



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**DETERMINACIÓN POR CLAR DE LA VALORACIÓN Y
UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE INDOMETACINA
EN MATRICES SOL-GEL**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA
HUMBERTO DANIEL RODRIGUEZ GASPAR

DIRECTOR
Dr. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

ASESOR
M. en C. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ

México D.F. a 03 de Junio del 2013



AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IT119211 “Matrices de componentes híbridos preparadas por el método sol-gel, para desarrollar dispositivos de liberación controlada de principios activos”, por lo que se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mis padres el haberme enseñado que cuando uno quiere algo, no te lo regalan, se trabaja duro para conseguirlo.

Agradezco a mis maestros, buenos y malos, porque me aportaron el conocimiento o el poco conocimiento que quisieron transmitir.

Agradezco al LIF y a los profesores que lo integran porque es un laboratorio donde adquieres una formación sólida para tu vida profesional, además de que me llevo grandes amistades y enseñanzas muy placenteras.

Agradezco a la UNAM, por haberme abierto sus puertas y darme los conocimientos y las herramientas para poder desarrollarme como persona y como universitario.

Agradezco a mis compañeros que no desistieron en apoyarme y que estuvieron ahí para obtener logros a lo largo de la carrera, y el conocimiento compartido con ellos.

“La calificación a veces no interesa, lo que importa es el conocimiento que lleves en la cabeza”

Contenido

1 INTRODUCCIÓN	1
2 Marco teórico	2
2.1 MONOGRAFÍA DE INDOMETACINA	2
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas	2
2.1.2 indicaciones terapéuticas	2
2.1.3 Mecanismo de acción	3
2.2 Validación de métodos analíticos	3
2.3 Cromatografía de líquidos	4
2.3.1 Tipos de cromatografía	5
2.3.1.1 Cromatografía en fase normal	5
2.3.1.2- Cromatografía en fase reversa.	5
2.3.1.3 Cromatografía de intercambio iónico	6
2.3.1.4 Cromatografía de líquidos por filtración en gel o exclusión	6
2.3.2 Componentes del cromatógrafo de líquidos de alta resolución	7
2.4 Parámetros cromatográficos	8
2.4.1 Factor de capacidad	8
2.4.2 Factor de coe o asimetría (T_f)	9
2.4.3- Volumen muerto V_M	9
2.4.4 Número de platos teóricos (N)	10
2.4.5 Tiempo de retención (t_R)	10
2.4.6- Resolución (R_s)	10
2.5 Proceso Sol-Gel	12
2.5.1 Ventajas	12
2.5.2 Desventajas	12
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4 OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
5 HIPÓTESIS	13

6 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
6.1 Tipo de estudio	13
6.2 Población objetivo	14
6.3 Población a estudiar.....	14
6.4 Criterios de inclusión	14
6.5 Criterios de exclusión.....	14
7 DESARROLLO EXPERIMENTAL	14
7.1 Materiales	14
7.2 Reactivos	14
7.3 Equipos e instrumentos	15
7.4 Metodología.....	15
7.4.1 Determinación de la longitud de onda y fase móvil	15
7.4.2 Determinación del estándar interno	16
7.4.3 Validación del sistema de medición	16
7.4.3.1 Linealidad del sistema.....	16
7.4.3.2 Precisión del sistema	17
7.4.3.3 Adecuabilidad del sistema	17
7.4.4 Validación del método de medición	18
7.4.4.1 Linealidad del método	18
7.4.4.2 Precisión del método	19
7.4.4.3 Exactitud del método.....	19
7.4.4.4 Precisión intermedia	19
7.4.4.6 Límite de cuantificación	19
7.4.4.5 Límite de detección.....	20
7.4.4.7 Robustez	20
7.4.5 Valoración de las matrices Sol-Gel	20
Fase móvil	20
Preparación de la referencia.....	20
Condiciones del equipo.....	21

Preparación de la muestra.....	21
Procedimiento.....	21
8 RESULTADOS	23
8.1- Determinación de fase móvil, longitud de onda y estándar interno	23
8.2- Linealidad del sistema	26
8.3 Precisión del sistema	28
8.4 Adecuabilidad del sistema	28
8.5- Linealidad del método	30
8.6 Precisión del método	31
8.7 Precisión intermedia	31
8.8- Exactitud del método.....	34
8.9 Límite de cuantificación y límite de detección	35
8.10 Robustez.....	37
8.11 Valoración y uniformidad de contenido	38
ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
9.1 Determinación de fase móvil, longitud de onda y estándar interno.....	40
9.2 Linealidad del sistema.....	40
9.3 Precisión del sistema	40
9.4- Adecuabilidad del sistema	41
9.5 Linealidad del método	41
9.6 Precisión del método	41
9.7- Precisión intermedia.....	42
9.8 Exactitud del método.....	42
9.9 Límite de cuantificación y límite de detección	43
9.10 Robustez.....	43
9.11- Valoración y uniformidad de contenido	44
CONCLUSIONES	46
Referencias.	47

1 INTRODUCCIÓN

La indometacina es un antiinflamatorio no esteroideo, analgésico y antipirético. Se usa frecuentemente en el tratamiento de los síntomas de la artritis reumatoide, o dolores musculares e inflamación. La vía de administración usualmente es oral, pero puede administrarse por vía intravenosa, rectal o tópica. De manera general, los antiinflamatorios son irritantes a la mucosa gástrica, por lo que se busca que las formas farmacéuticas diseñadas no causen más problemas que beneficios. Existe un proceso por el cual se pueden diseñar nuevas formas farmacéuticas llamado sol-gel.

El proceso sol-gel es una ruta química que inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido (sol) y la hidrólisis y condensación de éste sol para formar un material sólido lleno de solvente (gel). El solvente se extrae al gel simplemente dejándolo reposar a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo llamado envejecimiento, en el cual el gel se encogerá expulsando el solvente y agua residual.

Los métodos analíticos son de gran importancia en el desarrollo y evolución de la industria química, especialmente en el área farmacéutica, ya que en ésta ha sido necesario desarrollar métodos analíticos para poder llevar a cabo la determinación de compuestos y productos de interés. Debido a esto es importante que todo método desarrollado sea validado, éste es un paso crítico ya que mediante esto se asegura la calidad y confianza de los resultados obtenidos al emplear el método.

En la validación se consideran parámetros para evaluar si el método es reproducible y confiable, algunos de ellos son:

Linealidad, exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, tolerancia, robustez, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra.

Al evaluar el método con estos parámetros, se determina si cumple o no para lo que fue diseñado.

Este trabajo se enfoca en determinar la valoración y uniformidad de contenido de indometacina en matrices sol-gel, mediante un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución diseñado para este fin.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 MONOGRAFÍA DE INDOMETACINA^{1, 2}.

Nombre químico: 1-(4-Clorobenzoi)-5-metoxi-2-metilindol-3-acético

Fórmula condensada: C₁₉H₁₆ClNO₄

Peso molecular: 357.79 gramos

Punto de fusión: presenta polimorfismo, uno funde a 155°C y el otro a 162°C

Estructura química³.

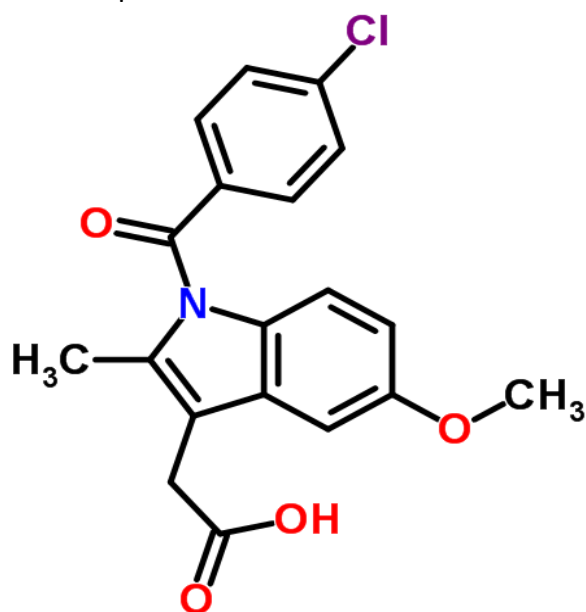


Figura 1. Estructura química de indometacina.

pH de máxima estabilidad: 4.9

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas^{2, 4}.

Descripción: Polvo cristalino blanco o amarillo. Presenta polimorfismo.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua; soluble 1 en 50 partes de etanol, 1 en 30 partes de cloroformo y 1 en 40 partes de éter. Proteger de la luz.

2.1.2 indicaciones terapéuticas^{4, 5}.

La indometacina es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo y antipirético. Se usa frecuentemente en el tratamiento de los síntomas de la artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. La vía de administración usualmente es oral, pero puede administrarse por vía intravenosa, rectal o tópica.

2.1.3 Mecanismo de acción⁴.

Su efecto se basa en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en tejidos periféricos y en la inhibición de la migración leucocitaria a las áreas inflamadas.

2.2 Validación de métodos analíticos.

La validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumpla consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas⁶. Según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, los métodos analíticos deben ser validados, de igual manera se debe de contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

La validación de métodos analíticos es la evidencia documentada, obtenida a partir de datos experimentales, donde se demuestra que el método satisface los requisitos para lo que fue diseñado. Los parámetros para una validación de un método son los siguientes:

Linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, tolerancia y robustez. Estas pruebas se realizan de acuerdo al tipo de método analítico, ya que se clasifican de la siguiente manera:

Categoría I: Métodos empleados para la cuantificación de principios activos y materias primas incluyendo conservadores y productos a granel.

Categoría II: Métodos para la determinación de impurezas en materias primas o en productos a granel. Las impurezas pueden ser productos de descomposición, síntesis, componentes volátiles, etc. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y cualitativos.

Categoría III: Métodos para la determinación de características funcionales como disolución o liberación del activo.

Categoría IV: Pruebas de identificación.

En la siguiente tabla se muestran los parámetros que se evalúan en cada categoría^{6, 7, 8}.

Tabla 1. Parámetros que se evalúan en cada categoría de tipo de método analítico.

PARAMETRO DE DESEMPEÑO	ENSAYO (CONTENIDO / POTENCIA)	PRUEBAS DE IMPUREZA		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRESICIÓN INTERMEDIA	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LIMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

Otro parámetro que se encuentra asociado a la precisión en la adecuabilidad del sistema, que es la verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a los criterios pre establecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico⁶.

2.3 Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR por sus siglas en español y HPLC en inglés) ha tenido una creciente difusión desde los comienzos de la década de los setentas del siglo XX, y hoy representa una de las técnicas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.

La IUPAC define cromatografía como: una técnica usada primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar

extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa⁹.

2.3.1 Tipos de cromatografía^{9, 10, 11, 12}

Los tipos de cromatografía de líquidos también se clasifican según el tipo general de interacción que se produce entre la fase estacionaria y los solutos en el eluyente. Se clasifican como cromatografía en fase normal, fase reversa, de intercambio iónico y de filtración en gel o exclusión.

2.3.1.1 Cromatografía en fase normal

Esta se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares.

2.3.1.2- Cromatografía en fase reversa.

En esta cromatografía la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se emplean dos tipos fundamentales de fases estacionarias y las más comunes son grupos no polares enlazados con la sílica. Entre los más utilizados son los grupos orgánicos, de este modo los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil a semejanza de una extracción líquido-líquido.

