

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA
CUANTIFICACIÓN DE CLOTRIMAZOL Y CLINDAMICINA EN CÁPSULA
BLANDA.**

CLANDER JAVIER ESTRADA CASTILLO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA
CUANTIFICACIÓN DE CLOTRIMAZOL Y CLINDAMICINA EN CÁPSULA
BLANDA.**

**Trabajo de grado presentado al comité curricular y de investigación del
departamento de química como requisito para optar al título de químico en la
modalidad de práctica empresarial**

CLANDER JAVIER ESTRADA CASTILLO

DIRECTOR

**Viviana Cristina Morales Andrade
Química**

CODIRECTOR

**Juan Camilo Vargas Gallego
Magister en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1° del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN:

VIVIANA CRISTINA MORALES ANDRADE

Director

JUAN CAMILO VARGAS GALLEGO

Co-director

NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIERREZ

Jurado

JUAN PABLO JIMENEZ MORA

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre 6 de 2018.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a la Química Viviana Morales, al Magister Juan Camilo Vargas director y codirector respectivamente de este trabajo. Gracias por su orientación, dedicación y paciencia, gracias por brindarme su confianza, apoyo y por su valiosa asesoría a lo largo de este trabajo.

Al departamento de Química y todos sus docentes responsables de mi formación profesional, por darme la formación académica al transmitir sus conocimientos con principios éticos.

Al laboratorio farmacéutico Quality Farma Análisis S.A.S por la oportunidad brindada y su voto de confianza para el desarrollo de este trabajo, por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones y por los recursos destinados a esta investigación.

A la Magister Ximena Delgado por darme la oportunidad de postularme a esta pasantía y finalmente ser aceptado como ejecutor de la misma.

A mis compañeros y amigos Diego Madroñero, Joseph Muñoz, Oscar Coral, Angie Pardo, Viviana Torres, Daniel Benavides, Ingrid Erazo, Daniel Eraso, Diana Erazo, Erika Enríquez, Manuela Paredes, Diana Ortega con los cuales compartí gratos momentos a lo largo de la carrera.

Un agradecimiento especial a mi Mamá Ana Gledier Castillo Hernández por siempre creer en mí y sacrificar sus años de juventud para formarme desde niño hasta hoy en día, de igual manera a mis hermanos Jairo Alexis Estrada Castillo y Ana Glair Estrada Castillo.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme cumplir este objetivo bajo su bendición y dirección.

A mi Mamá Ana Gledier Castillo Hernández, a mis hermanos Jairo Alexis Estrada Castillo y Ana Glair Estrada Castillo por ser mi motor y fuente de combustible para seguir adelante en medio de todas las dificultades.

Al resto de mi familia por todo el apoyo brindado, por sus consejos y su paciencia.

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló y se validó la técnica analítica para cuantificación de Clotrimazol y Clindamicina en cápsula blanda por cromatografía líquida de alta eficiencia evaluando las características de fiabilidad de idoneidad del sistema cromatográfico, selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, y finalmente robustez. Encontrando según los resultados que el sistema es adecuado para la utilización del método propuesto. El estudio de la selectividad demostró que el método permite la identificación inequívoca de los analitos estudiados, el estudio de linealidad permitió establecer que el método es lineal dentro del rango de 0,2 mg/mL de Clotrimazol a 0,6 mg/mL, y de Clindamicina de 0,1 mg/mL a 0,3 mg/mL, los resultados del parámetro exactitud permiten concluir que el método es exacto debido a que se encontró un coeficiente de variación de recobro $\leq 2\%$ y el intervalo de confianza para la media incluye el 100%, se encontraron los límites de detección y cuantificación para Clindamicina de 3,107 ppm y 2,687 ppm, mientras que para el Clotrimazol los límites de detección y cuantificación encontrados fueron 1,814 ppm y 4,293 ppm respectivamente. El estudio de robustez permite concluir que este método es robusto para cambios de columna y temperatura en la identificación y cuantificación de Clindamicina y el método no es robusto para ningún cambio realizado para la identificación y cuantificación de Clotrimazol. Por lo anteriormente mencionado se realizó la validación de estos principios activos de forma rápida, sencilla, a bajo costo y adaptable a las condiciones de trabajo de la empresa

Quality Farma Análisis S.A.S

ABSTRACT

This document develops and validates the analytical technique of quantification for Clotrimazole and Clindamycin in soft capsule through a high efficiency liquid chromatography evaluating the characteristics of reliability, suitability of the chromatographic system, selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit, and finally robustness. Finding that the system is suitable for the use of the proposed method. The selectivity study concluded that the method allows the unequivocal identification of the analytes studied, the linearity study established that the method is linear within the range of 0,2 mg/mL of Clotrimazole to 0,6 mg/mL, and of Clindamycin from 0,1 mg/mL to 0,3 mg/mL, the results of the accuracy parameter allow us to conclude that the method is accurate because a recovery coefficient variation was found to be $\leq 2\%$ and the trust interval of the average includes 100%, the detection and quantification limits for Clindamycin were found to be of 3,107 ppm and 2,687 ppm, meanwhile the limits of detection and quantification for Clotrimazole were found to be 1,814 ppm and 4,293 ppm accordingly, the robustness study leads to the conclusion that this method is robust for column changes and temperature identification and quantification of Clindamycin also is not robust for any changes made for identification and quantification of Clotrimazole. For this reason, the validation of these active ingredients was carried out in a fast, simple, low-cost and adaptable way to the working conditions of the company Quality Farma Analisis S. A. S.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	25
1. OBJETIVOS.....	27
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	27
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2. ESTADO DEL ARTE	28
2.1 Marco referencial.....	28
2.1.1 Forma farmacéutica	28
2.1.2 Tipos de cápsulas: cápsulas duras y cápsulas blandas.....	29
2.1.3 Principios activos de interés.....	30
2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
2.3 DETERMINAR LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE CONFIABILIDAD	34
2.4 VALIDACIÓN DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR HPLC.....	35
2.4.1 Selectividad.....	35
2.4.2 Test de idoneidad del sistema (System Suitability test)	37
2.4.3 Linealidad y rango.....	39
2.4.4 Precisión	41
2.4.5 Exactitud	43
2.4.6 Robustez.....	43
2.4.7 Límite de detección y límite de cuantificación	44
2.5 ANTECEDENTES.....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1 MATERIALES.....	47
3.1.1 Sistema cromatográfico	48
3.1.2 Condiciones cromatográficas	49
3.1.3 Materias primas y reactivos	49
3.1.4 Composición cualicuantitativa del producto:	50
3.1.5 Preparación de soluciones.....	53
3.1.6 Preparación de la solución de estándar mixto para evaluar la idoneidad del sistema cromatográfico.	53
3.1.7 Identificación de estándares	54
3.1.8 Preparación de placebo.	55
3.1.9 Preparación de la solución producto (placebo adicionado).....	55
3.1.10 Identificación y cuantificación del producto	55
3.2 CRITERIOS / LÍMITES DE ACEPTACIÓN DE LA VALIDACIÓN:	56
3.3 PERIODO Y CONDICIONES DE VALIDEZ.....	59
3.4 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN.....	59
3.4.1 Selectividad.....	59
3.4.2 Linealidad del sistema y linealidad del método.	63
3.4.3 Precisión	66

3.4.4	Exactitud	66
3.4.5	Robustez.....	66
3.4.6	Límites de detección y cuantificación.....	67
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	69
4.1	Preparación de la solución de estándar para evaluar la idoneidad del sistema.....	69
4.2	Preparación de la solución producto (placebo adicionado):	72
4.3	Selectividad	75
4.4	Linealidad del sistema	80
4.5	Linealidad del método.....	89
4.6	Precisión (repetibilidad)	101
4.7	Precisión intermedia.	104
4.8	Límites de detección y cuantificación.	107
4.9	Exactitud.....	109
4.10	Robustez	112
4.11	INCERTIDUMBRE.....	114
4.11.1	Determinación de incertidumbre de tipo A.....	115
	CONCLUSIONES	120
	RECOMENDACIONES.....	122
	REFERENCIAS	123

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Características analíticas sujetas a validación según la categoría del ensayo.	33
Tabla 2. Parámetros y criterios de aceptación del test de idoneidad del sistema.	38
Tabla 3. Sistema cromatográfico.	48
Tabla 4. Condiciones Cromatográficas.	49
Tabla 5. Reactivos y materias primas utilizadas.	49
Tabla 6. Fórmula cualicuantitativa del producto Clotrimazol + Clindamicina en cápsula blanda.	50
Tabla 7. Formula cualicuantitativa del envoltente.	50
Tabla 8. Información de los equipos requeridos para la validación.	51
Tabla 9. Información reactivos utilizados en la validación.	51
Tabla 10. Materias primas utilizadas para la preparación del producto.	52
Tabla 11. Características a validar y especificaciones.	57
Tabla 12. Resultados de la idoneidad del sistema para Clindamicina.	69
Tabla 13. Resultados de la idoneidad del sistema para Clotrimazol.	70
Tabla 14. Resultados identificación producto.	72
Tabla 15. Resultados tiempos de retención producto.	72
Tabla 16. Pesos y diluciones realizadas para la identificación y valoración del producto.	74
Tabla 17. Resultados degradación de Clindamicina en solución producto.	77
Tabla 18. Resultados degradación de Clotrimazol en solución producto.	78
Tabla 19. Clasificación de daño en analito.	79
Tabla 20. Resultados preparación soluciones linealidad del sistema.	81
Tabla 21. Resultados curva de calibración áreas obtenidas linealidad del sistema.	83
Tabla 22. Resultados linealidad del sistema para Clindamicina.	85
Tabla 23. Resultados linealidad del sistema para Clotrimazol.	86
Tabla 24. Resultados regresión linealidad del sistema.	87
Tabla 25. Resultados preparación soluciones linealidad del método.	89
Tabla 26. Resultados áreas obtenidas para la linealidad del método.	90
Tabla 27. Resultados linealidad del sistema para Clindamicina.	93
Tabla 28. Resultados linealidad del método para Clotrimazol.	93
Tabla 29. Resultados regresión linealidad del método.	94
Tabla 30. Resultados recobro linealidad del método Clindamicina.	96
Tabla 31. Resultados recobro linealidad del método Clotrimazol.	97
Tabla 32. Resultados regresión mg recuperados vs mg adicionados.	100
Tabla 33. Resultados solución estándar repetibilidad Clindamicina.	101
Tabla 34. Resultados solución estándar Repetibilidad Clotrimazol.	101
Tabla 35. Resultados muestras repetibilidad Clindamicina.	102
Tabla 36. Resultados muestras repetibilidad Clotrimazol.	102

Tabla 37. Resultados % recuperado Clindamicina precisión intermedia.	104
Tabla 38. Resultados % recuperado Clotrimazol precisión intermedia.....	105
Tabla 39. Resultados precisión intermedia.....	105
Tabla 40. Análisis de Varianza Clindamicina.....	105
Tabla 41. Análisis de Varianza Clotrimazol.	106
Tabla 42. Resultados soluciones para límites de detección y de cuantificación de Clindamicina.	107
Tabla 43. Resultados soluciones para límites de detección y de cuantificación de Clotrimazol.....	107
Tabla 44. Resultados de la regresión concentración vs áreas.	108
Tabla 45. Resultados de la regresión concentración vs desviación estándar de la señal.	108
Tabla 46. Resultados límite de cuantificación y detección para Clotrimazol y Clindamicina.	109
Tabla 47. Resultados porcentaje de recuperación del método de muestreo de Clindamicina.	110
Tabla 48. Resultados porcentaje de recuperación del método de muestreo de Clotrimazol.....	111
Tabla 49. Resultados globales Exactitud de Clotrimazol y Clindamicina.....	111
Tabla 50. Resultados porcentaje recuperado de Clindamicina a condiciones de robustez.....	113
Tabla 51. Resultados porcentaje recuperado de Clotrimazol a condiciones de robustez.....	114
Tabla 52. Resultados incertidumbre idoneidad del sistema.	116
Tabla 53. Resultados incertidumbre Repetibilidad.	117
Tabla 54. Incertidumbre precisión intermedia.....	117
Tabla 55. Resultados incertidumbre Repetibilidad.	118
Tabla 56. Resultados incertidumbre exactitud.....	119

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Inyección de estándar mixto idoneidad del sistema.	71
Gráfico 2. Cromatograma inyección solución producto.....	73
Gráfico 3. Cromatograma inyección solución de placebo	75
Gráfico 4. Cromatograma inyección de fase móvil.....	75
Gráfico 5. Cromatograma inyección estándar de Clindamicina	76
Gráfico 6. Cromatograma inyección estándar de Clotrimazol	76
Gráfico 7. Recta de regresión linealidad del sistema principio activo Clindamicina.	84
Gráfico 8. Recta de regresión linealidad del sistema principio activo Clotrimazol.	84
Gráfico 9. Recta de regresión linealidad del método principio activo Clindamicina.	91
Gráfico 10. Recta de regresión linealidad del método principio activo Clotrimazol.	92
Gráfico 11. Recta de regresión lineal para los miligramos recuperados de principio activo Clindamicina.....	99
Gráfico 12. Recta de regresión lineal para los miligramos recuperados de principio activo Clotrimazol.	99

GLOSARIO

Analito: Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis, en algunos casos se lo conoce como Principio activo.¹

Blanco, Placebo o matriz: Mezcla homogénea de todos o parte de los excipientes de un producto terminado en la misma proporción que en la fórmula maestra. No se incluye el principio activo o principios activos.²

Cantidad declarada o nominal: Es la cantidad o la concentración teórica de un analito, cuando se trata de concentraciones relativas se le da un valor de 100.³

Características de confiabilidad del método analítico: Son las características o parámetros de funcionamiento de los métodos analíticos que demuestran su capacidad para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. En general esas características analíticas comprenden los criterios o parámetros fundamentales de una validación, no necesariamente determinables todos y en todos los casos, estos parámetros son exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad), especificidad (selectividad), sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez.⁴

¹ ARTEAGA AGUIRRE, Leticia. et al. Validación de métodos analíticos. Ed, Asociación Española de farmacéuticos de la industria, 2001. p. 10-11

² Ibid., p.11.

