO AL 150%		
1. Peso del placebo	3.7244	g
2. Peso de Ketorolaco trometamina	299.0	mg
3. Peso total x 20 tabletas = Pto. 1 + Pto. 2	4.0234	g
4. Peso promedio teórico x tableta	201.17	mg
5. Concentración teórica = (Pto. 2 x Pot.) / (100 x 20)	14.93057	mg
6. % concentración teórica = Pto. 5 x 100 / 5.0	99.537	%

En el siguiente cuadro se muestran los resultados obtenidos en el cromatógrafo líquido, así como también cálculos para la determinación del valor t experimental:

PLACEBO 50 %			
	M1	M2	M3
	101.688	98.722	96.521
	101.768	98.223	96.737
PROMEDIO	101.728	98.473	96.629
DSR%	0.06	0.36	0.16
% RECUPERACION	100.653	97.432	95.608

Valor teórico = **101.068**

PLACEBO 100 %			
	M1	M2	M3
	96.944	99.999	102.559
	96.932	99.959	102.700
PROMEDIO	96.938	99.979	102.630
DSR%	0.01	0.03	0.10
% RECUPERACION	96.103	99.118	101.745

Valor teórico = **100.869**

PLACEBO 150 %			
	M1	M2	M3
	98.835	98.168	97.876
	98.926	98.037	97.466
PROMEDIO	98.881	98.103	97.671
DSR%	0.07	0.09	0.30
% RECUPERACION	99.340	98.559	98.125

Valor teórico = **99.537**

$\% \text{ DE RECUPERACION} = \text{VALOR MEDIO} / \text{VALOR TEORICO} \times 100$

$\% \text{ DE RECUPERACION} = \mathbf{98.520}$

$\text{DSR}\% = \mathbf{2.02}$

$t. \text{ experimental} = (100 - \% \text{ recuperación}) \times 3 / \text{dsr}\%$

t. Exp = 2.20

5.3.5.5. ROBUSTEZ

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer no afectado por variaciones pequeñas.

Condición a variar No.1:

Se analizó la muestra variando el flujo de fase móvil a 1.0. ml/min, luego de 20 horas de preparación.

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas

Lote : 010020

Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.5045	10.4725	10.464
		10.4553	DSR: 0.12
M 2	0.5053	10.1965	10.217
		10.2379	DSR: 0.29
M 3	0.5082	10.3366	10.337
		10.3366	DSR: 0.0

PROMEDIO	10.34 mg/tab
dsr	1.19

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.0 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2000 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Condición a variar No.2:

Se analizó la muestra, luego de 24 horas de preparación.

Producto : Ketorolaco trometamina 10 mg tabletas
Lote : 010020
Fecha de expira : Octubre del 2003

MUESTRA	CONC. (mg/ml)	MG / TAB	AREA
M 1	0.5053	10.2785	10.282
		10.2846	DSR: 0.04
M 2	0.5082	10.4113	10.421
		10.4315	DSR: 0.14

PROMEDIO	10.35 mg/tab
dsr	0.96

Condiciones Cromatográficas.

Cromatógrafo Líquido : LACHROM con arreglo de diodos
Columna : Lichrosphere 100 Rp 18 125 x 4mm
Fase móvil : Metanol / Agua / Acido acético (55 :44 : 1)
Flujo : 1.2 ml / min.
Longitud de onda : 254 nm.
Presión : 2000 psi.
Volumen de inyección : 100 uL.
Temperatura : 30°C

Resultados de las 2 condiciones:

	MG /TAB
Analista 1	10.34
Analista 2	10.35
Promedio	10.345
dsr	0.01

5.3.6. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

PRUEBAS EFECTUADAS	ESPECIFICACION	RESULTADO	CONCLUSIÓN
1. LINEALIDAD DEL SISTEMA			
1.1 LINEALIDAD DEL ESTANDAR			
Coeficiente de correlación (r)	Mayor a 0.995	St1: 0.999715 St2: 0.999884	Conforme
Coeficiente de determinación (r ²)	Mayor a 0.990	St1: 0.999430 St2: 0.999767	Conforme
Coeficiente de variación de los factores de respuesta	No mayor a 5%	0.903	Conforme
Valor t experimental para un valor p de 0.005 (0.5%)	Mayor que el valor t de la tabla para comprobar que el valor b tiene una probabilidad del 99.5% de ser diferente de cero (tabla = 7.45)	St1: 132.4426 St2: 207.2065	Conforme
1.2 LINEALIDAD DE MUESTRA			
Coeficiente de correlación (r)	Mayor a 0.995	0.9999959	Conforme
Coeficiente de determinación (r ²)	Mayor a 0.990	0.9999918	Conforme
Coeficiente de variación de los factores de respuesta	No mayor a 5%	0.229	Conforme