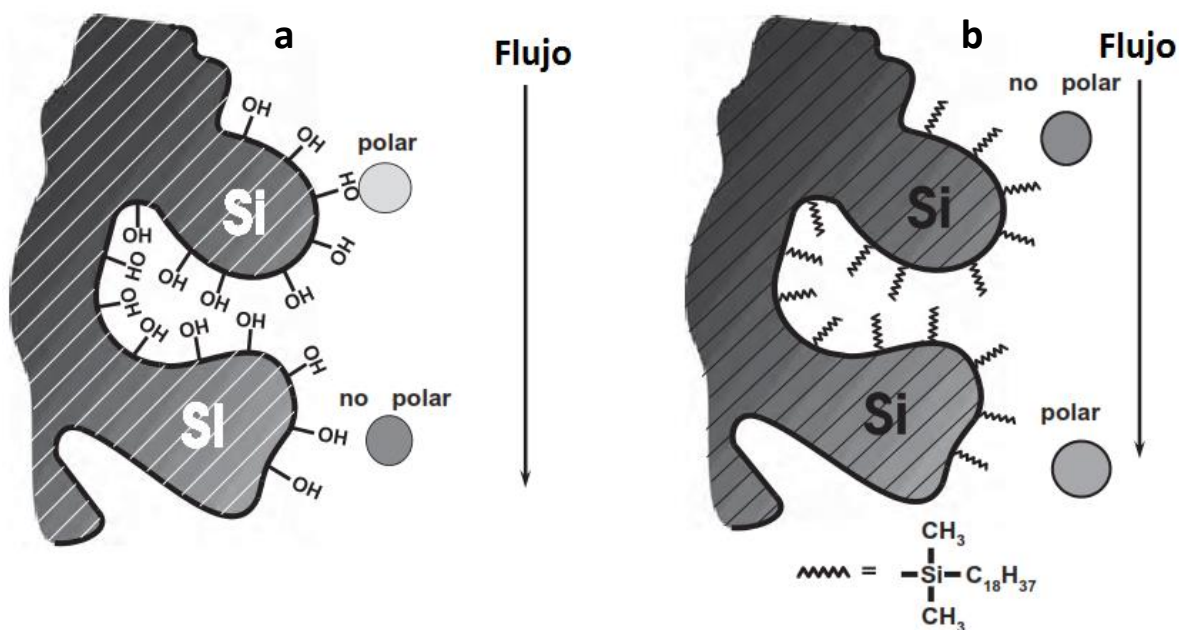


Figura 2. Diagramas que representan las formas de separación, a) Cromatografía en fase normal y b) Cromatografía en fase reversa.¹⁰

2.3.1.3 Cromatografía de intercambio iónico

En este tipo se utilizan fases estacionarias que tienen cargas enlazadas a las que se les denomina de intercambio iónico. Las fases estacionarias formadas por polímeros entrecruzados con cargas negativas fijas se intercambian con iones positivos, llamándose resinas de intercambio catiónico; y los polímeros con cargas positivas enlazadas covalentemente sobre ellos intercambian iones negativos y se llaman resinas de intercambio aniónico.

2.3.1.4 Cromatografía de líquidos por filtración en gel o exclusión

La separación se basa en el tamaño de las moléculas. La fase estacionaria que se emplea es un sólido con poros de corte transversal controlado (con todo el cuidado y precisión posibles). La permeación se produce a través de los poros de las partículas empacadas en las columnas. La separación se produce porque sólo las partículas más pequeñas penetran a los poros y son removidas de la fase móvil que fluye. De este modo las moléculas mayores se eluyen en primer lugar, seguidas por las más pequeñas.

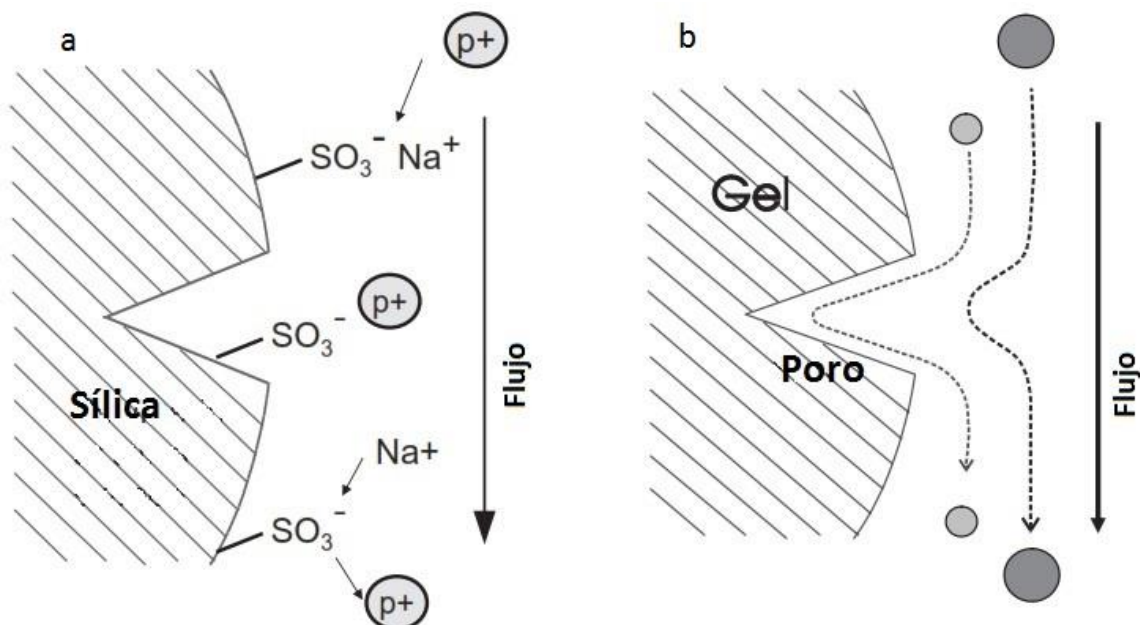


Figura 3. Diagramas que representan las formas de separación, a) Cromatografía de intercambio iónico donde se cambian los iones p^+ por Na^+ y b) Cromatografía de exclusión que muestra la migración de las moléculas más grandes.¹⁰

2.3.2 Componentes del cromatógrafo de líquidos de alta resolución^{9, 10}

Un depósito contiene el disolvente o fase móvil. Una bomba de alta presión es el sistema de distribución del disolvente, por lo general mililitros por minuto. Un inyector de muestras automático, que es capaz de inyectar la muestra en el flujo continuo de fase móvil que lleva la muestra en la columna de HPLC. La columna contiene el material de embalaje de cromatografía necesario para efectuar la separación. Este material de embalaje se llama fase estacionaria, ya que se mantiene en su lugar por el hardware de la columna. Un detector que se necesita para ver a los compuestos separados, ya que salen del detector se envía a residuos.

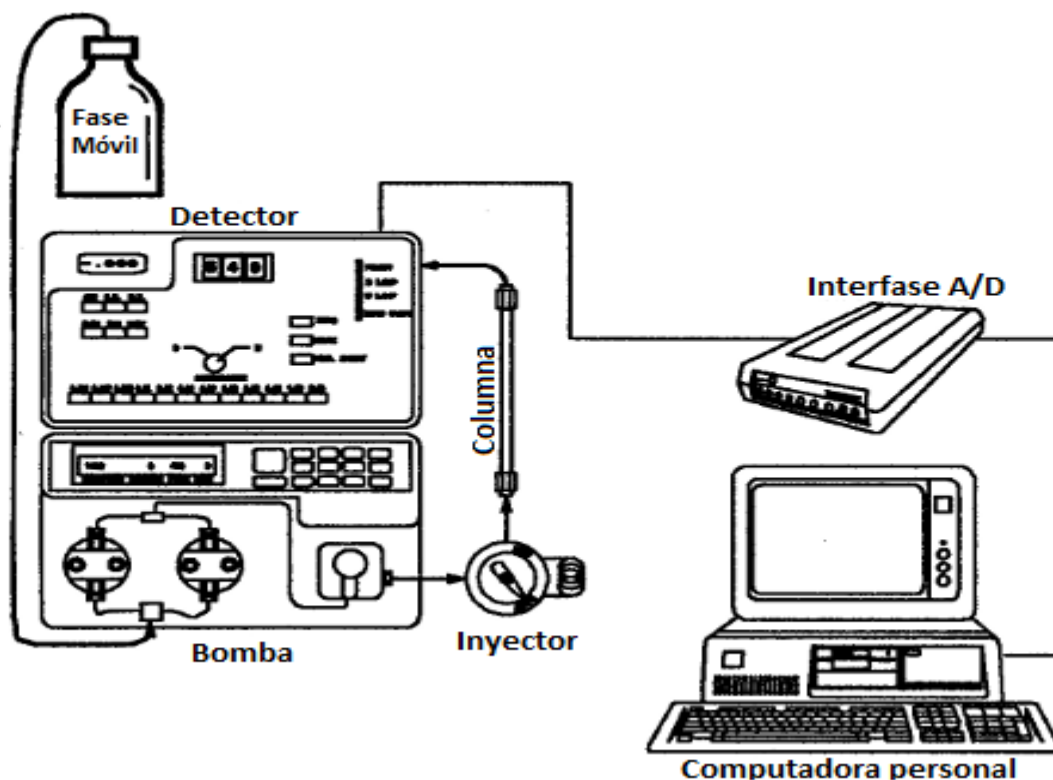


Figura 4. Componentes del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.⁹

2.4 Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos son los que a continuación se describen.

2.4.1 Factor de capacidad¹⁰

Es una medición del tiempo de retención de una muestra, con respecto al tiempo del volumen muerto de la columna. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$K' = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{ó} \quad K' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Donde:

k' = Factor de capacidad

t = Tiempo de retención, medido desde el punto de inyección al pico máximo.

t_0 = Tiempo de retención, medido desde el punto de inyección al volumen muerto del frente del solvente.

Los valores de K' menores a uno indican que la muestra no es retenida por la fase estacionaria de la columna y da como resultado separaciones muy pobres. Generalmente el resultado deseado debe ser mayor a dos.

2.4.2 Factor de coleo o asimetría (T_f)^{10, 12}

Una medida de la simetría del pico, tiene un valor de uno (1) para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. En algunos casos pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la simetría del pico, la integración y la precisión son menos confiables. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$T_f = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

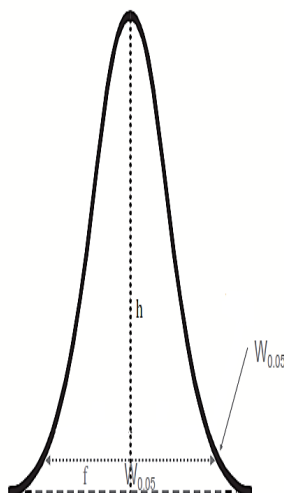


Figura 5. Medición del factor de coleo o asimetría.¹⁰

Donde:

$W_{0.05}$ = Ancho del pico al 5% de la altura.

f = Distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, al 5% de la 0.05 altura del pico desde la línea base.

h = Altura del pico.

2.4.3- Volumen muerto V_M ¹²

Volumen de fase móvil necesario para desplazar un soluto no retenido desde el inyector al detector. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$V_M = 0.65 \pi r^2 L$$

Donde:

V_M = Volumen muerto.