³ Ibid., p.12.

⁴INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedure, 2005. p. 2

Coeficiente de variación o desviación estándar relativa: Es la desviación estándar expresada como función de la media, normalmente se expresa en porcentaje.⁵

$$\text{ECUACIÓN 1 } CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Desviación estándar: Estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los datos.⁶

Estándar de referencia: Es un material o sustancia homogéneo con propiedades específicas que ha sido analizado y certificado por un organismo calificado y homologado, y pueden ser usadas para la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medida, o para asignar valores a un material. A su vez estos materiales deben contar con un certificado que establece claramente sus propiedades y su trazabilidad.⁷

Especificidad - Selectividad: Se puede emplear únicamente el término especificidad y lo definen como la habilidad de un método para determinar inequívocamente el analito en la presencia de componentes que pueden esperarse estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación y excipientes. Otras reconocidas autoridades internacionales como IUPAC, prefieren usar el término “selectividad”, reservando el término “especificidad” para esos procedimientos que son completamente selectivos, como las técnicas cromatográficas. En el documento de referencia¹ los dos términos son considerados equivalentes, aunque se aclara que algunos autores consideran la selectividad como la capacidad de detectar simultáneamente o separadamente

⁵ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.12.

⁶ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.13.

⁷ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.14.

sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencia de ningún otro compuesto. La selectividad de un método analítico es una condición esencial para conseguir una buena exactitud por lo que es en todos los casos un criterio analítico clave a validar en métodos para identificación, ensayos de pureza o en ensayos para contenido o potencia.⁸

Exactitud: Expresa la proximidad o grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero o de referencia y el valor encontrado por el método. También es llamado porcentaje de recuperación.⁹

Factor De Capacidad (K): Es un método cromatográfico es el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna.¹⁰

Factor De Asimetría (Tailing): Es una medida del grado de ensanchamiento y formación de “cola” del pico. es una medida de la asimetría de la señal generada por el pico cromatografico.¹¹

Fármaco: Sustancia activa no alimenticia de origen vegetal, animal, mineral, semisintético o sintético que interactúa con organismos vivos modificando un proceso o respuesta biológica produciendo de esta manera un efecto farmacológico.¹²

⁸ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.46-47.

⁹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.15.

¹⁰ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.16.

¹¹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.17.

¹² MENDOZA, N. Farmacología médica, Ed medica panamericana, p. 6.

Incertidumbre de una medida: Estimación del intervalo dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la cantidad medida una vez efectuadas las correcciones debidas a errores sistemáticos.¹³

Linealidad y Rango: La linealidad de un método analítico es su habilidad para producir resultados directamente o por medio de una bien definida transformación matemática, proporcional a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango dado. El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración (cantidad) más alta y más baja del analito en la muestra (incluyendo esos valores) para los cuales se ha demostrado que el método analítico tiene el adecuado nivel de exactitud, precisión y linealidad.¹⁴

Límite de detección: Es la más baja concentración de analito en una muestra que puede ser detectada con razonable certeza, pero no necesariamente cuantificada como un exacto valor, bajo las condiciones establecidas experimentalmente.¹⁵

Límite de Cuantificación: Es la más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con adecuada precisión y exactitud bajo las establecidas condiciones experimentales. Es una característica de los ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en muestras tales como impurezas y productos de degradación en principios activos y productos terminados.¹⁶

Medicamento: Se habla de medicamento, haciendo referencia a las formas farmacéuticas que contienen una o varias sustancias activas que se administran

¹³ MILLER, N. y MILLER, C. Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica, Ed Pearson Educación S. A, 2002. 101p.

¹⁴ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.18.

¹⁵ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.19.

¹⁶ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.86.

con fines profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico, y también se incluyen sustancias que modifican la función fisiológica.¹⁷

Método analítico: Procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones necesarias para efectuar un análisis concreto.¹⁸

Placebo adicionado: Alícuota de placebo homogéneo al cual se le ha incorporado una cantidad definida de analito o principio activo.¹⁹

Platos Teóricos o Eficiencia De Columna (N): Los platos teóricos son una medida de la eficiencia de la columna, que es cuántos picos pueden ser localizados por unidad de tiempo del cromatograma. Este parámetro es un valor constante para un pico dado bajo unas condiciones dadas de operación pero es afectado entre otros por el tiempo de retención, el tamaño de partícula de la columna y su longitud, el flujo, la temperatura y la viscosidad de la fase móvil.²⁰

Precisión Del Sistema/ Repetibilidad De Inyección: Este parámetro corresponde a la determinación de la precisión del sistema (Repetibilidad de inyección de la solución estándar) y se expresa como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación de las áreas o alturas. Es una medida de desempeño del equipo HPLC, que incluye la bomba, la columna y las condiciones ambientales al momento de analizar las muestras.²¹

¹⁷ MENDOZA, N.(2002), op, cit., p.14.

¹⁸ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.14.

¹⁹QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S. VE-P-008 PLAN DE VALIDACION DE MÉTODOS ANALÍTICOS, 2016. p. 1-15.

²⁰ QUATTROCCHI, O. ALBERAILA, S. LABA, R. INTRODUCCION A LA HPLC, 1992. p. 316-317.

²¹ Ibid., p.316-317.

Precisión: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia o de dispersión entre los resultados de ensayos individuales cuando el método es aplicado bajo las condiciones normales de operación, repetidamente a múltiples muestras a partir de una misma muestra homogénea. La precisión a su vez puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.²²

Precisión intermedia: Expresa la variación dentro del laboratorio (reproducibilidad intralaboratorio): como en diferentes días, diferentes analistas o diferentes equipos dentro del mismo laboratorio.²³

Productos de degradación: Posibles compuestos (identificables o no) que se pueden formar a partir de la molécula original del principio activo o de un excipiente determinado por efecto de factores fisicoquímicos.

Procedimiento analítico: El procedimiento analítico se refiere a la manera de ejecutar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para ejecutar cada ensayo analítico. Este puede incluir, pero no limitarse a: la muestra, el estándar de referencia, la preparación de las soluciones y reactivos, aparatos y su uso, generación de curvas de calibración, fórmulas para cálculos, etc.²⁴

Protocolo de validación del método analítico: Consiste en un documento en el que se plasma el plan experimental, con direcciones precisas, diseñado para que, cuando se ejecute sea una prueba de que el método analítico ha sido validado.²⁵

²² ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.20.

²³ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.21.

²⁴ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.22.

²⁵ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S(2016) op, cit., p.5.

Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación del método y dentro de un corto periodo de tiempo. También es llamado precisión intra-ensayo.²⁶ La USP establece adicionalmente la aplicación repetida del método a partir de una misma muestra homogénea, dentro de un mismo laboratorio, por el mismo analista y mismo equipo.²⁷

Reproducibilidad: Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios. Expresa la precisión entre laboratorios,²⁸ o también llamada precisión interlaboratorio. La reproducibilidad de un método analítico se determina aplicándolo a muestras homogéneas en diferentes laboratorios con diferentes analistas y diferentes condiciones ambientales pero aún dentro de los parámetros de operación.²⁹

Resolución: Es una medida de separación de dos picos adyacentes y con esto indica que tan selectivo es un método analítico dado. Así mismo para una exacta cuantificación los picos deben estar bien resueltos (separados) unos de otros.³⁰

Robustez: Es una medida de su capacidad para permanecer inalterado por “pequeñas”, pero deliberadas variaciones en las condiciones de operación del método y proporciona una medida de su confiabilidad durante su uso normal.³¹ En otras palabras la robustez es el grado de reproducibilidad de un método analítico sometido deliberadamente a pequeñas variaciones en el “modus operandi” con objeto de conocer su estabilidad frente a ellas e identificar las variaciones de mayor influencia sobre la variabilidad de los resultados. En una técnica

²⁶ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.15.

²⁷ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. the united states pharmacopeia, 2016. 1583p

²⁸ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.15.

²⁹ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016). op, cit., p.1584.

³⁰ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.16.

³¹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.17.

cromatográfica por HPLC se evalúa por ejemplo el efecto de ligeros cambios en el flujo, la temperatura, proporciones en la fase móvil, el volumen de inyección, la longitud de onda de la determinación, la marca de la columna, etc.³²

Sensibilidad: Es la capacidad de respuesta de la técnica analítica a pequeñas variaciones en la concentración del analito. En una técnica sensible, ligeros incrementos de concentración conducen a incrementos notables de señal o respuesta.³³

Sistema analítico: Es el conjunto de instrumento, ordenador o computadora (software), el método y la muestra como un todo.³⁴

Técnica analítica: Es un principio científico que puede ser útil para suministrar información sobre la composición de una muestra.³⁵

Test de idoneidad del sistema: Son una serie de pruebas o parámetros que se establecen sobre el sistema analítico completo y específico de manera periódica o inmediatamente antes de aplicar el análisis para asegurar que este se mantiene estable y adecuado con el tiempo. Los ensayos se basan en el concepto que el equipo, la electrónica, las operaciones analíticas y las muestras a ser analizadas constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. El concepto aplica en general a las técnicas analíticas de separación como las de cromatografía de gases y cromatografía líquida. Debe quedar claro no obstante que los parámetros de idoneidad del sistema no son estrictamente de validación, y

³² ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.95.

³³ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p.16.

³⁴ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.10.

³⁵ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.11

son por ejemplo la resolución, los platos teóricos, la asimetría de pico, el coeficiente de variación del área (precisión del sistema), reproducibilidad del tiempo de retención, etc.³⁶

³⁶ INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (2005), op, cit., p.13.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

%CV	Coeficiente de variación
S	Desviación estándar
X	Valor promedio
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
T	Tailing o asimetría
K	Factor de capacidad o factor de cobertura
N	Platos teóricos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
ppm	Partes por millón
λ_{\max}	Longitud de onda máxima
V/V	Volumen/Volumen
μL	Microlitros
mg	Miligramos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
T_R	Tiempo de retención
T_O	Tiempo de volumen muerto
Std	Estándar
r^2	Coeficiente de determinación
N/A	No aplica
NaOH	Hidróxido de sodio
N/R	No reporta
HCl	Ácido clorhídrico

H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
N/A	No aplica
S_a	Desviación o error aleatorio en el intercepto
S_b	Desviación o error aleatorio en la pendiente
$S_{y/x}$	Desviación o error aleatorio en la dirección Y de la curva

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de métodos analíticos permite el avance tecnológico y científico que ayuda a mejorar en gran medida los análisis llevados a cabo en un laboratorio. En la actualidad los laboratorios acreditados están en la obligación de validar toda técnica o método usado, evaluando así cada proceso experimental, obteniendo resultados de calidad, exactos y reproducibles.³⁷ De esta manera demostrar que se puede confiar en el método seleccionado o utilizado, con resultados esperados dentro de parámetros definidos.³⁸ Para el control de calidad es de vital importancia tener referencia de una técnica validada, que permita contrastar los análisis de rutina realizados por cualquier analista calificado con la información obtenida, y de esta manera realizar los ensayos bajo la metodología escogida sin inconveniente alguno dentro de los parámetros establecidos.

Las farmacopeas (compendios que se publican en los países con más desarrollo en la producción de medicamentos), contienen los análisis a los que deben de ser sometidas tanto las materias primas como los productos elaborados (medicamentos y otros productos de uso farmacéutico), que se producen en ese país.³⁹ Para cada análisis se establece el "criterio de calidad", es decir los parámetros bajo los cuales se debe encontrar el producto para que cumpla con las

³⁷ DEL MONTE, J. Desarrollo y Validación de Metodologías para Minimizar la Incertidumbre de los Calibradores en Determinaciones por HPLC en Muestras Biológicas. Tesis de Maestría. En: Universidad Tecnológica Nacional. Buenos Aires (2012).

³⁸ HERNÁNDEZ BALLESTEROS, Bertha Angélica. Validación de Método Analítico por HPLC Para Disolución de Levonorgestrel 1,5 mg Grageas. En: Universidad de Veracruzana. Tesis. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. México.(2014)

³⁹ SEETHALAKSHMI, N. CHENTHILNATHAN, A. RAMA, K. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of metronidazole, clindamycin phosphate and clotrimazole in combined pharmaceutical dosage forms. En: International Research Journal of Pharmacy, 2014, vol. 4, no. 2, p. 66-77.

especificaciones dadas, para que dichas muestras (materias primas o productos elaborados) puedan ser considerados para el uso farmacéutico.