Valor t experimental para un valor p de 0.005 (0.5%)	Mayor que el valor t de la tabla para comprobar que el valor b tiene una probabilidad del 99.5% de ser diferente de cero (tabla = 127.32)	1105.5436	Conforme
2. SELECTIVIDAD			
Lectura del blanco	Máximo 0.5% de la lectura de la muestra	0.0%	Conforme
Lectura del placebo	Máximo 0.5% de la lectura de la muestra	0.0%	Conforme
Pureza del pico	Mayor del 97%	101.80%	Conforme
Pureza de pico de muestra estresada	Mayor del 97%	100.55%	Conforme
3. PRECISION			
3.1 REPETITIVIDAD			
Coeficiente de variación o desviación estándar relativa para drogas activas	Menor al 2%	1.00	Conforme
3.2 REPRODUCTIBILIDAD			
Coeficiente de variación o desviación estándar relativa para drogas activas	Menor al 3%	0.05	Conforme

PRUEBAS EFECTUADAS	ESPECIFICACION	RESULTADO	CONCLUSIÓN
4. EXACTITUD			
Recuperación promedio	Mayor del 97%	98.52%	Conforme
Valor t experimental para un valor p de 0.005 (0.5%)	Menor que el valor t de la tabla para n-1 grados de libertad, es decir que se tendrá una probabilidad del 95% de ser exacto (t de tabla = 2.306)	2.20	Conforme
5. ROBUSTEZ			
Coefficiente de variación o desviación estándar relativa para drogas activas	Menor al 2%	0.01	Conforme

5.4. RESULTADOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

OBJETIVO.

Garantizar que los productos manufacturados se encuentren dentro de sus especificaciones hasta la fecha de expira o caducidad.

METODOLOGÍA.

Estabilidad acelerada (condiciones extremas según USP 27)

$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} + 75\% \text{ HR} \pm 5\%$

$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} + 60\% \text{ HR} \pm 5\%$

Estabilidad continua (condiciones ambientales)

$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} + 60\% \text{ HR} \pm 5\%$

PROCEDIMIENTO

Se seleccionan 3 lotes y se analiza con la frecuencia detallada en los cuadros siguientes, así tenemos los siguientes lotes:

1. Ketorolaco trometamina 10 mg / tabletas

Lote : 010010

INICIO	1er. MES		3er. MES			6to. MES			12vo. MES
	25°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C
10.16	10.30	10.08	10.35	10.28	10.13	10.21	10.31	10.14	10.22

2. Ketorolaco trometamina 10 mg / tabletas

Lote : 010020

INICIO	1er. MES		3er. MES			6to. MES			12vo. MES
	25°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C
10.05	10.02	10.08	10.13	10.27	10.18	10.10	10.09	10.06	10.14

3. Ketorolaco trometamina 10 mg / tabletas

Lote : 012030

INICIO	1er. MES		2do. MES			3er. MES			12vo. MES
	25°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C	25°C
9.91	10.01	9.96	9.92	10.02	9.82	9.89	9.90	9.82	9.90

Datos obtenidos de análisis realizados a los respectivos lotes en el período indicado, que se incluyen en los estudios de estabilidad.

VI. DISCUSIÓN

1. En el desarrollo de este trabajo se obtuvieron diferencias en la longitud de onda obteniendo una longitud de 254 nm en comparación con la Farmacopea Estadounidense 31, al cuál es a 313 nm, puedo indicar que dicho resultado también fue encontrado en un primer paso pero luego descartado debido a que no era posible determinar un resultado positivo frente a la fase móvil propuesta
2. La Farmacopea Estadounidense 31 también difiere en el tipo de columna la cuál indica ser una de tipo Octosilcilano, en comparación con una Octadesilcilano utilizado en este trabajo y que permitió tener un buen pico gaussiano frente a la fase móvil propuesta
3. La temperatura ha sido otro parámetro a variar, se ha trabajado a 30°C en contraste con lo indicado en la Farmacopea Estadounidense 31 que es a 40°C, considerándose así debido a que se evitan posibles variaciones en los tiempos de retención por efecto de una pequeña variación en la temperatura.
4. En comparación con el trabajo realizado por el Br. William Guerra en el año 2003, el cual indica una recuperación del 100.14%, puedo indicar que este parámetro de validación refleja como la técnica analítica es capaz de cuantificar un valor teórico conocido aceptando un valor mínimo del 97% según lo indicado por la Farmacopea Estadounidense 31 y nuestros resultados sobrepasan este valor, el cuál es de 98.52%, pero esto es una condición dependiente y propia de cada técnica a desarrollar

5. Los resultados obtenidos en la validación del presente trabajo tienen coincidencias con lo obtenido por el Br. Roxana Romero Rodas, los cuales se detallan: coeficiente de correlación en linealidad de estándar de 0.99979 y 0.99959, siendo el mínimo de 0.995, coeficiente de correlación en linealidad de muestra de 0.9999996 y 0.99991, siendo el mínimo de 0.995, selectividad de 101.8% y 100.2%, siendo el mínimo del 97%, repetitividad de 1 y 1.5, siendo el máximo de 2, reproductibilidad de 0.05 y 1.7, siendo máximo 3 y exactitud de 98.52% y 99.9%, siendo mínimo del 79% respectivamente.