0.65 = Factor de constante.

π = Pi (3.1416).

r = Radio de la columna en centímetros.

L = Longitud de la columna en centímetros.

2.4.4 Número de platos teóricos (N)^{14, 15}

Medida de la eficiencia de la columna. El valor de (N) depende de la sustancia que se realiza y las condiciones de operación como la velocidad de flujo y el largo de la columna.

La forma de calcular los platos teóricos es:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Donde:

t_R = Es tiempo de retención de la muestra.

W = Es ancho del pico del cromatograma.

El valor de platos teóricos para determinar que una columna tiene buena eficiencia es de más de 2000 platos teóricos.

2.4.5 Tiempo de retención (t_R)¹⁴

El tiempo (en minutos) que una muestra requiere para eluir. Este es medido desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico. Es característico para cada muestra, según el solvente utilizado y el empaque de la columna, a una temperatura dada. Se utiliza como ayuda para la identificación de los componentes.

2.4.6- Resolución (R_s)¹⁰

Es una medida del grado de separación de dos analitos adyacentes. Se define como la diferencia en los tiempos de retención de los dos picos dividido por el promedio de las anchuras de los picos.

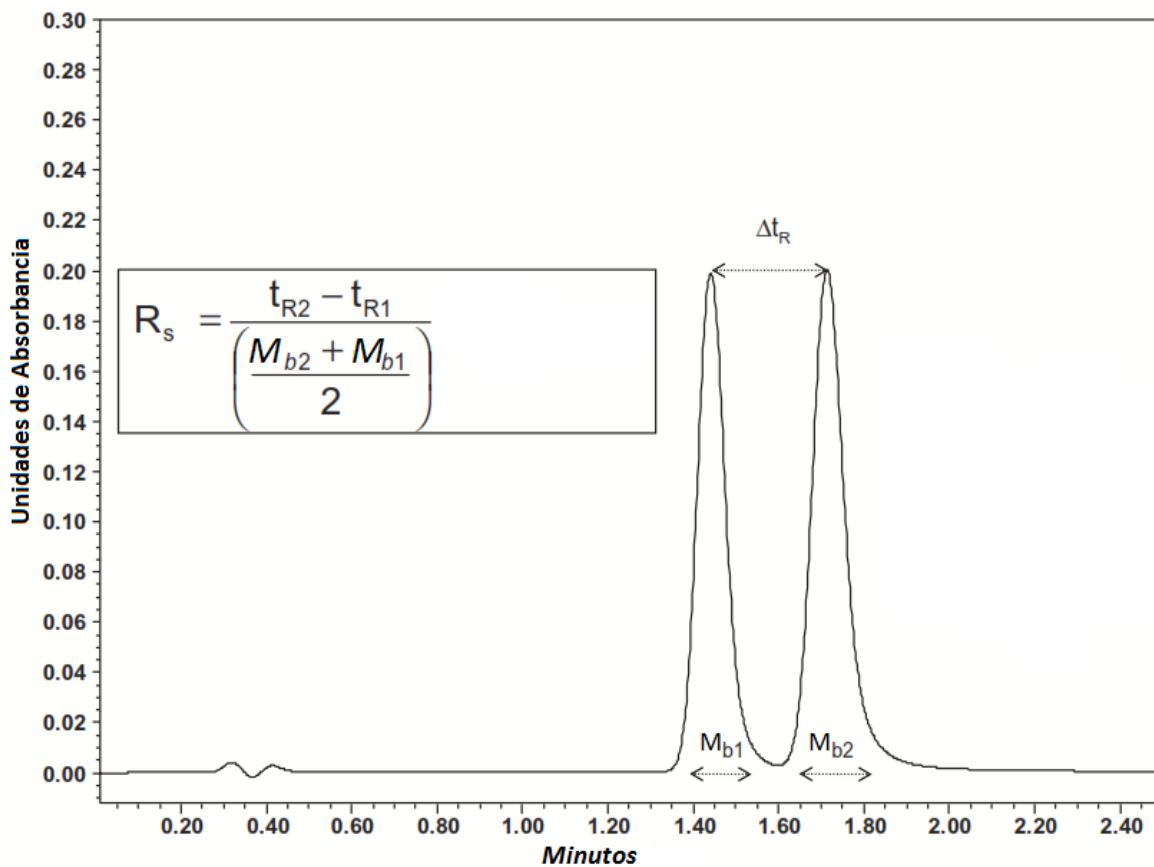


Figura 6. Medición del factor de resolución.¹⁰

Donde:

t_{R1} : Es el tiempo de retención de la muestra que aparece primero en el cromatograma.

t_{R2} : Es el tiempo de retención de la muestra que aparece después de la primera muestra en el cromatograma.

M_{b1} : Ancho del pico de la muestra que aparece primero en el cromatograma.

M_{b2} : Ancho del pico de la muestra que aparece después de la primer muestra en el cromatograma.

2.5 Proceso Sol-Gel.

El método Sol-Gel se desarrolló como una alternativa tecnológica para la preparación de vidrios y cerámicos a temperaturas considerablemente bajas¹⁶. Es una ruta química que inicia con la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido (Sol) y la hidrólisis y condensación de éste sol para formar un material sólido lleno de solvente (Gel). Cuando la reacción de polimerización va más allá, se forman cadenas, anillos, y redes tridimensionales adicionales, y se forma un gel que comprende agua, el alcohol del grupo alcoxi y el propio gel¹⁷. El sol también puede contener otros aditivos tales como ácidos o bases usados para la catálisis de la reacción. Si ahora se extraen el alcohol y el agua del gel mediante lavado y evaporación, se obtiene un xerogel. Este proceso tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos ya que se está implementando como una nueva forma de liberación modificada. La velocidad de liberación del fármaco se controla mediante difusión a través de los poros del material matriz.¹⁸

2.5.1 Ventajas

El proceso sol-gel es atractivo principalmente porque en un principio ofrece las siguientes ventajas:

- Se puede obtener gran variedad de estructuras que determinan diferentes y múltiples aplicaciones¹⁹.
- Manejar temperaturas bajas permite un ahorro de energía y un mejor control de la cinética de las reacciones.²¹
- Presenta la capacidad de encapsular dentro del material, enzimas, tintes ópticamente activos, fármacos, etc.
- Obtención de homogeneidad a nivel nanométrico, lo que permite evitar la formación de defectos y hacer posible la síntesis de mezclas moleculares multicomponentes²⁰.

2.5.2 Desventajas

El proceso sol-gel también presenta ciertas desventajas, como por ejemplo:

- El costo del proceso es alto, ya que los precursores empleados son caros²⁰.
- Aún no existe mucha relación entre los desarrollos tecnológicos y el proceso sol-gel.
- Problemas de encapsulación de materiales en grandes concentraciones.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son fármacos muy utilizados en México y a nivel mundial, ya que son empleados para muchos padecimientos que van desde un simple golpe o inflamación, hasta enfermedades como artritis reumatoide o espondilitis anquilosante. Estos fármacos tienen en común un efecto adverso, que es la irritación gastrointestinal, por ello se diseñan diferentes formas farmacéuticas para evitar ese efecto. El desarrollo de nuevas formas farmacéuticas requiere diseñar nuevos métodos para su cuantificación, y en la actualidad es ampliamente utilizada la cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de muchas materias primas. Es por ello que se busca diseñar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar la valoración y uniformidad de contenido de indometacina en matrices sol-gel.

4 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la valoración y uniformidad de contenido de indometacina en matrices sol-gel, mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución.

Objetivo particular

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar la valoración y uniformidad de contenido de indometacina en matrices Sol-Gel.

5 HIPÓTESIS

El método analítico propuesto cumplirá con los criterios de validación y servirá para la determinación de valoración y uniformidad de contenido de indometacina en matrices sol-gel.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

Actitud del investigador: Experimental.

Forma de recolección de información: Prospectivo.

Secuencia temporal de estudio: Transversal.

6.2 Población objetivo

Matrices inorgánicas sol-gel de indometacina de 50mg.

6.3 Población a estudiar

Matrices inorgánicas sol-gel de indometacina de 50 mg elaborados en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la FES Zaragoza.

6.4 Criterios de inclusión

Matrices inorgánicas sol-gel de indometacina de 50 mg traslúcidas.

6.5 Criterios de exclusión

Matrices inorgánicas sol-gel de otro principio activo, que presenten opacidad.
Se corra la muestra a una velocidad de flujo diferente.

7 DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1 Materiales

- Vasos de precipitados de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Matraces aforados de 10, 50, 100 y 200 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- Probetas graduadas de 100, 200, 500 y 1000 mL.
- Equipo de filtración para soluciones acuosas.
- Equipo de filtración para solventes orgánicos.
- Viales de vidrio con tapa.
- Bureta de 10 mL.
- Soporte universal.
- Pinzas dobles de presión.
- Charolas de plástico.
- Papel glassine.

7.2 Reactivos

- Agua desionizada marca Teissier, filtrada en el equipo Milli-Q.
- Metanol grado HPLC marca Honeywell, lote DG024.
- Fosfato monobásico de potasio marca J.T. Baker, lote G13C22.
- Fosfato dibásico de potasio marca J.T. Baker, lote C13C00.
- Indometacina marca Retecma, lote T04-021.
- Ketorolaco marca Retecma, lote KL0290801.

7.3 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Varian Prostar, con bomba modelo 24, un inyector modelo 410, un detector UV-Visible modelo 325 LC, acoplado a una computadora Dell modelo DHM con software Galaxie Chromatography Workstation versión 1.8.504.1.
- Columna 150mm de largo por 4.6mm de ancho, con un tamaño de partícula de 5 μ m.
- Sonicador marca VWR, modelo 75D.
- Equipo de filtración de agua Milli-Q marca Milipore.
- Bomba de vacío marca GAST.
- Balanza analítica Marca Ohaus, Explorer Pro, modelo EP214C.
- Micro balanza Mettler Toledo, modelo MT5.

7.4 Metodología.

7.4.1 Determinación de la longitud de onda y fase móvil

De acuerdo con las propiedades, físicas y químicas del analito, se buscó la fase móvil adecuada para poder usarla en el cromatógrafo y tener picos definidos para su cuantificación, la fase tenía que estar cerca del pH de máxima estabilidad de la indometacina y se decidió usar una solución amortiguadora de fosfatos pH 3 con metanol. Se prepararon las fases móviles en diferentes proporciones como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Proporciones de la fase móvil para determinar la longitud de onda.

Fase móvil	
% de Metanol	% de solución amortiguadora
75	25
80	20

Se pesaron 350 μ g de indometacina por duplicado y se aforó en un matraz de 10mL con las fases de la tabla anterior, a estas soluciones se le realizó un barrido en el espectrofotómetro UV para determinar la longitud de onda máxima.

Posteriormente, se realizaron pruebas en el cromatógrafo de líquidos con una velocidad de flujo de 1.1mL/min y un volumen de inyección de muestra de 20 μ L a la longitud de onda determinada en el paso anterior, dejando el tiempo de la corrida en 10 minutos para

determinar los tiempos de retención de las muestras y con esos resultados saber cuál fase sería la más adecuada para su uso.