En este trabajo se planteó el desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación e identificación de dos fármacos (Clotrimazol y Clindamicina) presentes en fórmula farmacéutica combinada. En la actualidad se reportan pocos métodos analíticos para la valoración individual o en combinación de estos fármacos. Por lo tanto se desarrolló y validó una metodología para la identificación y valoración de Clotrimazol y Clindamicina teniendo en cuenta el cumplimiento de la normatividad vigente dando solución a los requerimientos de empresas encaminadas o relacionadas a la producción, distribución y comercialización de estos fármacos, como también al consumidor final. La Farmacopea de Estados Unidos (en inglés United States Pharmacopeia, USP), es una organización sin ánimo de lucro que establece las normas obligatorias para medicamentos recetados y de venta libre, así como otros productos para el cuidado de la salud. Además es una entidad de referencia en cuanto a metodologías para análisis en la industria farmacéutica y otras áreas como alimentos y suplementos ⁴⁰, en la actualidad la USP no tiene establecida una metodología de referencia para la identificación y cuantificación de Clotrimazol y Clindamicina en forma farmacéutica combinada, en la literatura tampoco se registran estudios de referencia para la identificación y cuantificación de estos principios activos en cápsula blanda. Sin embargo N. Seethalakshmi, A. Chenthilnathan y K. Rama (2014) reportan un método por RP-HPLC en el cual se realiza la determinación simultánea de Metronidazol, Fosfato de Clindamicina y Clotrimazol en formas de dosificación farmacéuticas combinadas.⁴¹

⁴⁰ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.12.

⁴¹ SEETHALAKSHMI N (2014) op, cit., p.66-77.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo el proceso de validación del método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) para la identificación y valoración de Clotrimazol y Clindamicina en capsula blanda.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las especificaciones de validación del método analítico: idoneidad del sistema cromatográfico (system suitability test), selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, robustez.

- Establecer un protocolo de validación que incluya las condiciones necesarias para llevar a cabo el desarrollo de la misma.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Marco referencial

2.1.1 Forma farmacéutica

La forma en que se presenta un medicamento se conoce como forma farmacéutica y se entiende como la disposición individualizada a la que se adaptan principios activos (fármacos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) que en conjunto forman el medicamento, la forma farmacéutica cumple las siguientes funciones:

- La disposición externa de medicamentos para facilitar su administración
- Establecer unidades de una dosis fija de un fármaco con el que se pudiera tratar una determinada patología.
- Determina la eficacia del medicamento mediante la forma farmacéutica utilizada debido a que influye en la velocidad de liberación de principio activo de manera lenta, o de manera rápida.

Se conocen varias formas farmacéuticas tales como sólido, semisólido, líquido y gaseoso, para el caso de este trabajo se abordara la definición de formas farmacéuticas sólidas (específicamente cápsulas), en las cuales se incluyen polvos (que pueden estar encapsulados), papeles, oleosacaruros, granulados y cápsulas. Las cápsulas pueden ser duras, blandas o perlas y también se incluyen en esta categoría los sellos, tabletas o comprimidos, píldoras, extractos, y por último, los supositorios.⁴²

⁴² HERNANDEZ, G. MORENO, A. ZARAGOZA, F. PORRAS, A. Tratado De Medicina Farmacéutica. Editorial medica panamericana S.A, 2010. 104p.

2.1.2 Tipos de cápsulas: cápsulas duras y cápsulas blandas

Las cápsulas son contenedores pequeños solubles, generalmente formados por gelatina utilizados para albergar un fármaco que se administrara por vía oral y es una de las formas farmacéuticas más utilizadas, cuando la gelatina tiene alta fuerza de gel es adecuada para la fabricación de cápsulas duras, debido a su resistencia, flexibilidad y claridad ya que provee características únicas que permiten la fabricación de distintos tamaños, colores y diseños para asegurar un cierre a presión después de llenar las cápsulas duras.⁴³ Las cápsulas duras están hechas de gelatina pura usando un proceso de inmersión y son suministradas como cápsulas vacías cerradas a la industria farmacéutica, donde las abren, llenan y cierran definitivamente.

Las cápsulas blandas se fabrican mediante una mezcla de gelatina, plastificante (generalmente glicerina y/o sorbitol) y agua, se distinguen de las cápsulas duras porque el relleno se introduce al mismo tiempo en que se las fabrica. También existen en varias formas, tamaños y colores, y pueden contener uno o más ingredientes activos.⁴⁴

⁴³ UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA. [en línea]. http://www.geocities.ws/tecno_farma/capsulas.htm. [citado 16 de agosto del 2017].

⁴⁴ Ibid., p.14.

2.1.3 Principios activos de interés

2.1.3.1 Clotrimazol

El Clotrimazol es un agente antifúngico imidazólico, que se utiliza en el tratamiento de infecciones subcutáneas. El mecanismo principal de acción del Clotrimazol es la inhibición de la división y crecimiento de hongos alterando la permeabilidad de la pared celular fúngica e inhibe la actividad de enzimas dentro de la célula.⁴⁵ Estudios demuestran que las concentraciones mínimas de Clotrimazol causan la fuga de compuestos de fósforos intracelulares hacia el medio ambiente junto con la descomposición de los ácidos nucleicos celulares y una aceleración en la salida de potasio. Esto conduce eventualmente a la muerte de la célula, además de que el Clotrimazol no se propaga apreciablemente a través del cuerpo del usuario, pero se mantiene en el punto de aplicación.⁴⁶ En general, se ha desarrollado poca resistencia al Clotrimazol debido a que este inhibe el transporte de los iones cloruro y potasio a través de las membranas celulares, explicando la inhibición de tumores en algunos animales y también impidiendo la deshidratación de los hematíes o glóbulos rojos en los pacientes con anemia falciforme.⁴⁷ Estudios también reportan efectos secundarios como por ejemplo erupción cutánea, urticaria, ampollas, ardor, picazón, descamación, enrojecimiento, hinchazón, dolor u otro signo de irritación de la piel.⁴⁸

⁴⁵ DRUGS.COM.[en línea]. <https://www.drugs.com/pro/clotrimazole.html>. [citado 16 de agosto del 2017].

⁴⁶ FUNGAL GUIDE.[en línea]. <http://www.fungalguide.ca/treatments/clotrimazole.html>. [citado 16 de agosto del 2017].

⁴⁷ Ibid., p.18.

⁴⁸ FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances and excipients. Vol. 11. New York: Academic Press, 2000. p 266.

El Clotrimazol es un polvo cristalino blanco a amarillo pálido, que funde aproximadamente a 142⁰C, con descomposición, es prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en metanol, en acetona, en cloroformo y en alcohol.⁴⁹

2.1.3.2 Clindamicina

La Clindamicina es un antibiótico semisintético derivado de la lincomisina el cual es eficaz contra las infecciones provocadas por bacterias anaerobias como por ejemplo Cocos gram positivos aerobios, algunos *Staphylococcus* y *Streptococcus* y Bacilos gram-negativos anaerobios. En algunos casos el mal tratamiento de estas infecciones puede desencadenar en enfermedades como septicemia o peritonitis en pacientes alérgicos de la penicilina.⁵⁰ También sirve para tratar las infecciones del hueso causadas por *Staphylococcus aureus*. El fosfato de Clindamicina (tópico) se puede utilizar para tratar acné grave.⁵¹ Las formas de administración más usadas son por inyección intravenosa como fosfato o en preparaciones tópicas puede estar presente en forma de clorhidrato o fosfato de Clindamicina.⁵²

2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un procedimiento analítico es un proceso con base a estudios de laboratorio que asegura que las características de funcionamiento y confiabilidad de un método cumplen los requerimientos para la aplicación analítica propuesta,

⁴⁹ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p.931.

⁵⁰ FLOREY K (2016) op, cit., p. 266..

⁵¹ FLOREY K (2016) op, cit., p. 266.

⁵² THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p.932.

dando un alto grado de confianza al procedimiento analítico seleccionado, dentro de un rango determinado, con resultados exactos, reproducibles y confiables.⁵³ Los métodos analíticos pueden variar desde determinaciones analíticas altamente exactas y complejas a evaluaciones subjetivas, considerando esta variedad de situaciones es lógico que diferentes métodos analíticos requieran la determinación de diferentes características de funcionamiento o confiabilidad y con esto esquemas o niveles de validación distintos o menos completos. De acuerdo a la USP⁵⁴ todos los métodos analíticos deben ser validados y establece la siguiente clasificación dependiendo de las categorías o tipos de métodos analíticos empleados:

CATEGORIA I: Métodos analíticos para la cuantificación de principios activos como materias primas o en producto terminado

CATEGORIA II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas o compuestos de degradación en materias primas o en producto terminado. Esos métodos incluyen ensayos de cuantificación y ensayos límite.

CATEGORIA III: Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño o funcionamiento (por ejemplo disolución, uniformidad de contenido, perfil de disolución).

CATEGORIA IV: Ensayos de identificación.

⁵³ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p.1586.

⁵⁴ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p. 1586-1587.

Tabla 1. Características analíticas sujetas a validación según la categoría del ensayo.

CARACTERÍSTICA ANALÍTICA	Categoría I	Categoría II cuantitativo	Categoría II Ensayos limite	Categoría III	Categoría IV
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de Detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

(*) Pueden requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba.

Fuente: USP en el apartado <1225> Validación de procedimientos farmacopéicos páginas 1586-1587 ⁵⁵

Las razones que justifican la validación de métodos analíticos son:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, permitiendo obtener pruebas documentales al respecto.

⁵⁵ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p.1584-1587.

- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual minimiza el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.
- Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto de registro de especialidades farmacéuticas como de las buenas prácticas de laboratorio con el fin de asegurar calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso previo de los procesos de transferencia de los métodos analíticos.

2.3 DETERMINAR LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE CONFIABILIDAD

De acuerdo con la literatura consultada^{56,57,58} las características o parámetros de confiabilidad de los métodos analíticos que deben ser determinados y validados, cuando aplique, son:

- Selectividad (especificidad).
- Test de idoneidad del sistema (en especial para métodos cromatográficos)

⁵⁶ THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2016) op, cit., p.1583-1584.

⁵⁷ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 39.

⁵⁸ INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (2005), op, cit., p.7.

- Linealidad y rango (sistema y método).
- Sensibilidad (Sensibilidad de calibración).
- Límites de detección y de cuantificación
- Precisión del sistema.
- Precisión del método
- Estabilidad de la solución del analito o muestra.
- Exactitud (recuperación).
- Robustez.

Se debe mencionar que es requisito indispensable que durante el trabajo de validación, se especifique el material de referencia empleado, ya sean primarios o secundarios, debidamente trazados y soportados para que el trabajo de validación efectuado proporcione un alto grado de confianza en los resultados analíticos obtenidos, es absolutamente esencial que los equipos e instrumentos que se utilicen sean del todo fiables, es decir estén calificados y/o calibrados previamente.

2.4 VALIDACIÓN DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR HPLC.

2.4.1 Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir o identificar simultánea o separadamente analitos de interés, en presencia de otras sustancias presentes o no en la muestra, como impurezas o productos de degradación, también suele utilizarse el sinónimo de especificidad. La selectividad de un método analítico se debe determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analítico, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma, en el análisis farmacéutico predomina la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros

componentes tiene influencia mínima en los resultados como lo es el caso de los métodos cromatográficos.⁵⁹

El procedimiento VE-P-008 de la empresa Quality Farma Análisis S.A.S. recomienda:

- Preparar una solución del estándar como está indicado en el método analítico y a la concentración final de trabajo.
- Preparar una solución de placebo del producto siguiendo el mismo procedimiento indicado en el método.
- Preparar una solución de placebo al cual se le ha adicionado el analito en la cantidad declarada del producto (100%)

Se procede a inyectar cada una de las soluciones y se comparan los correspondientes cromatogramas obtenidos entre sí y con el estándar. Si se dispone de sustancias de descomposición o relacionadas (estándares) se deben analizar cada sustancia de igual manera y comparar los cromatogramas. Si no se dispone de sustancias de descomposición se pueden aplicar algunas de las degradaciones artificiales sometiendo para cada trabajo de validación específicamente una cantidad determinada de analito o principio activo y paralelamente una cantidad determinada de placebo adicionado al 100%, a los siguientes tratamientos:

- Hidrólisis ácida.
- Hidrólisis alcalina
- Oxidación
- Termólisis

⁵⁹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 46.

➤ Fotólisis

Las soluciones tratadas con ácido o base se deben neutralizar luego de los tratamientos para evitar daños de las columnas o equipos. Si se dispone de muestras del analito o del producto terminado ya vencidas o que hayan sido sometidas a estabilidad acelerada podrán también ser usadas como indicador.