VII. CONCLUSIONES

1. Para la técnica analítica alternativa de cuantificación de ketorolaco Trometamina se debe de utilizar una columna tipo Octadecilsilano, a una longitud de onda de 254 nm, con fase móvil de agua, metanol, ácido acético (55:44:1), a una velocidad de flujo de 1.2 ml/min y temperatura de 30°C
2. Los parámetros en la validación determinaron los valores de linealidad de estándar con su coeficiente de correlación de 0.999, selectividad a 101.8% de pureza y exactitud al 98.52%, siendo nuestras especificaciones mínimas de 0.995 y 97% para las 2 últimas respectivamente, y el parámetro de repetitividad con valor de 1 y reproductibilidad con valor 0.05, siendo nuestra especificación máxima de 2 y 3% respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Para toda elucidación se debe de tomar en cuenta las características estructurales del compuesto, es decir qué grupos funcionales posee, en nuestro caso es un compuesto derivado del ácido Pirrolizin Carboxílico (1H-pirrolizina-1-ácido carboxílico,5-benzoil-2,3dihidro), sus posibles reacciones con los solventes como sucede con acetonitrilo puro y tetrahidrofurano puro, de esta forma y con ayuda bibliográfica el trabajo se orientará hacia caminos más seguros.
2. Un compuesto podría ser detectado por muchos solventes o mezclas de ellos para determinar bajo que longitud de onda nos brinda un espectro confiable, es decir es detectado, es recomendable realizar una exposición del estándar al espectro de luz ultravioleta siendo positivo en este trabajo los solventes metanol, agua, etanol, agua/ acetonitrilo y agua/tetrahidrofurano
3. Considerar varias alternativas en relación al costeo del análisis, es decir de los reactivos, materiales, tiempo de uso de equipos y las horas de trabajo del analista, con el objeto de maximizar la utilización de los recursos.
4. Para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura se hace necesario validar toda técnica, esto con el objeto de determinar si es viable su utilización en análisis posteriores, siendo esta técnica propuesta validada cumpliendo con los requerimientos de la farmacopea Americana
5. Continuar con el desarrollo de nuevas técnicas analíticas alternativas y su consecuente validación para aquellos principios activos que en alguna forma farmacéutica no presente una técnica analítica acorde con la realidad de los laboratorios peruanos.

ANEXOS

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **ALBARRACÍN Celis, Gladys.** Desarrollo y Validación del Método Analítico para la determinación de Pseudoefedrina Clorhidrato e Ibuprofeno por HPLC en tabletas recubiertas. UNMSM. 1999
2. **BRITISH PHARMACOPOEIA.** British Pharmacopoeia Commission. 2010
3. **BENEITEZ Palomeque, Enrique.** GOOD MANUFACTURING PRACTICE. Centro de Estudios Superiores de la Industria Farmacéutica. Madrid. 1996
4. **GUERRA Bernal, William.** Desarrollo y validación de una técnica analítica para el dosaje de Fluconazol en tabletas por HPLC. UNMSM. 2003
5. **FARMACOPEA ESPAÑOLA.** Real Farmacopea Española. 2004
6. **GEIGY, J. R.** Tablas científicas. J.R. Geigy. Suiza. 1985
7. **OWEN, Tomy.** Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy. Copyright Hewlett-Packard Company. 1996
8. **PRETSCH, E.** Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Editorial Alambra. 1980

9. **ROMERO Rodas, Roxana.** Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación Cuantitativa de Cisaprida en tabletas. USCH. 2004
10. **SNYDER AND KIRLAND.** Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, INC. 1997
11. **THE INDEX MERCK.** Merck & Co., INC Whitehouse. New York-USA. 20 Edición. 1996
12. **VALDEZ Arana, Natalí - CUADROS Quiroz, Erick.** Validación de método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC y estudio comparativo in vitro de las diferentes marcas del producto comercializado en el país. UNMSM. 1999
13. **UNITED STATES PHARMACOPEIA 32.** United States Pharmacopeia convention, INC. 2010
14. **WILLARD, M. D.** Métodos instrumentales de análisis. Editorial. Continental SA. 1990