7.4.2 Determinación del estándar interno

Se realizaron pruebas para determinar el estándar interno para la validación del método analítico para la cuantificación de indometacina en las matrices Sol-Gel, se pesaron muestras de 350µg y de 600µg de indometacina y ketorolaco, se aforaron con las fases móviles de la tabla 3, estas muestras se inyectaron en el cromatógrafo a las 2 fases diferentes y se determinó si los picos de indometacina y ketorolaco obtenidos en el cromatograma se mostraban definidos y no se empalmaban entre sí.

7.4.3 Validación del sistema de medición

7.4.3.1 Linealidad del sistema.

Solución Stock de indometacina: Se pesaron con exactitud 25mg de indometacina y se vaciaron en un matraz volumétrico de 100mL, se agregaron 50mL de fase móvil y se sometió a ultrasonido en un baño de agua durante 1 minuto, después se aforó la solución con fase móvil.

Solución Stock de ketorolaco: Se pesaron con exactitud 10mg de ketorolaco y se vaciaron en un matraz volumétrico de 50mL, se agregaron 25mL de fase móvil y se sometió a ultrasonido en un baño de agua durante 1 minuto, después se aforó la solución con fase móvil.

Los niveles de concentración para la curva de validación de sistema son los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentraciones de los niveles de la curva de validación del sistema.*

Concentración teórica (en $\mu\text{g/mL}$)	Cantidad adicionada de la solución Stock de indometacina (en mL)	Cantidad adicionada de solución Stock de ketorolaco (en mL)
10	0.2	1
20	0.4	1
40	0.8	1
60	1.2	1
80	1.6	1
100	2	1

*Estas cantidades se aforaron a un volumen de 5mL con fase móvil y cada nivel se realizó por sextuplicado, realizando un blanco con la fase móvil.

Las condiciones del equipo fueron:

Fase móvil: 20% solución amortiguadora de fosfatos pH 3: 80% metanol.

Velocidad de flujo: 1.1mL/minuto.

Volumen de inyección: 20 μL .

Tiempo de corrida: 5 minutos.

La longitud de onda determinada anteriormente.

Se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Los criterios de aceptación que se tomaron para esta prueba fueron: el coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.98$, así como la precisión determinada por el coeficiente de variación de cada nivel de concentración $\leq 2\%$.

7.4.3.2 Precisión del sistema

Se prepararon 6 muestras como lo indica la tabla 4 a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, el coeficiente de variación obtenido para las muestras no debió ser mayor al 2%.

7.4.3.3 Adecuabilidad del sistema

De la solución estándar se prepararon 10 muestras al 100% (40 $\mu\text{g/mL}$) y se inyectaron en el cromatógrafo. La adecuabilidad del sistema debió de cumplir con un coeficiente de variación menor al 2%. Además de cumplir con los siguientes parámetros:

- Tiempo de retención de 3.0 ± 0.5 minutos.
- Asimetría menor a 2.
- Resolución igual o mayor a 2.
- Platos teóricos de la columna mayores a 2000.

7.4.4 Validación del método de medición

7.4.4.1 Linealidad del método

Se realizó por pesadas independientes de placebo de matriz Sol-Gel y de indometacina como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4. Concentraciones de los niveles de la curva de validación de método**

Concentración teórica (en $\mu\text{g/mL}$)	% de indometacina	Cantidad adicionada de indometacina (en μg)	Cantidad adicionada de matriz Sol-Gel placebo(en mg)	Cantidad adicionada de estándar de ketorolaco (en mL)
20	50	200	50	2
30	75	300	50	2
40	100	400	50	2
50	125	500	50	2
60	150	600	50	2

**Estas cantidades se aforaron a un volumen de 10mL con fase móvil, y cada nivel se realizó por sextuplicado, realizando un blanco con fase móvil.

Se determinó el coeficiente de correlación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Los criterios de aceptación que se tomaron para esta prueba fueron: el coeficiente de correlación r^2 mayor a 0.98, así como la precisión determinada por el coeficiente de variación de cada nivel de concentración menor o igual al 2%.

7.4.4.2 Precisión del método

Se prepararon 6 muestras como lo indica la tabla 5 a una concentración de 40µg/mL, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, el coeficiente de variación obtenido para las muestras no debió ser mayor al 2%.

7.4.4.3 Exactitud del método

Se prepararon los niveles de concentración de 30, 40 y 50 µg por sextuplicado como lo indica la tabla 5, tomando 40µg como el 100%, se inyectaron en el cromatógrafo. Con los resultados obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

7.4.4.4 Precisión intermedia

Se prepararon muestras de placebo cargado al 100% de activo por sextuplicado, analizadas por 2 analistas, en dos días diferentes, se analizaron 6 muestras por día de cada analista en el mismo cromatógrafo. Con los resultados se calculó el promedio general, la desviación estándar total y el coeficiente de variación del método analítico, además de realizar la tabla de ANAdeVA analista día por el modelo de factores anidados.

7.4.4.6 Límite de cuantificación

Para determinar el valor del límite de cuantificación se elaboraron diluciones a partir de la soluciones stock de la curva de linealidad del sistema, a partir de 10µg/mL se hizo la dilución a 5µg/mL y si ésta dilución aún se podía cuantificar con exactitud y precisión aceptables se realizó otra dilución, hasta que no se cumpliera la cuantificación exacta y precisa. Éste parámetro se analizó con el estadígrafo t de Student con la siguiente fórmula:

$$t_{calc} = \frac{V.T. - \bar{X}}{\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)}$$

Donde:

V.T. = es el valor teórico de la propiedad medida correspondiente a la dilución que se evalúa.

$\bar{X}$ = Promedio de las muestras analizadas por dilución.

S = desviación estándar.

n = número de determinaciones.

7.4.4.5 Límite de detección

Este se calculó en base al resultado anterior, dependiendo de cuál fuera la concentración de límite de cuantificación, la dilución siguiente que no haya cumplido con exactitud y precisión aceptables para considerarse límite de cuantificación, se consideró como límite de detección.

7.4.4.7 Robustez

Se analizaron 6 muestras de placebos cargados en el equipo variando la marca del metanol, 6 muestras para la marca Honeywell y 6 muestras para la marca J.T. Baker. El coeficiente de variación de los resultados obtenidos no debió ser mayor al 2%.

7.4.5 Valoración de las matrices Sol-Gel

Fase móvil

Metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH3 (80:20 v/v), filtrada y desgasificada.

Preparación de la referencia

Se pesaron 5mg de indometacina materia prima y 5mg de ketorolaco materia prima, se vaciaron a un matraz volumétrico de 25mL se agregaron 15mL de fase móvil, y se sometió a ultrasonido en baño de agua durante 1 minuto, se aforó la solución, de esta se toman alícuotas de 2mL y estas se aforan en matraces volumétricos de 10mL. Estas son las muestras de referencia.

Condiciones del equipo

Detector UV a 280nm, velocidad de flujo a 1.1mL/min, columna de 4.5mm x 150mm C18 y un volumen de inyección de muestra de 20µL.

Preparación del estándar interno de ketorolaco

Pesar 10mg de ketorolaco, vaciar en un matraz volumétrico de 25mL, agregar 15mL de fase móvil, someter a ultrasonido en baño de agua durante 1 minuto, aforar con fase móvil.

Preparación de la muestra

Se pesó el equivalente a 5mg de indometacina contenida en la matriz Sol-Gel, se vació en un matraz volumétrico de 25mL, se agregaron 15mL de una solución que contenía 50% de metanol y 50% solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, se sometió a ultrasonido en baño de agua durante 60 minutos, posteriormente se aforó con la solución. Se filtró la muestra con un filtro de membrana de Nylon con un tamaño de poro de 45µm, se descartaron los primeros 3mL de filtrado, se tomó una muestra de 2mL del filtrado, se vació en un matraz de 10mL, se añade 1mL de estándar interno de ketorolaco y se aforó con fase móvil. Se realizaron las muestras por sextuplicado para valoración y por decuplicado para uniformidad de contenido.

Procedimiento

Se inyectaron al cromatógrafo de líquidos las referencias y las muestras y se compararon las áreas bajo la curva de la referencia con las de la muestra y se obtuvo el % de contenido de las matrices Sol-Gel como lo indica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Contenido} = \frac{\frac{ABC \text{ IND Ref}}{ABC \text{ KET Ref}}}{\frac{ABC \text{ IND Muestra}}{ABC \text{ KET Muestra}}} \times 100$$

Donde:

ABC IND Ref: es el área bajo la curva de indometacina de la muestra de referencia.

ABC KET Ref: es el área bajo la curva de ketorolaco de la muestra de referencia.

ABC IND Muestra: es el área bajo la curva de indometacina en la muestra de matriz Sol-Gel.

ABC KET Ref y Muestra: es el área bajo la curva del ketorolaco usado como estándar interno.

8 RESULTADOS

8.1- Determinación de fase móvil, longitud de onda y estándar interno

En el cromatograma de la figura 7 se observa un pico a los 2.64 minutos, correspondiente a la indometacina en la fase móvil 80% de metanol, 20% solución amortiguadora de fosfatos pH3

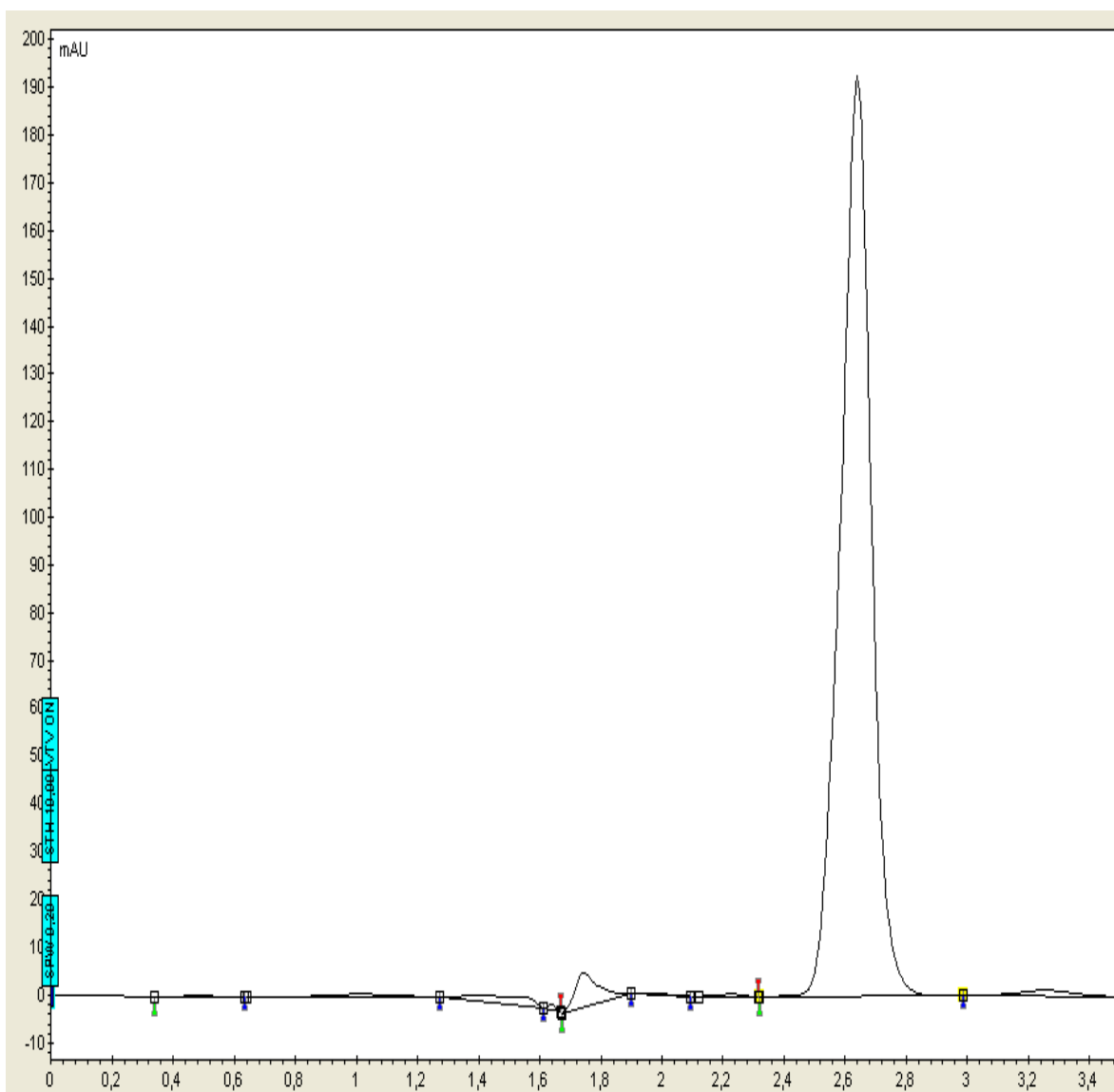


Figura 7. Cromatograma de indometacina una concentración de 40µg/mL.