El método analítico podrá ser considerado selectivo si al comparar los cromatogramas obtenidos no se obtienen picos representativos (menores al nivel de ruido establecido) en el tiempo de retención correspondiente al analito o principio activo. Si aparecen picos en las cercanías del analito la resolución deberá ser en general mayor a 2.0 o de acuerdo a la especificación proporcionada por la Farmacopea oficial vigente para el producto que se esté validando específicamente.⁶⁰

2.4.2 Test de idoneidad del sistema (System Suitability test)

Se debe definir y determinar una serie de parámetros, específicamente cromatográficos, que permiten asegurar y revisar que el sistema analítico (método e instrumento como un todo) permanece adecuado al momento de uso y se puede obtener la precisión y exactitud requeridas. Este test se constituye también como una etapa previa durante el proceso de estandarización de un método en particular.⁶¹ Para la revisión de los parámetros generales de la idoneidad del sistema en cromatografía se debe realizar lo siguiente.⁶²

- Preparar una solución del estándar de referencia a una concentración final equivalente a la indicada en el método en particular.

⁶⁰ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.9.

⁶¹ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.9.

⁶² ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 106-107.

- Inyectar consecutivamente al menos seis veces la misma solución estándar. Si los resultados no cumplen los límites de aceptación, se deben hacer los cambios respectivos (flujo, columna, volumen de inyección, fase móvil, etc.) y repetir el procedimiento.

Tabla 2. Parámetros y criterios de aceptación del test de idoneidad del sistema.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Factor de capacidad (K)	El pico debe ser bien resuelto a partir de otros, En general se acepta que K sea mayor a 2.
Platos teóricos o eficiencia de la columna (N)	En general N deberá ser mayor a 2000 o según sea el caso de acuerdo al tipo de columna utilizada en la validación.
Factor de asimetría	En general no deberá ser mayor a 2.
Resolución (R)	En general se acepta que la resolución entre picos adyacentes debe ser mayor a 2,0.
Precisión/ Repetibilidad de inyección (% CV):	%CV de las áreas o alturas para n inyecciones del estándar en general se acepta que %CV no sea mayor al 2% para 5 o 6 inyecciones consecutivas. Adicionalmente la variación en el tiempo de retención debería establecerse que no sea mayor al 2,0%.

Fuente: QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016)⁶³ Y ARTEAGA AGUIRRE (2001)⁶⁴

⁶³ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.9.

⁶⁴ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 106-113.

2.4.3 Linealidad y rango

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados proporcionales entre la señal obtenida y la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido, siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilite su trazado, interpretación e interpolación. El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado precisión, exactitud y linealidad del método descrito.⁶⁵

Se debe determinar un rango de trabajo que generalmente es de 50-150% de la concentración normal de análisis⁶⁶ empleando soluciones de estándar (Linealidad del sistema) y si los resultados son satisfactorios se debe proceder a determinar la linealidad con soluciones de muestra (placebo adicionado de analito) conocida como linealidad del método. Cuando se trata de métodos para valorar principios activos como materia prima y que no están incorporados en una matriz o placebo no aplica el concepto de la linealidad del método.⁶⁷

2.4.3.1 Linealidad del sistema

Para determinar la linealidad del sistema se emplean soluciones de los estándares preparados y analizados como se establece en el método y a través de todo el

⁶⁵ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 56.

⁶⁶ QUATTROCCHI O. (1992) op, cit., p. 312.

⁶⁷ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.11

rango del método analítico. La referencia consultada⁶⁸ recomiendan que para evaluar la linealidad se use un mínimo de cinco niveles de concentración creciente y que el rango se seleccione de acuerdo con las cantidades de analito esperadas en la muestra. De acuerdo al tipo de valoración de la sustancia estudiada tenemos la siguiente clasificación:

- Valoración de principios activos: Se realiza el estudio desde el 90% al 110 % de la concentración establecida en el método o teórica (100%).
- Valoración de principio activo en producto terminado: Se realiza el estudio desde el 50% al 150% de la concentración establecida en el método o teórica (100%).
- Determinación de impurezas, trazas, sustancias de descomposición: Se realiza el estudio desde el 50% hasta el 120% de la especificación.
- Para uniformidad de contenido: Se realiza el estudio como mínimo desde el 70% hasta el 130% de la concentración del ensayo.
- Para ensayos de disolución: El valor de Q establecido $\pm 20\%$.

Con los datos obtenidos de concentración o cantidad y respuesta (área o altura) se hacen los tratamientos matemáticos y/o pruebas estadísticas para evaluar la linealidad.

Se determina la recta de regresión $Y = bX + a$; y la correspondiente gráfica empleando el método de los mínimos cuadrados. Donde b corresponde a la pendiente y a es el término independiente o intercepto al origen.⁶⁹

⁶⁸ QUATTROCCHI O. (1992) op, cit., p. 312.

⁶⁹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 58.

2.4.3.2 Linealidad del método

Para la determinación de la linealidad del método se sigue un procedimiento similar que el empleado para la determinación de la linealidad del sistema, solo que en este caso no se emplean soluciones puras del estándar si no que se hace partiendo de muestras (placebo adicionado de analito). Para este caso se preparan muestras de placebo al que se le adicionan cantidades crecientes de analito equivalentes al porcentaje del rango a evaluar tomando como 100% la concentración teórica o declarada del producto terminado a que corresponda.⁷⁰

2.4.4 Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas, el objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, esta variabilidad es debida a errores de tipo aleatorios inherentes a todo método de ensayo, la existencia de estos errores sobre análisis efectuados a muestras idénticas supone que generalmente no se conducirá a resultados similares, debido a que los factores susceptibles de influir sobre los ensayo no pueden ser siempre controlados.⁷¹ Dentro de la precisión se realiza la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

⁷⁰ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S(2016) op, cit., p.11.

⁷¹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 68.

2.4.4.1 Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operadas en un mismo laboratorio en un tiempo corto, se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación de una serie de medidas, y se debe calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación, como criterio de aceptación se contempla que el coeficiente de variación sea menor al 2% para 5 a 6 inyecciones consecutivas.⁷²

Dentro de la repetibilidad se evalúa la precisión del sistema y la precisión del método, para evaluar la precisión en un sistema cromatográfico se procede a preparar una solución de estándar del analito a la concentración final establecida en el método de análisis correspondiente e inyectar mínimo 6 veces consecutivas.⁷³

La determinación de la repetibilidad del método se efectúa partiendo de una misma muestra homogénea (analito puro o placebo adicionado) que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de los resultados) siguiendo el mismo procedimiento establecido en el método.⁷⁴

⁷² ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 69.

⁷³ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.12.

⁷⁴ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S (2016) op, cit., p.12.

2.4.4.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia mide la precisión de los resultados de un método analítico efectuado partiendo de la misma muestra homogénea pero en condiciones diferentes, tales como diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, etc., dentro del mismo laboratorio.⁷⁵

2.4.4.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad o precisión interlaboratorio mide la dispersión de los resultados de un método analítico efectuado partiendo de la misma muestra homogénea pero en diferentes laboratorios (espacio geográficos diferentes).⁷⁶

2.4.5 Exactitud

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o como valor de referencia y el valor experimental encontrado, en muchos casos se desconoce el valor verdadero no obstante se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón.⁷⁷

2.4.6 Robustez

Se define como la medida de la capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones de ciertos parámetros, proporcionando una idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina, por lo tanto,

⁷⁵ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 69.

⁷⁶ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 70.

⁷⁷ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 76.

muestra su capacidad para proporcionar resultados validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método.⁷⁸

2.4.7 Límite de detección y límite de cuantificación

Dado un método analítico determinado se entiende por límite de cuantificación como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, es decir es un parámetro cuantitativo, bajo condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud y por límite de detección se entiende como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo las mismas condiciones.⁷⁹

2.5 ANTECEDENTES

Los estudios realizados a los principios activos de interés tenemos que Mifsud y colaboradores⁸⁰ estudiaron un método simple utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de Clindamicina en plasma, este análisis se llevó a cabo utilizando una unidad Varian Pro Star HPLC equipada con un desgasificador en línea usando una columna ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). La fase móvil usada fue una solución tampón fosfato dibásico de sodio: Acetonitrilo 71:29 a pH 2,9 y la detección se realizó a una longitud de onda de 195 nm, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron superiores al 82%.

Platzer y White⁸¹ en el año 2005 desarrollaron un método validado por HPLC en fase inversa con gradiente, para determinar la potencia, la uniformidad de contenido y la determinación de impurezas para una formulación de tableta que contenía Clindamicina, el ensayo utilizó detección UV a 214 nm y una columna

⁷⁸ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 95.

⁷⁹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 86.

⁸⁰ MIFSUD, M, et al . (2014). A simple HPLC-UV method for the determination of clindamycin in human plasma. En: Journal of Chemistry Pharmacy, 2014, vol. 6, no. 1, p. 696-704.

⁸¹ PLATZER, D. WHITE, B. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, p. 84–88.

Waters Xterra RP-18 (4,6 mm x 100mm, 3,5 µm), utilizando como fase móvil una mezcla de soluciones A (tampón de carbonato de potasio 10 milimolar-acetonitrilo en proporciones 90:10) y B (tampón carbonato de potasio 10 milimolar-acetonitrilo en proporciones 20:80) en proporción 30:70 ajustando el pH a 10,5

Manmood y colaboradores⁸² en el año 2015 realizaron un estudio para desarrollar y validar un método analítico para la evaluación de Clotrimazol en forma de dosificación a granel y tableta por espectrofotometría usando disolventes orgánicos como diluyentes de ensayo, la selección de los diluyentes se llevó a cabo sobre la base de los factores de solubilidad y estabilidad en los cuales el fármaco estaba completamente soluble y estable en el tiempo. El estudio se realizó en un rango de concentración de 4-12 ppm, trabajaron con un máximo de absorción (λ_{max}) a 263 nm y concluyendo que el método desarrollado puede aplicarse efectivamente para el análisis del control de calidad y la determinación de Clotrimazol en forma de dosificación de comprimidos.

La revisión bibliográfica indica que se han reportado pocos métodos analíticos para la estimación de estos fármacos (Clotrimazol, Clindamicina) individualmente o en combinación con otros fármacos por espectrofotometría,⁸³ cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)^{84,85,86} y cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPLC),⁸⁷ sin embargo no se ha establecido ningún método para la estimación simultánea de estos analitos en forma farmacéutica combinada. No obstante

⁸² MAHMOOD, S. et al. Method Development and Validation for the Estimation and Evaluation of Clotrimazole (an-Antifungal Drug) in Tablet Preparation by UV-VIS Spectroscopy. En: International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2015, vol. 32, no. 2, p. 55-58.

⁸³ AGARWAL, D. JAIN, D. TRIVEDI, P. Simultaneous spectrophotometric estimation of tinidazole and clotrimazole in tablet formulations, 1998, En: Indian Drugs p. 499.

⁸⁴ HORNEDO, A., et al. High-performance liquid chromatography of clindamycin and clindamycin phosphate with electrochemical detection, 1990. En: Journal of Chromatography. vol. 21, p. 217–225.

⁸⁵ VLADIMIROV, S. et al. (1997). High performance liquid chromatographic determination of clindamycin in pharmaceutical formulations. 1997, En: Journal of the Serbian Chemical Society. vol. 21, p. 177–181.

⁸⁶ FIEGER-BUSCHGES, H. et al. Determination of clindamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography using coupled columns. 1999, En: Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. vol. 21, p. 281–286.

⁸⁷ VAIDYA, VV. et al. Simultaneous HPTLC determination of clotrimazole and tinidazole in a pharmaceutical formulation, 2007. En: Journal of Planar Chromatography Modern TLC. Vol. 21, p. 145-147.

Seethalakshmi y colaboradores⁸⁸ en el año 2014 realizaron el estudio de un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, para la determinación simultánea de Metronidazol, Fosfato de Clindamicina y Clotrimazol en forma de dosificación farmacéuticas combinadas, la separación se llevó a cabo en columna Hypersil BDS C8 de 250 x 4,6mm, 5µm usando como fase móvil fosfato monobásico de potásico (13,6g/L) ajustando el pH a 2,4 con ácido ortofosfórico: acetonitrilo 70:30 V/V. Los analitos se detectaron a 210 nm, con tiempos de retención de 4,86; 5,71 y 26,01 minutos para metronidazol, fosfato de Clindamicina y Clotrimazol respectivamente, el porcentaje de recuperación osciló entre el 99,38% y el 100,31% para el Metronidazol, el 98,76% y el 100,65% para el fosfato de Clindamicina, el 99,98% y el 99,63% para el Clotrimazol. Los intervalos lineales fueron de 80-150 µg/mL para metronidazol, fosfato de Clindamicina y Clotrimazol obteniendo unos R^2 de 0,9983; 0,9993; y 0,9984) respectivamente.

⁸⁸SEETHALAKSHMI, N. et al. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of metronidazole, clindamycin phosphate and clotrimazole in combined pharmaceutical dosage forms, 2015. En: Journal of Pharmacy and Applied Sciences. Vol. 4, No 2, p. 67-774.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

El material de vidrio utilizado se describe a continuación:

- Balones aforados Brand clase A de 50,0 mL, 25,0 mL y de 10 mL: Usados para la preparación de soluciones
- Pipetas aforadas Brand clase A de 1,0 mL, 2,0 mL, 4,0 mL, 5,0 mL: Usadas para la preparación de disoluciones.
- Frascos Schott: Contenedor de Acetonitrilo y solución fosfato monobásico de sodio
- Viales para cromatografía: Contenedores de muestra para inyectar al cromatografo

La limpieza del material de vidrio se hizo conforma al procedimiento interno de la empresa el cual establece que:

- Someter a varios lavados con agua el material de vidrio después de haber sido utilizado.
- Colocar el material en una cubeta con agua de limpia y jabón neutro biodegradable al 1% en volumen por treinta minutos.
- Frotar vigorosamente con esponja o con un churrusco adecuado cada material.
- Someter a varios enjuagues con agua el material.

- Llevar al horno el material no volumétrico, para proceder a su secado y el material volumétrico secar a temperatura ambiente.

Para material de difícil limpieza se utiliza una mezcla sulfocromica, pero en el caso de la validación no fue necesario, todo el material usado en la validación se enjuago una vez lavado con etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente, la preparación del jabón neutro se describe a continuación:

- Preparar una solución jabonosa neutra biodegradable al 1% en volumen dependiendo de la cantidad de material que se desea lavar: se toma 20 mL de jabón neutro biodegradable y se completa a un volumen de 2L con agua corriente.

3.1.1 Sistema cromatográfico

Se utilizó el siguiente sistema cromatográfico para el desarrollo y validación de la técnica analítica propuesta, con la finalidad de cuantificar e identificar Clotrimazol y Clindamicina en cápsula blanda.

Tabla 3. Sistema cromatográfico.

EQUIPO	HITACHI-LACHROM
DETECTOR:	Detector de UV con longitud de Onda variable 7400
HORNO:	N/A
AUTOMUESTREADOR:	Inyector automático estándar. L7200
BOMBA:	Bomba L71000
DEGASIFICADOR:	Elma
SOFTWARE:	D-7000 HPLC system manager

Fuente: Esta investigación

3.1.2 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron

Tabla 4. Condiciones Cromatográficas

LONGITUD DE ONDA	210 nm.
VOLUMEN DE INYECCION	5,0 uL.
FLUJO	1,0 mL/minuto.
DILUENTE	Fase móvil
COLUMNA	Shodex C18 4E, 250mm
FASE MOVIL:	Acetonitrilo-Solución Fosfato monobásico de sodio (70:30)
TEMPERATURA:	Ambiente

Fuente: Esta investigación

3.1.3 Materias primas y reactivos

Tabla 5. Reactivos y materias primas utilizadas.

Reactivos	Materias primas
Agua Purificada	Polietilenglicol 400
Acetonitrilo HPLC	Polisorbato 80
Estándar Clotrimazol	Simeticona
Estándar Fosfato de Clindamicina	1,2-propilenglicol
Fosfato monobásico de potasio	Glicerol
Ácido fosfórico	Agua Purificada
Ácido clorhídrico	Polietilenglicol 3350
Peróxido de hidrogeno	Sílice coloidal
Hidróxido de sodio	

Fuente : Esta investigación

3.1.4 Composición cualicuantitativa del producto:

Tabla 6. Fórmula cualicuantitativa del producto Clotrimazol + Clindamicina en cápsula blanda.

MATERIA PRIMA	mg/cáp
Clotrimazol	200,000
Clindamicina fosfato	118,819
Polietilenglicol 400	437,000
Polisorbato 80	155,000
Simeticona	63,000
1,2-propilenglicol	62,000
Glicerol	59,000
Agua purificada	35,000
Polietilenglicol 3350	20,000
Sílice coloidal	19,000
Peso de llenado	1.168,819

Fuente: Esta investigación

Tabla 7. Formula cualicuantitativa del envoltente.

MATERIA PRIMA	mg/cap
Gelatina	278,957
Glicerol	155,642
Agua purificada	48,776
Metil parabeno E-218	1,028
Propil parabeno E-216	0,259
Dióxido de Titanio E-171	5,938
Óxido de hierro amarillo E-172	0,332
Peso de la envoltente	490,932
Peso Total	1.659,751

Fuente: Esta investigación

Los equipos utilizados en el desarrollo de la validación fueron:

Tabla 8. Información de los equipos requeridos para la validación.

EQUIPOS	CÓDIGO	MARCA	MODELO	Fecha ultima calificación y/o
Cromatógrafo	E13	HITACHI	LACHROM	2017-07-31
Desgasificador	E22	ELMA	LC60H D-	2017-06-08
Ultrasonido			78224	
Balanza analítica	E50	VIBRA	HT120E	2017-08-03
Potenciómetro	E51	HANNA	H12221	2017-05-23

Fuente : esta investigación

Tabla 9. Información reactivos utilizados en la validación.

Reactivos	Disponible Si/No	Lote	Características
Agua Purificada ultrafiltrada	SI	N/R	N/R
Acetonitrilo HPLC	SI	15498603	N/R
Estándar Clotrimazol	SI	K1C282	PUREZA: 99,9%
Estándar Fosfato de Clindamicina	SI	K0M017	PUREZA: 83,4% de Clindamicina base
Fosfato monobásico de potasio	SI	954313	N/R

Continuación tabla 9.

Ácido fosfórico al 85%	SI	967160	N/R
Hidróxido de sodio al 99%	SI	17445	N/R
Ácido clorhídrico al 37%	SI	709478	N/R
Peróxido de hidrogeno al 30%	SI	17551	N/R

N/R: No reporta

Fuente: esta investigación

Tabla 10. Materias primas utilizadas para la preparación del producto.

Materias primas	Disponible Si/No	Lote	Características
Polietilenglicol 400	SI	418042717	N/R
Polisorbato 80	SI	1505UD2078	N/R
Simeticona	SI	1170316701	N/R
1,2-propilenglicol	SI	F8206CGPD1	N/R
Glicerol	SI	BGSXJA1145	N/R
Agua Purificada	SI	N/R	N/R
Polietilenglicol 3350	SI	DEA4006403	N/R
Sílice coloidal	SI	157040316	N/R
Clotrimazol	SI	1709011310	PUREZA: 99,3%
Clindamicina Fosfato	SI	1709011383	PUREZA: 83,8% de Clindamicina base

N/R: No reporta

Fuente: esta investigación

Todos los reactivos y materias primas fueron financiadas por Quality Farma Analisis S.A.S.

3.1.5 Preparación de soluciones

- Solución Fosfato monobásico de Potasio: Se pesó 1,36 g de Fosfato monobásico de potasio al 99 % y se diluyó en un volumen final de un litro (1L), se ajustó el pH a 2,45 utilizando ácido fosfórico al 85 %, se filtró por membrana de 0,45 um en poliamida, desgasificar en ultrasonido por dos 2 minutos.
- Ácido Clorhídrico 0,1 N: A partir del Ácido clorhídrico concentrado (al 37% o 12N) se tomó 0,2 mL y se llevó a un volumen de 25 agregando agua purificada en un balón aforado de 25 mL.
- Hidróxido de sodio 0,1N: A partir del hidróxido de sodio al 99% de pureza se pesó exactamente 0,1010 g de este compuesto, se aforó en un balón de 25 mL utilizando agua purificada.
- Fase móvil: Acetonitrilo-Solución Fosfato monobásico de sodio (70:30).
- Peróxido de hidrogeno al 3%: A partir del peróxido de hidrogeno al 30 % de pureza se tomó exactamente 1,0 mL y se aforó en un balón de 10 mL utilizando agua.

3.1.6 Preparación de la solución de estándar mixto para evaluar la idoneidad del sistema cromatográfico.

- Se pesó con exactitud 10,0 mg de estándar de referencia de Clotrimazol al 99,9%, se transfirió a un balón de 25,0 mL y se agregó 5 mL de

- diluyente asegurándose de realizar lavados al papel filtro utilizado para pesar el estándar.
- Se pesó con exactitud 6,0 mg de estándar de referencia de Fosfato de Clindamicina, (el cual corresponde al 83,4% de Clindamicina base) y se agregaron al mismo balón de 25 mL que contenía al estándar de referencia de Clotrimazol, se agregó 5,0 mL de diluyente y se realizaron lavados al papel filtro utilizado para pesar el estándar.
- Se agregó 10 mL de diluyente y se llevó a ultrasonido por cinco (5) minutos aforando con diluyente y dejando reposar a temperatura ambiente.
- Se filtró por membrana de 0.45 micras PVDF y se desgasificó por 2 minutos antes de usar.
- Concentración final aproximada de Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL

Procedimiento: Una vez el sistema cromatográfico se estabilizó se procedió a inyectar por sextuplicado 5 μ L de la solución de estándar mixto.

Criterios de aceptación: Para la serie consecutiva de inyecciones del estándar se obtuvo: Para el pico de Clotrimazol y el de Clindamicina, un número de platos teóricos N no menor a 2,000, un factor de cola o Tailing T no mayor a 2,0 y una desviación estándar relativa entre inyecciones no mayor al 2,0 %.

3.1.7 Identificación de estándares

Se procedió a identificar los picos de cada principio activo preparando estándar individuales utilizando el mismo diluyente, una vez el equipo se estabilizó se inyectó el estándar de Clotrimazol y también el estándar de Clindamicina.

3.1.8 Preparación de placebo.

Se preparó a partir de la formula cualicuantitativa del producto Clotrimazol + Clindamicina en capsula blanda (ver tabla 4) 10 gramos de placebo.

3.1.9 Preparación de la solución producto (placebo adicionado)

- Se pesó con exactitud 10,0 mg de materia prima de Clotrimazol al 99,3%, se transfirió a un balón de 25,0 mL y se agregó 5 mL de diluyente realizando lavados al papel filtro utilizado para pesar el estándar.
- Se pesó con exactitud 6 mg de materia prima Fosfato de Clindamicina, (el cual corresponde al 83,8% de Clindamicina base) se transfirió al mismo balón de 25,0 mL que contiene la materia prima Clotrimazol, se agregó 5mL de diluyente realizando lavados al papel filtro utilizado para pesar el estándar.
- Se adicionó 42,5 mg de placebo preparado en la sección 3.1.8 al mismo balón. Se agregó 20 mL de diluyente y se llevó a ultrasonido por 5 minutos, se dejó reposar a temperatura ambiente y se completó el volumen con diluyente.
- Concentración final Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL

Procedimiento: Una vez el sistema cromatográfico se estabilizó, se procedió a inyectar por sextuplicado 5 μ L de la solución de producto.

3.1.10 Identificación y cuantificación del producto

El tiempo de retención de los picos correspondientes los activos Clotrimazol y Clindamicina en el cromatograma obtenido para las inyección de la solución producto corresponden a los pico de los activo obtenidos al inyectar la solución de estándar mixto (Clotrimazol + Clindamicina).

Se utilizó como referencia las áreas promedio obtenidas en la solución estándar correspondiente a los picos de Clotrimazol y Clindamicina obtenidas para cada una de las muestras, y se determinó % de Clotrimazol y de Clindamicina en las muestras utilizando la siguiente ecuación

$$\text{ECUACIÓN 2} \quad \% \text{ Activo} = \frac{C_{std} \times \text{Area}_{mta}}{\text{Area}_{std} \times C_{mta}} \times 100$$

Donde:

Cstd : Concentración de Activo en la solución del estándar.

Area std: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de la solución de estándar correspondiente al pico deseado.

Area mta: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de cada muestra correspondiente al pico deseado.

Cmta: Concentración teórica o esperada de cada activo en la solución final de la muestra sobre la base de la cantidad pesada de placebo adicionado y la cantidad declarada de activo.

3.2 CRITERIOS / LÍMITES DE ACEPTACIÓN DE LA VALIDACIÓN:

La validación se realizó siguiendo los lineamientos descritos en la sección <1225> de la USP 39, teniendo en cuenta que la validación realizada esta clasificada en la categoría I según la USP a la cual corresponde los métodos analíticos para la cuantificación de principios activos como materias primas o producto terminado; siendo estos los siguientes parámetros evaluados: idoneidad del sistema

Cromatográfico (system suitability test), selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de identificación y límite de cuantificación (Aunque en la categoría I no se establece los límites de identificación y de cuantificación como parámetro de validación, se realizara por solicitud de la empresa) y robustez.

Tabla 11.Características a validar y especificaciones.

CARACTERISTICA ANALÍTICA A VALIDAR	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO (SYSTEM SUITABILITY TEST)	Platos teóricos (N) >2,000 Asimetría (T) <2.0 Coeficiente de variación (%CV) <2.0 % para n =6 Factor de capacidad>2 Intervalo Tiempo de retención <10% para los picos de Clotrimazol y Clindamicina, tomando como base el tiempo de retención promedio de las inyecciones.
SELECTIVIDAD	Al inyectar las siguientes soluciones no debe aparecer picos en el tiempo de retención correspondiente a Clotrimazol y Clindamicina en la degradación sobre las Soluciones de placebo y producto: Hidrólisis ácida con HCl 0,1N Hidrólisis básica con NaOH 0,1N Oxidación H ₂ O ₂ al 3%. Fotolítica

Continuación tabla 11.