Las fases móviles propuestas mostraron los siguientes cromatogramas leídos a 280nm usando muestras a una concentración de 40µg/mL y 20µL de inyección:

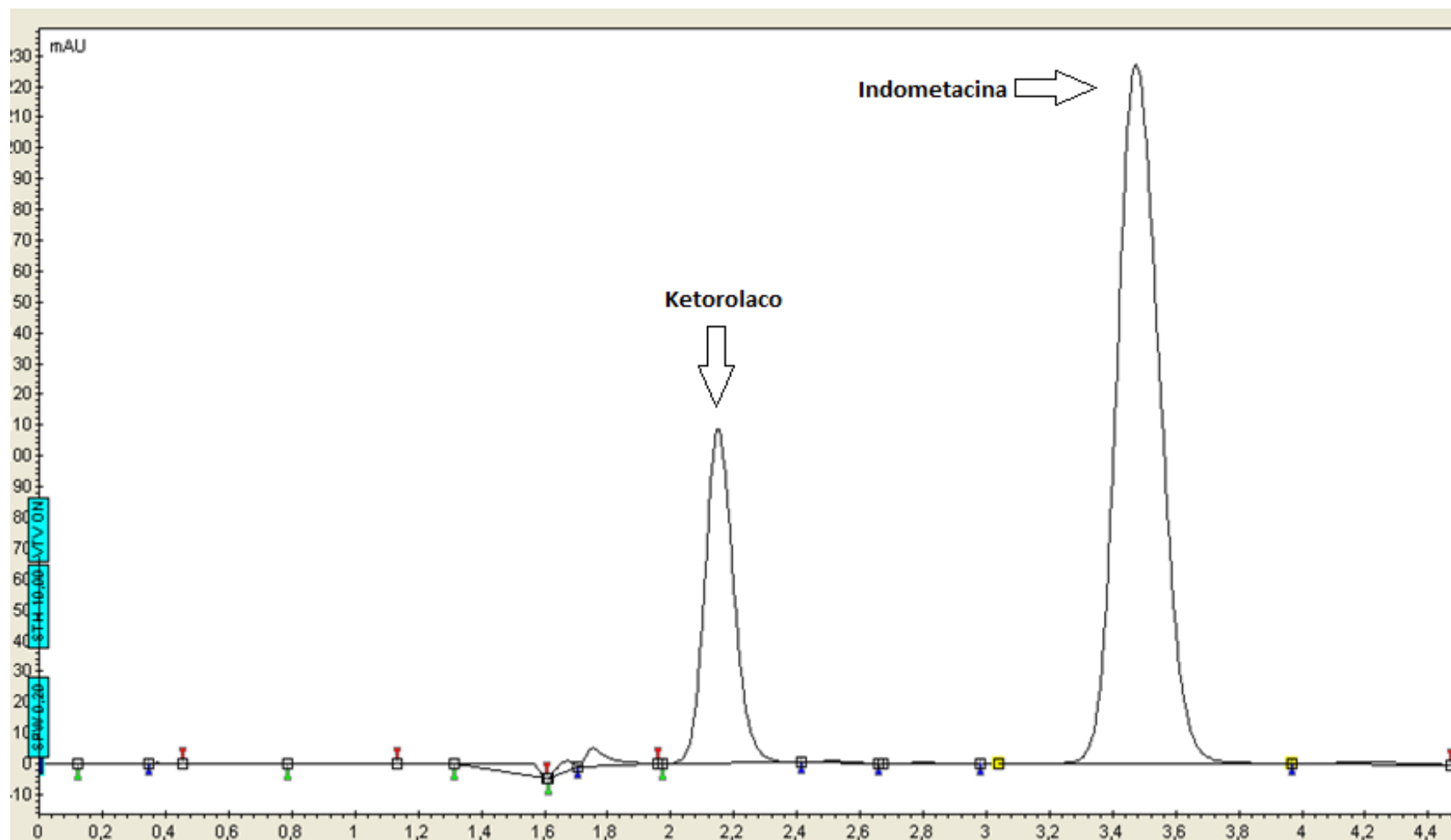


Figura 8. Cromatograma de indometacina y ketorolaco a la proporción 75% metanol, 25% solución amortiguadora de fosfatos pH 3

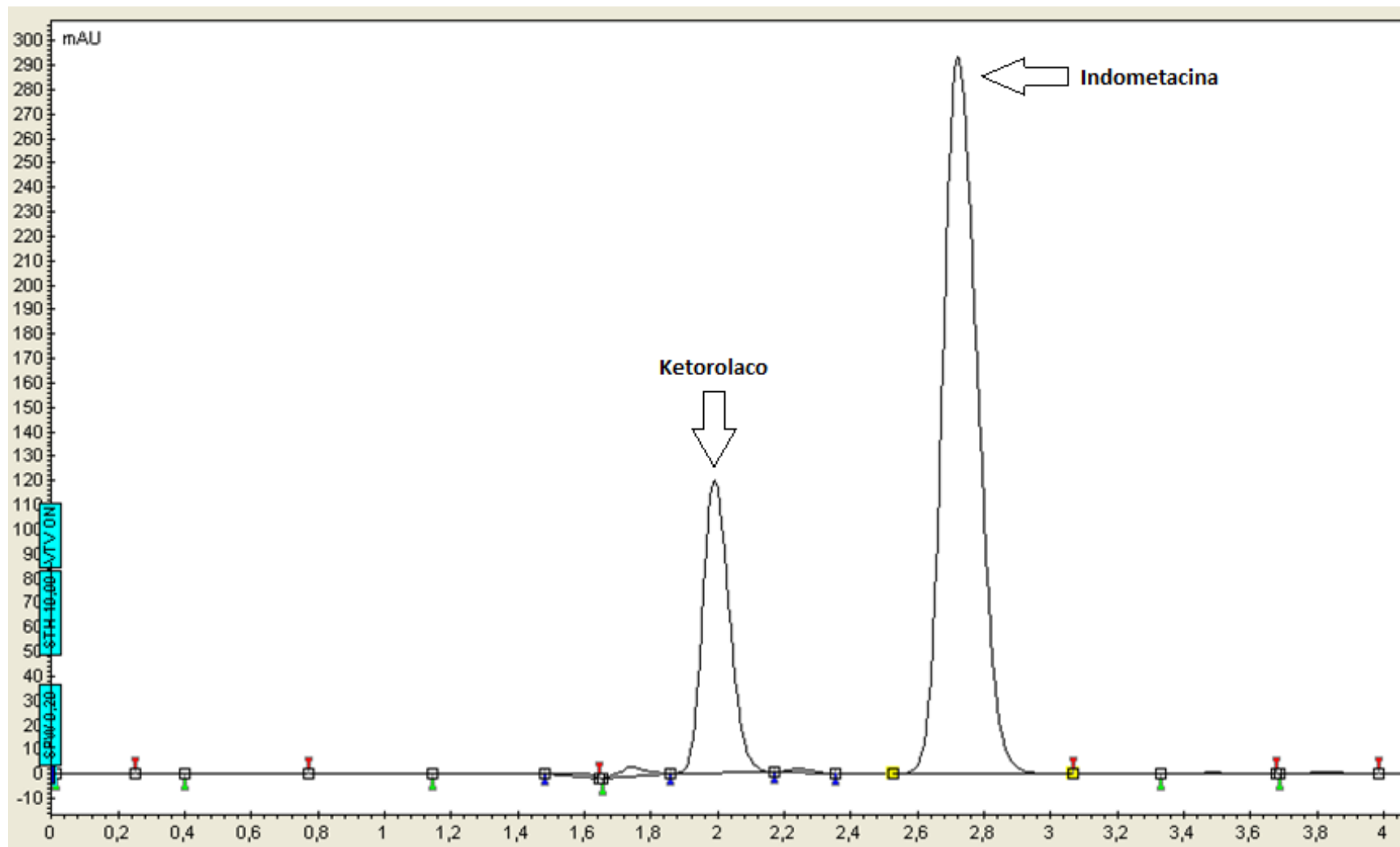
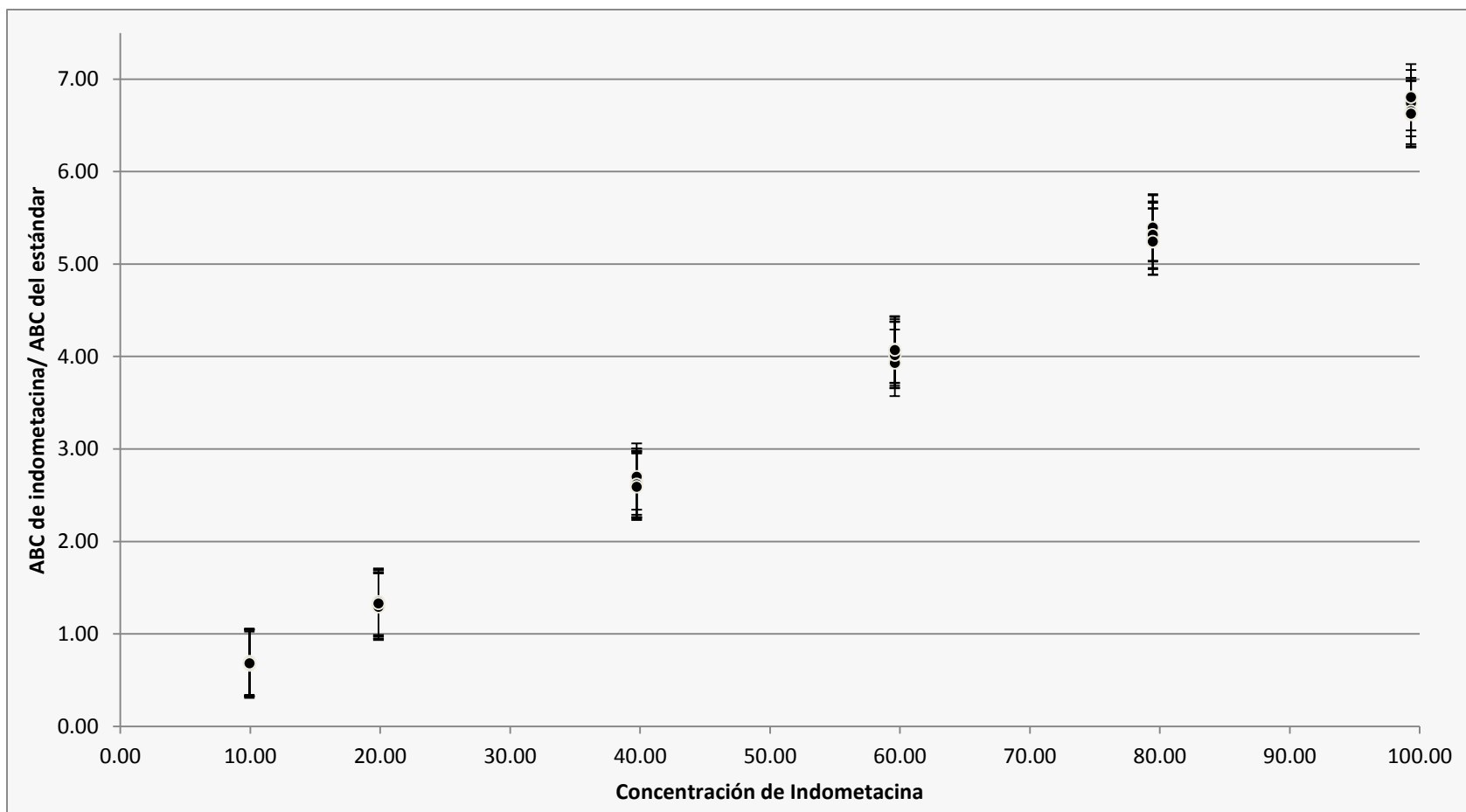