LINEALIDAD SISTEMA	$r^2 > 0,99$ Los límites de confianza para la pendiente no deben incluir el cero
LINEALIDAD DEL MÉTODO	$r^2 > 0,98$
PRECISIÓN REPETIBILIDAD: PRECISION INTERMEDIA (Reproducibilidad intralaboratorio):	%CV <2.0% para n = 6 % CV repetibilidad < 2,0% F calculada Analista ≤ 5,31 F calculada Analista/Día ≤ 5,31 % CV GLOBAL < 2,0%
LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	Menor a 10 ppm
EXACTITUD (% recuperación)	% CV ≤ 2.0% Intervalo de confianza debe incluir el 100% El porcentaje de recuperación debe estar entre 97,0% -103,0%
ROBUSTEZ	La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición respecto a la condición normal debe ser <2,0%

Fuente : Quality Farma⁸⁹, QUATTROCCHI⁹⁰, ARTEAGA AGUIRRE⁹¹

⁸⁹ QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S(2016) op, cit., p.88.

⁹⁰ QUATTROCCHI O. (1992) op, cit., p. 313-314.

⁹¹ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 61.

3.3 PERIODO Y CONDICIONES DE VALIDEZ

La validación de la técnica deberá ser revisada según los parámetros definidos por la empresa Quality Farma Análisis S.A.S en los siguientes casos:

- Se modifica la metodología de la técnica de análisis original.
- Se cambia el sistema cromatográfico inicial fuera del rango de robustez evaluado.
- Se hacen cambios en la composición cualicuantitativa del producto.

3.4 PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN

3.4.1 Selectividad

Para comprobar que ninguno de los componentes de los productos, interfieren, se llevó a cabo el análisis de solución estándar Clotrimazol, solución estándar Clindamicina, solución estándar mixto, solución placebo, solución producto, inyectando por duplicado cada una de las soluciones y se verificó que no se generen picos que interfieran en la identificación y cuantificación de los principios activos Clotrimazol y de Clindamicina.

Tanto para la solución placebo y la solución producto se realizó:

- Degradación fotolítica
- Degradación oxidativa
- Hidrólisis ácida
- Hidrólisis básica.

3.4.1.1 Degradación del producto

Se preparó una solución producto al 200% de la concentración utilizada para los estándares (Clotrimazol 0,8 mg/mL y Clindamicina 0,4 mg/mL) y se sometieron a los procesos de degradación, se preparó la solución stock producto (200%) de la siguiente manera:

- Se pesó con exactitud 40,3 mg de materia prima de Clotrimazol al 99,3%, se llevó a un balón de 50 mL.
- Se pesó con exactitud 23,9 mg de materia prima Fosfato de Clindamicina, (el cual corresponde al 83,8% de Clindamicina base) se adicionó al balón de 25 mL que contenía el Clotrimazol
- Se adicionó 85,0 mg de placebo preparado en la sección 3.1.8.
- Se agregó 40 mL de diluyente y someter a ultrasonido por 5 minutos, se dejó reposar a temperatura ambiente y se completó el volumen con diluyente.
- Concentración final Clotrimazol 0,8 mg/mL y Clindamicina 0,4 mg/mL

Las soluciones degradadas se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo y tuvieron la misma concentración teórica que la utilizada en la sección 3.1.6 (Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL sin considerar el proceso de degradación) por lo cual se realizó una dilución la cual se especifica a continuación:

a) Degradación fotolítica:

Se transfirió una alícuota de 5 mL de solución producto al 200%, a un balón aforado de 10mL, se expusieron a luz ultravioleta durante 8 horas y se completó a volumen con diluyente. (Concentración final Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL).

b) Degradación oxidativa:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución producto al 200%, se adicionó 3 mL de peróxido de hidrogeno al 3%, se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL y se completó a volumen con diluyente. (Concentración final Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL)

c) Hidrólisis ácida:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución producto al 200%, se adicionó 3 mL de Ácido Clorhídrico al 0,1N; se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL, se completó a volumen con diluyente y se verificó el pH de la solución, se filtró por membrana de 0,45 micras y se desgasificó por 3 minutos antes de inyectar al cromatógrafo. (Concentración final Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL)

d) Hidrólisis básica:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución producto al 200%, se adicionó 3 mL de Hidróxido sodio al 0,1N; se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL, se completó a volumen con diluyente y se verificó el pH de la solución, se filtró por membrana de 0,45 micras PVDF y se desgasificó por 3 minutos de antes de inyectar al cromatógrafo. (Concentración final Clotrimazol 0,4 mg/mL y Clindamicina 0,2 mg/mL).

3.4.1.2 Degradación de placebo.

Se preparó una solución stock placebo de la siguiente manera:

- Se adicionó 85,0 mg de placebo preparado en la sección 3.1.8 en un balón de 50 mL
- Se agregó 40 mL de diluyente y se llevó a ultrasonido por 2 minutos, se dejó reposar a temperatura ambiente y se completó el volumen con diluyente

a) Degradación fotolítica:

Se transfirió una alícuota de 5 mL de solución placebo al 200%, a un balón aforado de 10mL, se expusieron a luz UV durante 8 horas y se completó a volumen con diluyente.

b) Degradación oxidativa:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución placebo al 200%, se adicionó 3 mL de peróxido de hidrogeno al 3%, se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL y se completó a volumen con diluyente.

c) Hidrólisis ácida:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución placebo al 200%, se adicionó 3 mL de Ácido Clorhídrico al 0,1N; se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL, se completó a volumen con diluyente y se verificó el pH de la solución, se filtró por membrana de 0,45 micras y se desgasificó por 3 minutos antes de inyectar al cromatógrafo.

d) Hidrolisis alcalina:

Se transfirió a un tubo de ensayo una alícuota de 5 mL de solución placebo al 200%, se adicionó 3 mL de Hidróxido sodio al 0,1N; se sometió a calentamiento a 40°C durante 1 hora, se dejó en reposo hasta que alcanzó la temperatura ambiente, se transfirió a un balón de 10mL, se completó a volumen con diluyente y se verificó el pH de la solución, se filtró por membrana de 0,45 micras PVDF y se desgasificó por 3 minutos de antes de inyectar al cromatógrafo.

Con los resultados se procedió a calcular el porcentaje de degradación con respecto al estándar en condiciones normales.

$$\text{ECUACIÓN 3} \quad \% \text{Degradación} = 100 - \left(\frac{w_{std} \times Area_{mta}}{Area_{std} \times w_{mta}} \times 100 \right)$$

Donde,

Wstd: Peso de activo en la solución del condiciones normales en mg

Área std: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de la solución de estándar correspondiente al pico deseado.

Área mta: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de cada muestra correspondiente al pico deseado.

Wmta: Peso de activo en la solución degradada en mg

3.4.2 Linealidad del sistema y linealidad del método.

3.4.2.1 Linealidad del sistema.

Se realizó el análisis por triplicado, preparando una curva de calibración de 5 puntos, tomando como límite inferior 50% y como límite superior 150%, a partir de: una solución estándar al 250% de la concentración normal de análisis como se describe a continuación:

Se pesó con exactitud 25,0 mg de Estándar de Clotrimazol al 99,9% y 15,0 mg de estándar Fosfato de Clindamicina (el cual corresponde al 83,4% de Clindamicina base) en un balón de 25 mL, se adicionó 20 mL del diluyente, se llevó a ultrasonido por 5 minutos y se dejó en reposo hasta temperatura ambiente, se aforó a volumen con diluyente. A partir de la solución stock preparada al 250%, se transfirió cuantitativamente:

- 2 mL de solución al 250% a un balón de 10 mL (solución al 50%)
- 3 mL de solución al 250% a un balón de 10 mL (solución al 75%)
- 4 mL de solución stock 250% a un balón de 10mL (solución al 100%)
- 5 mL de solución stock 250% a un balón de 10mL (solución al 125%)
- 6 mL de solución stock 250% a un balón de 10 mL (solución al 150%)

Se aforó cada balón, se filtró las muestras por membrana de 0.45 um en poliamida antes de inyectar en el Cromatógrafo a condiciones normales de análisis.

3.4.2.2 Linealidad del método

Se realizó el análisis por triplicado, realizando una curva de calibración de 5 puntos, tomando como límite inferior 50% y como límite superior 150%, partiendo de una solución stock producto al 250% preparada como se describe a continuación:

- Se pesó con exactitud 25,17 mg de materia prima Clotrimazol al 99,3% y

14,91 mg de materia prima Fosfato de Clindamicina (el cual corresponde al 83,8% de Clindamicina base) en un balón de 25mL.

- Se adicionó 106,2 mg de placebo preparado en la sección 3.1.8, se agregó 20 mL de diluyente, y se llevó a ultrasonido por 5 minutos y se dejó en reposo hasta temperatura ambiente, finalmente se aforó a volumen con diluyente.

A partir de la solución stock producto preparada al 250%, se transfirió cuantitativamente:

- 2 mL de solución al 250% a un balón de 10 mL (solución al 50%)
- 3 mL de solución al 250% a un balón de 10 mL (solución al 75%)
- 4 mL de solución stock 250% a un balón de 10mL (solución al 100%)
- 5 mL de solución stock 250% a un balón de 10mL (solución al 125%)
- 6 mL de solución stock 250% a un balón de 10 mL (solución al 150%)

Se aforó cada balón, se filtró las muestras por membrana de 0,45 um en poliamida antes de inyectar en el cromatógrafo a condiciones normales de análisis.

Con los datos obtenidos de las áreas determinar el porcentaje de recobro, con los resultados obtenidos determinar la ecuación de la recta: $Y= bx+a$ de la cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

En donde: X= concentración del activo en mg

Y= Área

b=Pendiente

a=Intercepto

3.4.3 Precisión

3.4.3.1 Precisión del sistema

Se evaluó la precisión del sistema inyectando estándar combinado de Clotrimazol y Clindamicina consecutivamente seis (6) veces 5 uL de la solución estándar preparada en la sección 3.1.6, Determinando el promedio y coeficiente de variación.

3.4.3.2 Precisión del método.

- Repetibilidad: Se evaluó la precisión de una solución muestra de producto Clotrimazol y Clindamicina capsula blanda inyectando consecutivamente seis (6) veces 5uL.
- Precisión intermedia: Se realizó por dos analistas, en diferentes días preparando por triplicado muestras del producto Clotrimazol y Clindamicina en cápsula blanda.

3.4.4 Exactitud

Se preparó soluciones de producto Clotrimazol + Clindamicina en capsula blanda a concentración de 75%, 100%, 125% con respecto a la concentración de trabajo y se inyectó al cromatógrafo. Se comparó los valores obtenidos con una solución estándar.

3.4.5 Robustez

Se preparó soluciones producto Clotrimazol + Clindamicina en capsula blanda al 100% y se analizaron las muestras bajo las siguientes condiciones:

- Bajo condiciones normales
- Cambio de columna de Shodex C18 4E, 250 mm a LiChrospher 100 RP 18 (5um).
- Cambio de temperatura de temperatura ambiente a 45°C
Cambio de proporciones de la fase móvil Acetonitrilo-Solución fosfato monobásico de potasio 70:30 a 60:40
- Cambio en el Flujo a 0,75 mL/min.

3.4.6 Límites de detección y cuantificación.

Se analizó soluciones producto con concentraciones próximas al límite de cuantificación esperado. Con los resultados obtenidos se determinó la ecuación de la recta: $Y = bx + a$ de la concentración vs área promedio

En donde: X= concentración del activo en ppm

Y= área

b=Pendiente

Extrapolando a concentración cero se obtuvo un estimado de la señal del blanco la correspondiente al término independiente: Y_b (intercepto)

Se construyó la ecuación de la recta de la desviación estándar de la señal vs la concentración y se determinó la ecuación de la recta:

En donde: X= concentración del activo en ppm

Y= Desviación estándar (s)

Extrapolando a concentración cero se obtuvo como desviación estándar (estimado del blanco) la correspondiente al término independiente:

S_b intercepto

n: Corresponde al número de medidas individuales

Con los datos obtenidos se calculó los límites de detección y cuantificación teóricos con base a las siguientes ecuaciones (ver referencia 54).

$$\text{ECUACIÓN 4} \quad LOD = \frac{Y_b + 3S_b}{b\sqrt{n}}$$

$$\text{ECUACIÓN 5} \quad LOQ = \frac{Y_b + 10S_b}{b\sqrt{n}}$$

Dónde:

Y_b : Intercepto de la recta de la concentración vs área promedio.

S_b : Intercepto de la recta de la desviación estándar de la señal vs la concentración.

n: Corresponde al número de medidas individuales.

b: Pendiente de la recta de la concentración vs área promedio.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Preparación de la solución de estándar para evaluar la idoneidad del sistema.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la idoneidad del sistema se presentan a continuación.

Tabla 12. Resultados del la idoneidad del sistema para Clindamicina.

INYECCIÓN	ÁREA	ASIMETRÍA	N	K	T _R
1	291827	1,46	2370	224,00	2,25
2	295573	1,58	2349	224,33	2,25
3	290648	1,49	2387	224,33	2,25
4	291463	1,47	2397	224,33	2,25
5	298976	1,53	2359	224,33	2,25
6	302997	1,57	2343	224,33	2,25
PROMEDIO	295247	1,52	2368	224,28	2,25
Desviación estándar	4924,23	0,05	21,31	0,13	0,00
%CV	1,67	3,38	0,90	0,06	0,00
Intervalo permitido tiempo de retención: 2,03-2,48					

Fuente: Esta investigación.