Figura 9. Cromatograma de indometacina y ketorolaco a la proporción de 80% metanol, 20% solución amortiguadora de fosfatos pH 3.

8.2- Linealidad del sistema

Para la linealidad del sistema se obtuvo la siguiente gráfica:



Gráfica 1. Curva para linealidad del sistema

Se calculó la F de Fisher obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5. Análisis de varianza para F de Fisher.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	$\frac{MCR}{MCER}$
Error de regresión	n-2	SCER	$MCER = \frac{SCER}{n-2}$	

Donde:

SCR = suma de cuadrados de la regresión.

SCER = Suma de cuadrados del error de regresión.

SCT = Suma de cuadrados total.

MCR = media de cuadrados del error.

MCER = Media de cuadrados del error de regresión.

$$SCR = m^2 \left[\sum X_i - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right] \quad SCER = \sum Y_i^2 - m \sum X_i Y_i - b \sum Y_i$$

$$SCT = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}$$

m = pendiente de la ecuación lineal.

b = ordenada al origen de la ecuación lineal.

X_i = Suma de la cantidad adicionada.

X_i^2 = Suma de cuadrados de la cantidad adicionada.

Y_i = Suma de la propiedad medida.

Y_i^2 = Suma de cuadrados de la propiedad medida.

n = Número de determinaciones.

Ho: $F_{calc} > F_{tab}$, hay relación lineal significativa entre la propiedad medida y la cantidad adicionada.

Ha: $F_{calc} < F_{tab}$, no hay relación lineal significativa entre la propiedad medida y la cantidad adicionada.

Tabla 6. Análisis de varianza de distribución F de Fisher para linealidad del sistema.

Fuente	Grados de libertad (gl)	gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F de tablas
Regresión	1	1	162.5544	162.5544	59825.3725	4.1300
Error	n-1	34	0.0924	0.0027171		
Total	36-1	35	162.6468			

Se acepta la hipótesis nula, por lo que se demuestra que hay linealidad en el sistema de medición.

8.3 Precisión del sistema

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 7. Coeficientes de variación para cada nivel de concentración de la curva de linealidad del sistema.

Concentración teórica de Indometacina (en µg/mL)	Promedio del cociente de las áreas bajo la curva	Desviación estándar (S)	Coefficiente de variación (C.V.)
10	0.6847	0.0115	1.6837
20	1.3207	0.0207	1.5695
40	2.6316	0.0391	1.4850
60	4.0267	0.0530	1.3159
80	5.3148	0.0664	1.2490

8.4 Adecuabilidad del sistema

De 6 muestras analizadas al 100% se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Adecuabilidad del sistema.

ABC del STD	ABC de IND	Concentración teórica de Indometacina en µg/mL	Promedio de ABC de IND / ABC del STD	Concentración experimental obtenida en µg/mL	% de recobro
959.3	2728.2	39.6000	2.8439	39.1780	98.9343
956.5	2711.1	39.6000	2.8344	39.0458	98.6005
969.6	2753.1	39.6000	2.8394	39.1153	98.7760
923.7	2654.7	39.6000	2.8740	39.5937	99.9842
951.3	2760.5	39.6000	2.9018	39.9790	100.9570

Se obtuvo el promedio ($\bar{X}$), desviación estándar (S), el coeficiente de variación (C.V.):

$$\bar{X} = 2.8587$$

$$S = 0.0286$$

$$C.V. = 1.0006$$

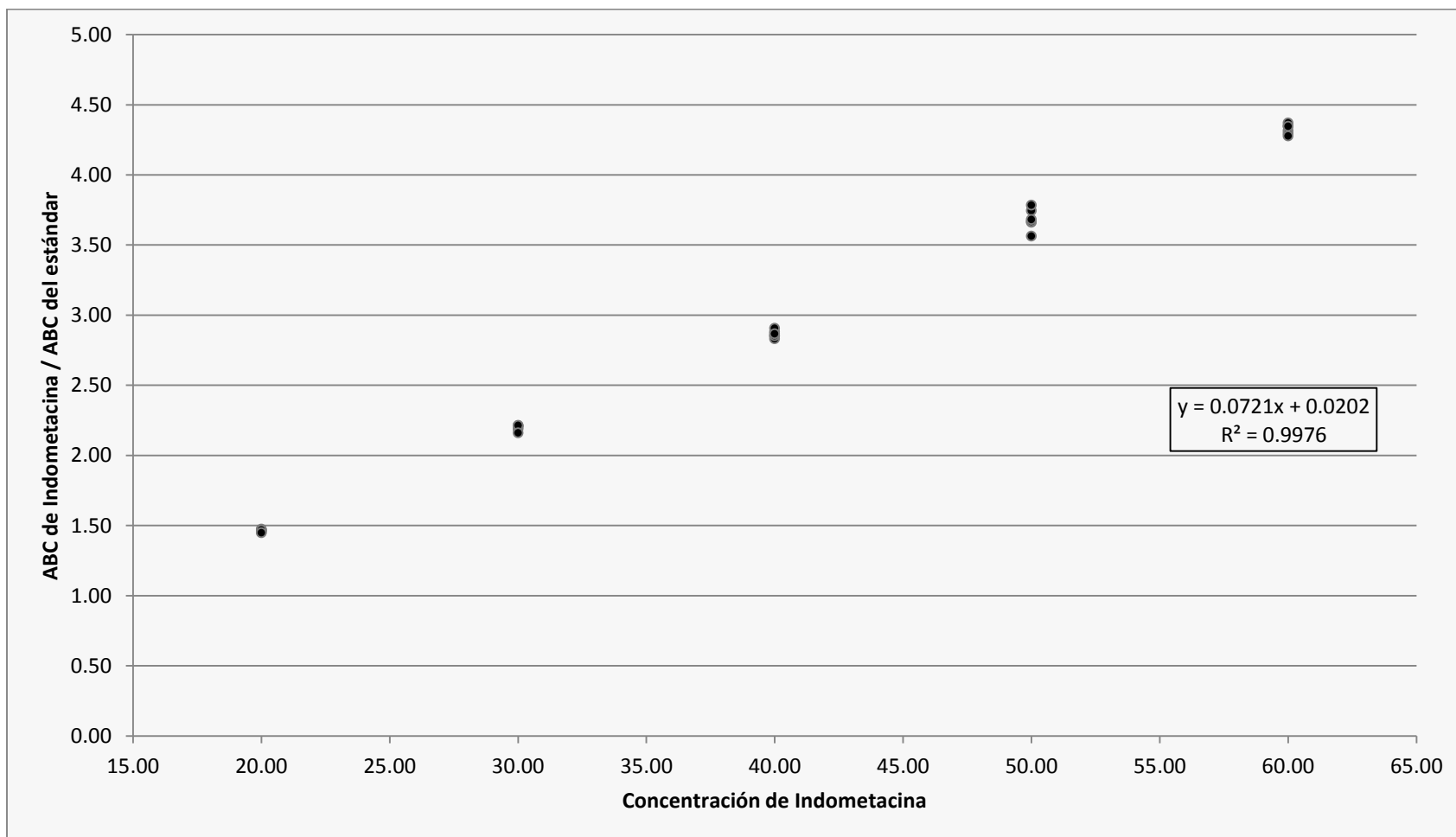
Y se evaluaron los siguientes parámetros cromatográficos:

Tabla 9. Parámetros evaluados para adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Valor experimental	Valor teórico	Cumple
Resolución (R)	3.6380	>2	Sí
Asimetría (T)	1.0880	<2	Sí
Número de platos teóricos (N)	8101.8460	>2000	Sí

8.5- Linealidad del método

En el método se obtuvieron los siguientes resultados:



Gráfica 2. Curva de linealidad del método.

Se realizó el cálculo de F de Fisher con las siguientes hipótesis:

Ho: $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, El método es lineal.

Ha: $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, El método no es lineal.

Los cálculos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Análisis de varianza para linealidad del método por prueba de F de Fisher.

Fuente	Grados de libertad (gl)	de gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Regresión	1	1	31.3318	31.3318	26375.7386
Error	n-1	28	0.0333	0.0011879	F de tablas
Total	29	29	31.3651		4.1960

Por lo que se acepta la hipótesis nula, lo que indica que hay una relación lineal entre la propiedad medida (cociente de áreas bajo la curva de indometacina entre el estándar de ketorolaco) y la cantidad adicionada, por lo tanto, hay linealidad en el método.

8.6 Precisión del método

Para este parámetro se tomaron las 6 muestras a 40mg/mL que es el 100% de la tabla 12, del cociente de área bajo la curva de indometacina entre la del estándar, se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, los cuales fueron:

$$\bar{X} = 2.8632$$

$$S = 0.0260$$

$$\text{C.V.} = 0.9097 \%$$

8.7 Precisión intermedia

Para evaluar la precisión intermedia del método desarrollado, se utiliza el modelo estadístico de factores anidados descrito por la siguiente ecuación:

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

Donde:

Y_{ijk} = k-ésimo resultado realizado por el i-ésimo analista el j-ésimo día.

μ = media general.

A_i = efecto del i-ésimo analista sobre el recobro experimental.

$D_{j(i)}$ = efecto que tiene sobre el recobro experimental el j-ésimo día, de un analista dado.

$E_{k(ij)}$ = error experimental.