Los valores correspondientes a platos teóricos y factor capacidad son calculados automáticamente por el equipo basándose en las siguientes formulas:

$$\text{ECUACIÓN 6 } N = 16 * \left(\frac{T_r}{W_{\text{tan}}} \right)^2$$

Donde:

N: Platos teóricos

T_r: Tiempo de retención

W_{tan}: Anchura del pico medido entre las tangentes a los punto de inflexión y la línea base

$$\text{ECUACIÓN 7 } K = \frac{T_r - T_0}{T_0}$$

K: Factor capacidad

T_r: Tiempo de retención

T₀: Tiempo de volumen muerto

Tabla 13. Resultados de la idoneidad del sistema para Clotrimazol.

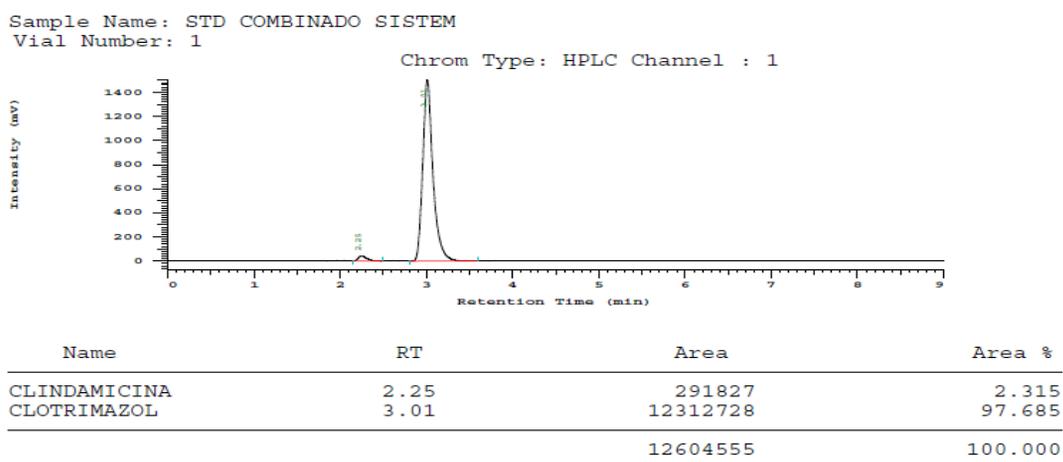
INYECCIÓN	ÁREA	ASIMETRIA	N	K	T _R
1	12312728	1,34	3397	300,00	3,01
2	12195947	1,34	3419	300,33	3,01
3	12241754	1,31	3407	300,33	3,01
4	12334060	1,34	3383	300,33	3,01
5	12387840	1,31	3374	300,00	3,01
6	12413609	1,33	3362	299,67	3,01
PROMEDIO	12314323	1,33	3390	300,11	3,01
Desviación estándar	83586,71	0,01	21,29	0,27	0,00
%CV	0,68	1,11	0,63	0,09	0,00
Intervalo permitido tiempo de retención 2,71-3,31					

Fuente: Esta investigación.

Criterios de aceptación: Para la serie consecutiva de inyecciones del estándar se debe obtener: Para el pico de Clotrimazol y el de Clindamicina, un número de platos teóricos N no menor a 2000, una asimetría no mayor a 2,0 y una desviación estándar relativa de áreas no mayor al 2,0 %. (Ver tabla 11)

A continuación se muestra el cromatograma de la primera inyección de las realizadas con el estándar para la idoneidad del sistema

Gráfico 1. Inyección de estándar mixto idoneidad del sistema.



Fuente: esta investigación.

La evaluación de la idoneidad del sistema cromatográfico demuestra que el sistema es adecuado para el uso del método propuesto debido a que cumple con todos los criterios de aceptación, para ambos principios activos los platos teóricos son mayores a 2000, la asimetría es menor a dos, el factor de capacidad es mayor a 2 y el coeficiente de variación de las áreas es menor a 2%, además el intervalo permitido para identificar los picos de Clindamicina y Clotrimazol son 2,03-2,48 minutos para Clindamicina y de 2,71-3,31 minutos para Clotrimazol teniendo en cuenta el criterio propuesto en la tabla 11.

4.2 Preparación de la solución producto (placebo adicionado):

El tiempo de retención de los picos correspondientes a los activos Clotrimazol y Clindamicina en los cromatogramas obtenidos en las inyecciones de la solución producto están en el intervalo permitido para el tiempo de retención de los picos de los activos obtenidos al inyectar la solución de estándar mixto. Se obtuvo los siguientes resultados

Tabla 14. Resultados identificación producto.

Inyección	CLOTRIMAZOL		CLINDAMICINA	
	Área Estándar*	Área Muestra	Área Estándar*	Área Muestra
1	12312728	12321096	291827	302206
2	12195947	12368035	295573	288192
3	12241754	12391343	290648	302184
4	12334060	12368958	291463	296718
5	12387840	12373059	298976	285652
6	12413609	12418152	302997	293867
Promedio	12314323	12373441	295247	294803

Fuente: Esta investigación.

Tabla 15. Resultados tiempos de retención producto.

Inyección	CLOTRIMAZOL	CLINDAMICINA
	Tiempo de retención	Tiempo de retención
1	3,010	2,260
2	3,010	2,260
3	3,010	2.250
4	3,000	2,250
5	3,010	2,260

Continuación tabla 15.

6	3,020	2,260
Promedio	3,010	2,260
S	0,006	0,004
%CV	0,210	0,198
Intervalo tiempo de retención	2,71-3,31	2,03-2,48

Fuente: Esta investigación.

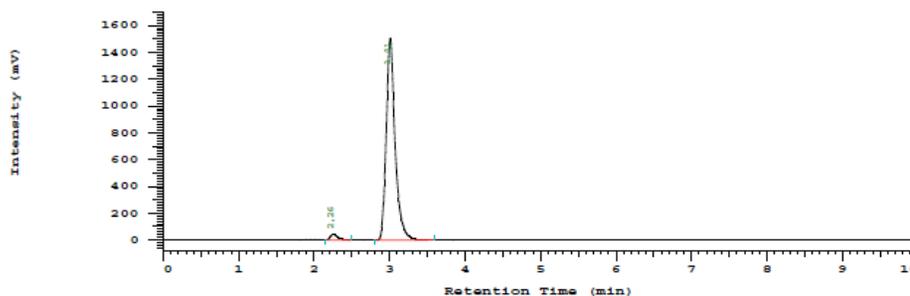
A continuación se muestra el cromatograma de la primera inyección obtenida en la identificación del producto

Gráfico 2. Cromatograma inyección solución producto

Sample Name: SLN PRODUCTO
Volume: 5,0 ul

Vial Number: 2

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Name	RT	Area	Area %
	2,26	302206	2,394
	3,01	12321096	97,606
		12623302	100,000

Fuente: esta investigación.

Teniendo en cuenta los tiempos de retención obtenidos para la solución estándar mixta presentes en las tablas 12 y 13, al compararlos con los obtenidos por la solución producto (ver tabla 15) se puede concluir inequívocamente que los picos obtenidos en las inyecciones de producto

corresponden a los principios activos Clotrimazol y Clindamicina. Los pesos utilizados de los estándares y las materias primas fueron:

Tabla 16. Pesos y diluciones realizadas para la identificación y valoración del producto.

ANALITO	CLINDAMICINA		CLOTRIMAZOL		Unidad
	Estándar	Muestra	Estándar	Muestra	
Peso	6,00	6,00	10,00	10,10	mg
Pureza	83,40	83,80	99,90	99,30	%
Dilución 1	25,00	25,00	25,00	25,00	mL
Alícuota 1	1,00	1,00	1,00	1,00	mL
Dilución 2	1,00	1,00	1,00	1,00	mL
Concentración	0,20	0,20	0,40	0,40	mg/mL

Fuente: Esta investigación.

Se determinó el porcentaje de Clindamicina y Clotrimazol tomando como referencia las áreas promedio de la solución estándar encontradas al inyectar el System Suitability Test (Tabla 12 y Tabla 13) y el promedio de las inyecciones encontradas al inyectar la solución producto y las concentraciones del producto (tabla 16) obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación 2:

% Activo Clindamicina: 99,37

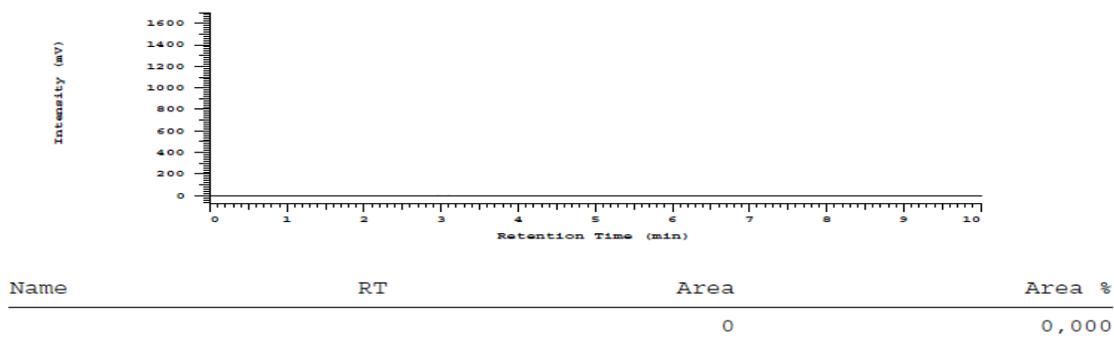
% Activo Clotrimazol: 100,09

Estos resultados pueden inferir que la contribución de área producida por los excipientes presentes en el producto es muy poca o nula, aunque esto se comprobara más adelante con la selectividad.

4.3 Selectividad

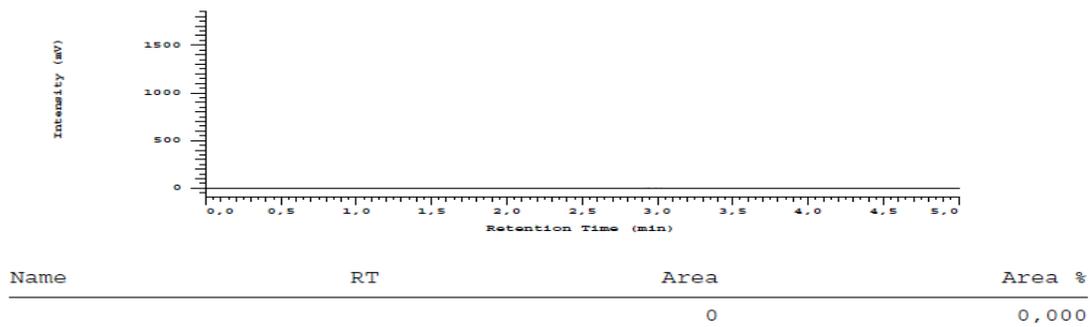
Los cromatogramas obtenidos con solución estándar Clotrimazol, solución estándar Clindamicina, solución estándar mixta, solución placebo, solución producto, y diluyente no presentan picos que interfieran con la identificación y la cuantificación de los activos Clotrimazol y Clindamicina. Por lo cual este método permite la identificación inequívoca de los analitos estudiados sin distorsión de la respuesta del analito debido a que no se presentan picos en las soluciones anteriormente mencionadas a condiciones normales de análisis. A continuación se presentan algunos de los cromatogramas obtenidos en esta sección

Gráfico 3. Cromatograma inyección solución de placebo



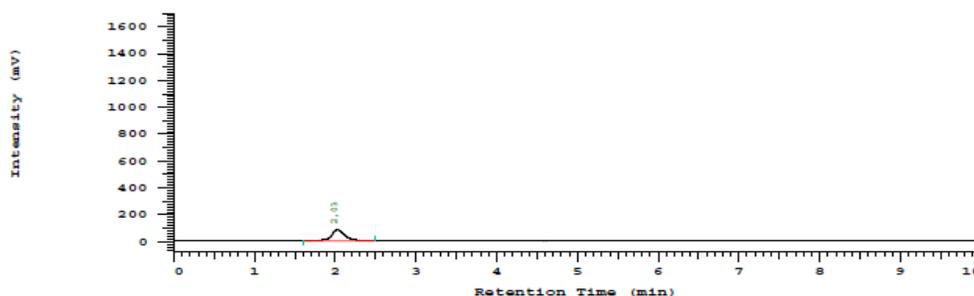
Fuente: Esta investigación.

Gráfico 4. Cromatograma inyección de fase móvil



Fuente: Esta investigación.

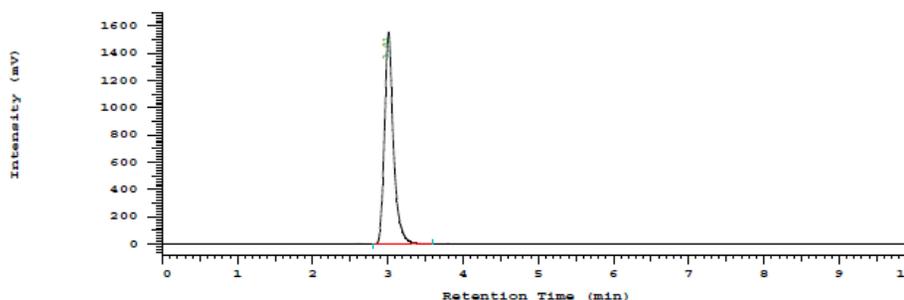
Gráfico 5. Cromatograma inyección estándar de Clindamicina



Name	RT	Area	Area %
	2,03	1039535	100,000
		1039535	100,000

Fuente: Esta investigación.