Posteriormente se necesita construir la tabla de análisis de varianza, por lo que se necesitan calcular diversos parámetros como:

La suma de cuadrados de los valores para cada analista ($\sum Y_{i..}^2$).

$$\sum Y_{i..}^2 = \underline{2929735.79}$$

La suma de cuadrados de los valores de la combinación analista-día ($\sum Y_{ij.}^2$).

$$\sum Y_{ij.}^2 = \underline{1464869.08}$$

La suma total de los datos ($Y_{...}$) y la suma total de los datos elevada al cuadrado ($Y_{...}^2$).

$$Y_{...}^2 = \underline{5859428.58}$$

$$Y_{...} = \underline{2420.6257}$$

La suma de cada dato elevado al cuadrado ($\sum \sum \sum Y_{ijk}^2$).

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = \underline{244188.101}$$

También se tiene que tener el número de analistas (a), días (d) y repeticiones (k).

$$\text{Analistas} = \underline{2}$$

$$\text{Días} = \underline{2}$$

$$\text{Repeticiones} = \underline{6}$$

Con estos datos se calcula la suma de cuadrados del analista (SC A_i) con la siguiente ecuación:

$$SC A_i = \frac{\sum Y_{i..}^2}{dk} - \frac{Y_{...}^2}{adk} = 1.7913$$

La suma de cuadrados del día anidado en el analista ($SC D_{j(i)}$), con la siguiente ecuación:

$$SC D_{j(i)} = \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{dk} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{kd} = 0.1979$$

Y la suma de cuadrados del error ($SC E_{k(ij)}$), con la siguiente ecuación:

$$SC E_{k(ij)} = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{k} = 43.2540$$

Con los datos anteriores se realiza la tabla de análisis de varianza (ANAdEVA).

Tabla 11. Análisis de varianza con el modelo de factores anidados.

Fuente de variación	de Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{calc}
Analista	a-1	SC A _i	$MC A_i = \frac{SC A_i}{a-1}$	$F A_i = \frac{MC A_i}{MC E_{k(ij)}}$
Día	(d-1)a	SC D _{j(i)}	$MC D_{j(i)} = \frac{SC D_{j(i)}}{(d-1)a}$	$F D_{j(i)} = \frac{MC D_{j(i)}}{MC E_{k(ij)}}$
Error experimental	(k-1)ad	SC E _{k(ij)}	$MC E_{k(ij)} = \frac{SC E_{k(ij)}}{(k-1)ad}$	
Total	adk -1	$T = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{adk}$		

Las pruebas de hipótesis se establecen de la siguiente manera:

Ho: si F calculada < F de tablas, no existe diferencia significativa en la precisión alcanzada por los dos analistas, en los 2 días de trabajo, hay precisión intermedia.

Ha: si F calculada > F de tablas, existe diferencia significativa en la precisión alcanzada por los dos analistas, en los 2 días de trabajo, no hay precisión intermedia.

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza con el modelo de factores anidados.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{calc}	F de tablas
Analista	1	1.7913	1.7913	0.8283	1.4037
Día	2	0.1979	0.0989	0.0458	1.4870
Error experimental	20	43.2540	2.1627		
Total	23	45.2431			

Como se muestra en la tabla F_{cal} es menor a F de tablas, no se rechaza la hipótesis nula, por lo que el método presenta precisión intermedia entre días y entre analistas.

8.8- Exactitud del método.

Se realizó con los 5 niveles de concentración de las muestras calculando el % de recobro de cada una, el cual está indicado en la tabla 14, el promedio de % de recobro por nivel y el coeficiente de variación de cada nivel, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Resultados de exactitud del método.

Nivel de concentración en µg/mL	Promedio del % de recobro	C.V. del % de recobro
20	99.6571	1.0414
30	100.2991	1.0390
40	99.7084	0.7912
50	100.5076	1.7552
60	99.7353	1.0432

Además se determinó el cálculo de la exactitud usando el estadígrafo t de Student, determinando el valor absoluto mediante la siguiente ecuación y planteando las siguientes hipótesis:

$$t_{calc} = \frac{100 - \bar{X}}{\left(\frac{S}{\sqrt{n}}\right)}$$

Donde:

$\bar{X}$ = El promedio del % de recobro.

S = Desviación estándar del % de recobro.

n = Numero de determinaciones.

Hipótesis planteadas.

Ho: $t_{calc} \geq t_{tab}$, El método es inexacto.

Ha: $t_{calc} < t_{tab}$, El método es exacto.

$$t_{calc} = \frac{100 - 99.9815}{\left(\frac{1.1538}{\sqrt{30}}\right)} = 0.0878$$

t de Student de tablas al 95% de confianza con n-1 grados de libertad = 1.6991.

Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, y se confirma que el método de medición es exacto.

8.9 Límite de cuantificación y límite de detección

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 14. Resultados de límite de cuantificación y límite de detección.

Concentración en µg/mL	ABC STD	ABC IND	ABC IND / ABC STD
10	458	313.8	0.6851
	487.6	337.7	0.6925
	460.6	322.3	0.6997
	486.2	323.6	0.6655
	467.8	319.3	0.6825
	469.4	320.3	0.6823
5	434.7	92.1	0.2118
	446.6	74.3	0.1663
	433.4	86	0.1984
	444.5	84.3	0.1896
	442.8	76.9	0.1736
	449.4	93	0.2069

Hipótesis planteadas para el análisis de varianza por t de Student.

Ho: $t_{calc} \geq t_{tab}$, La concentración no se cuantifica exactitud y precisión aceptables.

Ha: $t_{calc} < t_{tab}$, La concentración se cuantifica exactitud y precisión aceptables.

Tabla 15. Análisis t de Student para el límite de cuantificación.

Valor teórico de la propiedad medida	Promedio de ABC IND / ABC STD	Desviación estándar de ABC IND / ABC STD	t calculada	t de tablas
0.6625	0.6846	0.0115	-11.5273	2.0150
0.3288	0.1911	0.0181	45.4230	

Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el límite de cuantificación para este método es de 10µg/mL.

8.10 Robustez

La robustez evaluada se considera dentro de la clasificación de cambios críticos debido a que se realizó el cambio de marca en el metanol empleado. El criterio de aceptación fue que si la diferencia entre los promedios del porcentaje de recobro es mayor o igual al 2%, el método no es robusto, y si es menor al 2% el método es robusto. Los resultados son los siguientes:

Tabla 16. Resultados de robustez

Muestras con metanol J.T.Baker	% Recobro IND
1	99.7925
2	98.6871
3	102.3592
4	101.9900
5	101.7667
6	101.1792
$\bar{y}$	100.9624
Muestras con metanol Honeywell	% Recobro IND
1	100.4916
2	100.8592
3	99.1741
4	99.0103
5	99.2760
6	99.2438
$\bar{y}$	99.6759

La diferencia entre los promedios da un resultado de 1.2865% lo cual indica que el método es lo robusto para el cambio de marca del metanol.

8.11 Valoración y uniformidad de contenido

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 17. Valoración de las matrices Sol-Gel de indometacina

Muestra	% Recobro IND
1	81.958550
2	82.343722
3	80.569244
4	81.319456
5	82.368178
6	81.250800
7	79.668244
8	78.550487
$\bar{x}$	81.0036
S	1.3480
C.V.	1.6641

Estos resultados son con respecto a la cantidad que se creía que contenían las matrices Sol-Gel, este promedio se considerará el 100% para el cálculo de la uniformidad de contenido, para poder establecer el valor máximo de aceptación y los intervalos de este.

Para la uniformidad de contenido se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 18. Porcentaje recuperado de las muestras de uniformidad de contenido.

Muestra	Porcentaje recuperado (%)
1	95.8771
2	100.0369
3	100.5070
4	104.1599
5	98.3411
6	99.2568
7	104.87
8	97.2414
9	100.5369
10	99.173
Promedio	100.4332 %
Desviación estándar	2.7922

Además se realizó el cálculo del valor de aceptación para la uniformidad de contenido, para establecer si la uniformidad de contenido se cumple, las fórmulas para los cálculos aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 19. Cálculo del valor de aceptación de uniformidad de contenido.

Parámetros	Resultados
$\bar{X} = M$	100.4332 %
S	2.7922
C.V.	2.7801 %
Constante de aceptabilidad (k)	Si $n = 10$, $k = 2.4$ Si $n = 30$, $k = 2$
Número de muestras (n)	10
Valor de aceptación máximo permitido (L_1)	15 %
Valor de aceptación (VA) (Si $\bar{X} > 98.5\%$ entonces $(VA = \bar{X} - 98.5 + k \cdot S)$)	5.19 % Cumple
Máximo intervalo permitido para la desviación de cada unidad de dosificación probada a partir del valor calculado de M (L_2).	El valor inferior no puede ser menor a $(1 - L_2 \times 0.01)M$, mientras que el valor superior no puede ser mayor a $(1 + L_2 \times 0.01)M$. Esto basado en un valor de L_2 de 25.
L2 menor	75.3249% Cumple
L2 mayor	125.5415% Cumple

Los dos valores del criterio de aceptación cumplen por lo tanto, se establece que las matrices Sol-Gel de indometacina poseen un contenido uniforme.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1 Determinación de fase móvil, longitud de onda y estándar interno

La longitud de onda reportada en la literatura de indometacina presenta varios máximos de absorbancia, pero en las fases móviles se observaron dos máximos, uno a la longitud de onda de 260nm y otro a 279nm, pero se decidió leer a 280nm porque el estándar interno ketorolaco no presenta pico de señal en el cromatógrafo a la longitud de onda de 260nm, como se observó en las figuras 8 y 9.

La indometacina presentó un pico a los 2.64 minutos en la fase móvil 80% de metanol, 20% solución amortiguadora de fosfatos pH3, leída a la absorbancia de 280nm, como se muestra en la figura 7.

En las figuras 8 y 9 se observa que la indometacina aparece más rápido con la fase móvil 80% de metanol y 20% de solución amortiguadora de fosfatos, a los 2.8 minutos, mientras que en la 75:25 aparece hasta los 4 minutos, sin embargo, el estándar interno que es el ketorolaco aparece antes de la indometacina a los 2.15 minutos en la proporción 75:25 y a los 2 minutos en la proporción 80:20, pero en ninguno de los casos el ketorolaco se empalma con la señal del frente de disolvente, que aparece a los 1.68 minutos, lo que da la pauta para poder emplearlo como estándar interno para el método analítico.

9.2 Linealidad del sistema

Como se muestra en la gráfica 1, se obtiene un coeficiente de determinación r^2 de 0.9994 lo que indica que el sistema tiene un buen ajuste lineal ya que el criterio establecido en la guía de la FDA es que este valor sea mayor o igual a 0.99, y la guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Fármaco Biólogos indica un coeficiente de determinación mayor o igual a 0.98.

9.3 Precisión del sistema

Se realizó con 6 muestras a la concentración de 40µg/mL que es el 100%, obteniendo una media de los cocientes de áreas bajo la curva de 2.6316, una desviación estándar de 0.0391 y con esto se obtuvo un coeficiente de variación de 1.4850%, comparando con el

criterio de aceptación que establece la guía de la FDA el cual es no más del 2%, se asegura que el sistema es preciso, además de que los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración medido en la curva de linealidad del sistema no sobrepasó el límite de coeficiente de variación que establece la FDA del 2%, como lo muestra la tabla 7.

9.4- Adecuabilidad del sistema

De los resultados de la tabla 8, se obtuvo el promedio ($\bar{X}$), desviación estándar (S), el coeficiente de variación (C.V.):

$$\bar{X} = 2.8587$$

$$S = 0.0286$$

$$C.V. = 1.0006$$

En la tabla 9 se observa que los parámetros cromatográficos resolución, asimetría y número de platos teóricos cumplen con los límites establecidos en la literatura. Con estos resultados se demuestra que el sistema de inyección y medición opera de manera constante y permite asegurar la confiabilidad de los resultados del método analítico.

9.5 Linealidad del método

Se obtuvo una curva con un coeficiente de determinación r^2 de 0.9989 como lo indica la gráfica 2, y el valor establecido en la guía de la FDA indica que el valor debe de ser mayor o igual a 0.98, y en la guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos indica que tiene que ser mayor o igual a 0.98, por lo que se dice que hay linealidad en el método.

9.6 Precisión del método

Para este parámetro se tomaron las 6 muestras a 40mg/mL que es el 100%; del cociente de área bajo la curva de indometacina entre la del estándar, se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, los cuales fueron:

$$\bar{X} = 2.8632$$

$$S = 0.0260$$

$$C.V. = 0.9097 \%$$

El criterio de aceptación en la guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos se estipula que el C.V. debe ser menor o igual al 2% por lo que el resultado de 0.9097 % demuestra que el método es preciso.

9.7- Precisión intermedia

Como se observó en la tabla 11, los resultados de la F de Fisher calculada, son menores a la F de tablas por lo tanto el método analítico desarrollado es repetible en distintos días por un mismo analista, y es reproducible por distintos analistas.

9.8 Exactitud del método.

Se realizó con los 5 niveles de concentración de las muestras calculando el % de recobro de cada una. Con estos resultados se calculó el promedio de % de recobro por nivel y el coeficiente de variación de cada nivel, como se muestra en la tabla 13.

En la USP y en guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos se establece que un método cromatográfico debe de tener un intervalo de la exactitud que vaya del 98% al 102%, por lo que el método cumple y es exacto. Además de que este intervalo debe de ser estrecho debido a que la cantidad de fármaco que se está cuantificando en cada inyección al cromatógrafo es pequeña se necesita un método muy cercano al 100% y sin tanta variación para realizar la cuantificación y uniformidad de contenido de indometacina en las matrices Sol-Gel.

El cálculo de la exactitud usando el estadígrafo t de Student dio como resultado 0.0878, y el valor de tablas es de 1.6991 por lo tanto se acepta la hipótesis nula, y se confirma que el método de medición es exacto.

9.9 Límite de cuantificación y límite de detección

Con los resultados de la tabla 14, se realizó el análisis de varianza usando el estadígrafo t de Student, teniendo como valor de tablas 2.0150, el cual se comparó contra los resultados obtenidos en la tabla 15, para las concentraciones de $10\mu\text{g/mL}$ y $5\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

La hipótesis nula se rechaza para la concentración de $10\mu\text{g/mL}$, ya que se obtiene un valor de -11.5273, sin embargo se acepta la hipótesis nula para la concentración de $5\mu\text{g/mL}$ al obtener un valor de 45.4230. Por lo tanto el límite de cuantificación para este método son $10\mu\text{g/mL}$ y la siguiente dilución que fue $5\mu\text{g/mL}$ es el límite de detección debido a que bajo las condiciones de operación establecidas, no se puede cuantificar con exactitud y precisión.

9.10 Robustez

La robustez evaluada se considera dentro de la clasificación de cambios críticos debido a que se realizó el cambio de marca en el metanol empleado. Se evaluó siguiendo la guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos realizando la resta del promedio del porcentaje de recobro de las determinaciones a condiciones normales, menos el promedio de las determinaciones a la condición diferente.

En esta guía indica que el criterio de aceptación de la resta de los promedios del porcentaje de recobro debe de ser menor a 2%, y la diferencia entre los promedios de los porcentajes de recobro obtenidos da como resultado 0.8114%, por lo tanto el método es robusto ante el cambio de la marca de metanol.

En la siguiente tabla se muestra el resumen de la validación del método para la cuantificación de indometacina en matrices Sol-Gel, por el método de adición de estándar interno:

Tabla 20. Resultados generales de la validación del método analítico.

Parámetro	Criterio de aceptación	Valor	Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.99$	0.9994	Sí
Precisión del sistema	C.V. < 2%	1.4850%	Sí
Adecuabilidad del sistema	C.V. $\leq$ 2%	C.V. = 1.0006	Sí
	$T < 2$	$T = 1.0880$	
	$R > 2$	$R = 3.6380$	
	$N > 2000$	$N = 8101.8460$	
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.99$	0.9989	Sí
Precisión del método	C.V. $\leq$ 2%	0.9097%	Sí
Precisión intermedia	----	----	----
Exactitud del método	Del 98% al 102%	99.7084 ± 0.7912	Sí
Límite de cuantificación	Exactitud y precisión aceptables	10 μ g/mL	Sí
Límite de detección	Detección en el equipo	5 μ g/mL	

9.11- Valoración y uniformidad de contenido

Como lo muestran los resultados de la tabla 17, las matrices contienen un promedio de 81.0036 % de indometacina, referente al que se supone contenían al momento de su fabricación, esto pudo deberse a que las matrices no contenían la cantidad establecida al momento de su análisis, ya que parte de la indometacina se pudo perder en el momento de su fabricación, o simplemente no se encapsuló en la matriz Sol-Gel, lo que indicaría que al momento de la gelación en el proceso de fabricación, cuando los disolventes usados se están evaporando, trazas de indometacina no se encapsularon en la matriz. Ya que el método analítico desarrollado permite cuantificar adecuadamente la indometacina, y la propia matriz Sol-Gel, no muestra interferencia alguna para el análisis en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Además de que la velocidad de liberación del principio activo se puede controlar mediante parámetros del procesamiento de las condiciones de gelación, tales como la temperatura y formas de secado, debido a que la poli condensación se lleva a cabo de manera diferente con formas de secado diferente, por eso los diámetros de partícula diferentes.¹⁸

También se ha visto que la matriz Sol-Gel presenta variaciones en la liberación de acuerdo con el pH que se encuentre. Es por eso que se utilizó un pH ligeramente básico para poder abrir el poro de la matriz y que se liberara el principio activo, pero como se menciona en la patente europea número 2244998, con título: Óxidos solubles para aplicaciones biológicas, las partículas pueden ser pequeñas, por lo que la liberación tiende a ser lenta y esto dificultaría la cuantificación del principio activo, además de que se desconoce el

diámetro y la forma del poro de la matriz Sol-Gel elaborada en los Laboratorios de Investigación Farmacéutica.

Sin embargo todavía existe una incógnita acerca de la propia estructura de las matrices elaboradas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica, y es referente a que se desconoce el tipo de poro que poseen, y esto puede ser un gran problema al momento de realizar la valoración, puesto que si tiene poros ciegos, la liberación del fármaco no puede ser completa, ya que tendría el contenido incluido en el centro del cristal y no tendría por donde salir, así que el 19% que no aparece en la valoración se encontraría incluido en la matriz sin forma de liberarse.

CONCLUSIONES

El método analítico por CLAR cumple con los criterios de validación establecidos, puede efectuarse por diferentes analistas y funciona para cuantificar la indometacina contenida en las matrices Sol-Gel.

La valoración de las matrices Sol-Gel cumple con el criterio de valoración establecido de un C.V. menor al 2 %.

La uniformidad de contenido cumple con el valor de aceptación L_1 menor al 15% y entra en el intervalo del valor L_2 .

RECOMENDACIONES

Se recomienda asegurar que el método de fabricación se elabore de manera consistente, para determinar los cambios que puedan afectar a la matriz Sol-Gel para la valoración y uniformidad de contenido de indometacina.

REFERENCIAS

1. Budavari S. The Merck Index [Cd-Rom].; 2001.
2. C. Moffat A, M. Osselton D, B W, C. Clarke EG. Clarkes's. Analysis of drugs and poisons USA: Pharmaceutical Press; 2005.
3. ChemSpider. The free chemical database. [Online].; 2012 [cited 2012 08 08. Available from: <http://www.chemspider.com/ChemicalStructure.3584.html?rid=ce70f7e2-4655-4be1-bcfc-fd7c5bc7feb7>. HYPERLINK
4. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 34th ed. España: Pharmaceutical Press; 2005.
5. Vázquez R. ML, Hernández L. A, Retchkiman C. B. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de indometacina en crema. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2011; 42(1): p. 52-57.
6. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de validación de métodos analíticos México; 2002.
7. Text of validation analytical procedures Q2A. In International Conference on Harmonization of Technical (ICH); 1994; USA.
8. Validation of analytical procedures: Methodology Q2B. In International Conference on Harmonization of Technical (ICH); 1996; USA.
9. Quattrocchi A. O, Abelaira de A. S, Laba F. R. Introducción al HPLC. Aplicación y práctica Buenos Aires: Artes Gráficas Farro; 1992.
10. W. Dong M. Modern HPLC for practicing scientists New Jersey: Wiley-Interscience; 2006.
11. Wellings A. D. A practical handbook of preparative HPLC Amsterdam: Elsevier; 2006.
12. Ahuja S, W. Dong M. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. 6th ed. England: Elsevier Academic Press; 2005.

13. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Novena ed. Mexicanos CpdIFdIEU, editor. México: Secretaria de Salud Pública; 2008.
14. Pharmacopoeia Convention, Inc. Unites States Pharmacopoeia 30/ National Formulary 25 Rockeville, M.D.: Pharmacopoeia Convention, Inc.; 2007.
15. Pharmacopoeia Convention, Inc. Unites States Pharmacopoeia 34/ National Formulary 29 Rockeville, M.D.: Pharmacopoeia Convention, Inc.; 2011.
16. Ramírez Palma MT, Huirahé Acuña R, Espinosa Acosta G, Hernández Padrón G. Estado del arte del proceso Sol-Gel en México. Espacio del divulgador. 2010 Julio; 17(2): p. 183-188.
17. Castañeda Contreras J. Fabricación de materiales amorfos y policristalinos con la ruta Sol-Gel. [Online]. [cited 2012 Julio 23. Available from: HYPERLINK <http://www.smf.mx/boletin/2006/Bol-20-1/Articulos/sol-gel.htm> .
18. Ahola M, Fagerholm H, Kangasniemi I, Kiesvaara J, Korteso P, Kurkela K, et al., inventors; Óxidos solubles para aplicaciones biológicas. España patente No. 2244998. 2005 Diciembre 16.
19. Rivera Arias J. Desarrollo de una estrategia experimental para la preparación de Soles de $\text{ZrO}_2\text{-TiO}_2$ a partir del proceso Sol-Gel. In Tesis de Licenciatura; Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2000; México.
20. Zarzycki J. Past and present of Sol-Gel science and technology. Journal of Sol-Gel Science and Technology. 1997; 17(22): p. 17-22.
21. Sánchez R. J. Francisco, Mora G. J.L. Alfredo, Hernández A. V. Jesús. Validación de métodos analíticos. México: UNAM, FES Zaragoza; 2006.
22. González Hernández J, Pérez Robles JF. Vidrios SiO_2 nanocompuestos preparados por Sol-Gel. Sociedad Mexicana de Ciencia de Superficies y de Vacío. 2000. Diciembre; 11(1): p. 1-16.