Gráfico 6. Cromatograma inyección estándar de Clotrimazol



Name	RT	Area	Area %
CLOTRIMAZOL	3,01	12881095	100,000
		12881095	100,000

Fuente: Esta investigación.

Se procedió a la realización de las degradaciones planteadas en la metodología encontrando como conclusión que en el placebo no se genera ningún pico interferente con la identificación de los principios activos; con respecto a las degradaciones realizadas para el producto se encontraron los resultados

utilizando ecuación 3 se calculó el porcentaje de degradación en el producto

Tabla 17. Resultados degradación de Clindamicina en solución producto.

DEGRADACIÓN	Inyección	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Activo	% Degradación	Promedio % Degradación
ácida producto	1	10,000	7,708	77,075	22,925	23,908
	2	10,000	7,511	75,109	24,891	
básica producto	1	10,000	5,484	54,838	45,162	44,845
	2	10,000	5,547	55,472	44,528	
oxidativa producto	1	10,000	0,172	1,719	98,281	98,036
	2	10,000	0,221	2,209	97,791	
fotolítica producto	1	10,000	9,985	99,855	0,145	3,210
	2	10,000	9,373	93,725	6,275	
ácida placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	

Continuación tabla 17.

básica placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	
oxidativa placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	
fotolítica placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	

Fuente: Esta investigación.

Tabla 18. Resultados degradación de Clotrimazol en solución producto.

DEGRADACIÓN	Inyección	Cantidad adicional (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Activo	% Degradación	Promedio % Degradación
Degradación ácida	1	20,000	14,418	72,091	27,909	30,608
	2	20,000	13,339	66,694	33,306	
Degradación básica	1	20,000	12,755	63,773	36,227	33,266
	2	20,000	13,939	69,695	30,305	
Degradación oxidativa	1	20,000	0,526	2,632	97,368	97,216
	2	20,000	0,587	2,936	97,064	
Degradación fotolítica	1	20,020	20,004	99,919	0,081	0,478
	2	20,000	19,825	99,126	0,874	

Continuación tabla 18.

Degradación acida placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	
Degradación básica placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	
Degradación oxidativa placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	
Degradación fotolítica placebo	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	

Fuente: Esta investigación.

Se puede clasificar el grado de daño que sufre el analito frente a las condiciones degradantes en la siguiente tabla

Tabla 19. Clasificación de daño en analito

% ANALITO INALTERADO	DAÑO
100- 80%	Leve
80 – 50%	Moderado
50 – 1%	Severo
<1%	Total

Fuente: Esta investigación.

Observando los valores de porcentaje de activo y porcentaje de degradación (Ver ecuación 2 y 3) presentes en la tabla 17 y 18 se evidencia algunas diferencias entre inyecciones, como por ejemplo en la degradación acida para ambos principios activos, debido a que en la metodología se describe que las degradaciones se realiza bajo una solución stock y posteriormente se hace una dilución y se inyecta dos veces cada degradación (ver sección 3.4.1). Se puede asegurar de que el problema o la fuente de variación no es causada por error de analista ya que todas las mediciones estarían sujetas bajo el mismo error. Esta

variación podría ser explicada por dos factores, el primero puede deberse a que finalizado el tiempo de degradación (1 hora para todas las degradaciones excepto la fotolítica que fueron 8 horas), el proceso de degradación continuo en el tiempo explicando la variación en áreas o también a algún problema o falla de tipo instrumental como por ejemplo algún problema en el inyector producto de que el equipo cuenta con un canal adicional donde se ubica una solución lavadora o disolvente la cual se utiliza para el lavado de la aguja del inyector con la finalidad de disminuir el efecto memoria por arrastre de muestras de análisis, operando una bomba peristáltica que libera o proporciona una cantidad del líquido que lava la aguja, pudo haber sucedido que en el proceso de lavado hallan quedado alguna traza en la aguja y por lo tanto no inyectó la cantidad completa en el análisis, además de que este canal de lavado también es susceptible a adquirir burbujas producto de una inadecuada sonicación de la solución lavadora o también pudo presentarse una fuga en este canal.

Los resultados de las tablas 17 y 18 permiten concluir que el producto sufre una degradación leve para exposición de luz ultravioleta; degradación moderada en condiciones de hidrolisis básica y acida; y degradación severa cuando se trata con agentes oxidantes. Con base a estos resultados se recomienda la no exposición de las muestras a condiciones oxidativas ni su cercanía a sustancias oxidantes.

4.4 Linealidad del sistema

Se realizó el análisis por triplicado, realizando una curva de calibración de 5 puntos, tomando como límite inferior 50% y como límite superior 150%, como se describe a continuación:

- Solución stock estándar al 250%: Se preparó soluciones estándar al 250% a una concentración aproximada de 1 mg/mL de Clotrimazol y 0,5 mg/mL de Clindamicina, con las cuales se realizó las siguientes diluciones:

Tabla 20. Resultados preparación soluciones linealidad del sistema.

Concentración	150%	125%	100%	75%	50%
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clindamicina a std 1:15,0	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clotrimazol std 1:25 mg	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Concentración mg/mL Clindamicina	0,300	0,250	0,200	0,150	0,100
Concentración mg/mL Clotrimazol	0,599	0,500	0,400	0,300	0,200
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clindamicina a std 1:15,1	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clotrimazol std 1:25,1	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Concentración mg/mL Clindamicina	0,302	0,252	0,201	0,151	0,101
Concentración mg/mL Clotrimazol	0,602	0,501	0,401	0,301	0,201
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clindamicina a std 1:15,0	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL

Peso	6mL.SLN.stock	5mL.SLN.stock	4mL.SLN.stock	3mL.SLN.stock	2mL.SLN.stock
Clotrimazol std 1:25,1 mg	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Concentración mg/mL Clindamicina	0,300	0,250	0,200	0,150	0,100
Concentración mg/mL Clotrimazol	0,602	0,501	0,401	0,301	0,201

Fuente: Esta investigación

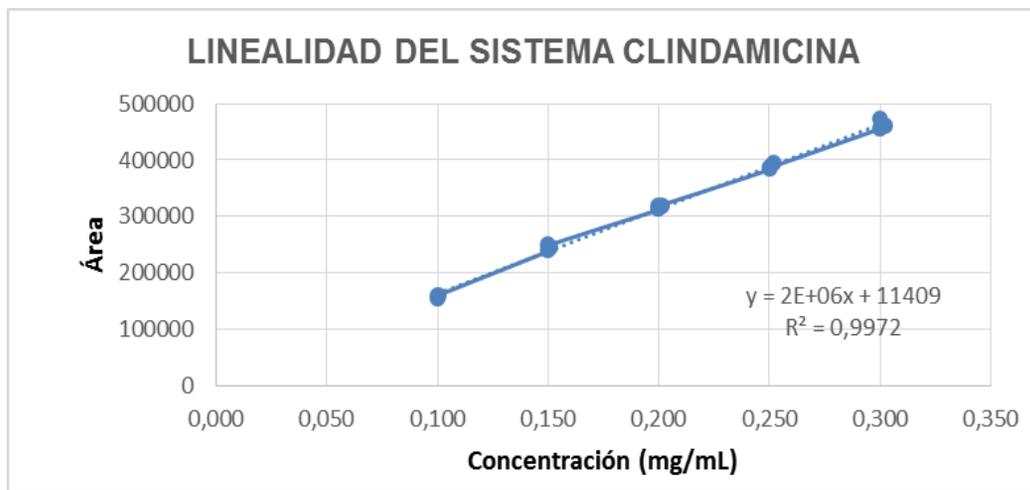
Las concentraciones de las soluciones se calculan teniendo en cuenta las Purezas de los estándares, Clindamicina 83,4% y Clotrimazol 99,9%. Con los datos obtenidos de las áreas promedio de dos inyecciones de cada concentración y las concentraciones respectivas se determina la recta de regresión y se evaluaron los parámetros estadísticos.

Tabla 21. Resultados curva de calibración áreas obtenidas linealidad del sistema.

Nivel %	Clindamicina		Clotrimazol	
	X (mg/mL)	Área	X (mg/mL)	Área
50	0,100	154126	0,200	6877904
	0,101	157702	0,201	7054326
	0,100	159585	0,201	7123418
75	0,150	238556	0,300	9963550
	0,151	243806	0,301	10112342
	0,150	248751	0,301	10277541
100	0,200	312143	0,400	12416891
	0,201	317095	0,401	12557748
	0,200	318676	0,401	12574838
125	0,250	383631	0,500	14562208
	0,252	394433	0,501	14847580
	0,250	387382	0,501	14661377
150	0,300	456179	0,599	16566344
	0,302	459790	0,602	16641793
	0,300	471323	0,602	16967396

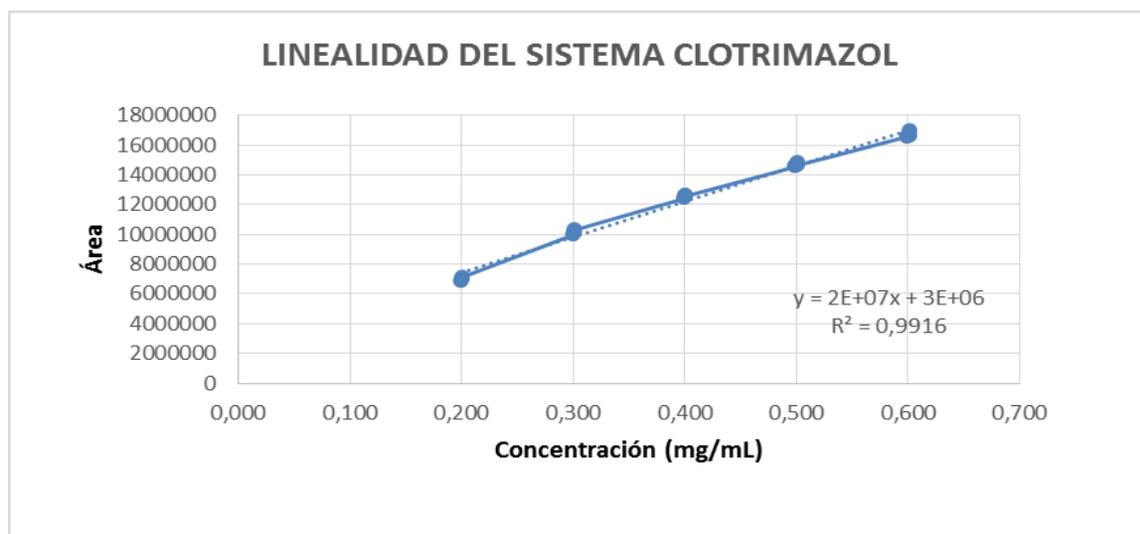
Fuente: Esta investigación.

Gráfico 7. Recta de regresión linealidad del sistema principio activo Clindamicina.



Fuente: Esta investigación.

Gráfico 8. Recta de regresión linealidad del sistema principio activo Clotrimazol.



Fuente: Esta investigación.

Como podemos observar en los gráficos 7 y 8 se dibuja una línea punteada casi solapada con la línea de los datos y representa la tendencia de tipo lineal dibujada por el programa Excel e indica el gráfico obtenido si el coeficiente de determinación es igual a 1.

Tabla 22.Resultados linealidad del sistema para Clindamicina

Nivel %	X (mg/mL)	Y (ÁREA)	XY	XX	YY	Y/X
50	0,100	154126	15425	0,010	23754669750	1540023
	0,101	157702	15888	0,010	24869763102	1565319
	0,100	159585	15971	0,010	25467372225	1594574
75	0,150	238556	35812	0,023	56908965136	1589102
	0,151	243806	36844	0,023	59441365636	1613319
	0,150	248751	37342	0,023	61876811250	1657011
100	0,200	312143	62478	0,040	97432940306	1559465
	0,201	317095	63893	0,041	100549239025	1573716
	0,200	318676	63786	0,040	101554392976	1592106
125	0,250	383631	95984	0,063	147172744161	1533297
	0,252	394433	99345	0,063	155577391489	1566031
	0,250	387382	96923	0,063	150064813924	1548289
150	0,300	456179	136963	0,090	208099280041	1519381
	0,302	459790	138968	0,091	211406384310	1521265
	0,300	471323	141510	0,090	222144899006	1569819
Sumatoria	3,009	4703175	1057133	0,679	1646321032339	23542718
Promedio	0,201	313545	70475,554	0,045	205790129042	2942840
n=	15,000					

Fuente: Esta investigación.

Tabla 23. Resultados linealidad del sistema para Clotrimazol.

Nivel %	X (mg/mL)	Y(Área)	XY	XX	YY	Y/X
50	0,200	6877904	1374205	0,040	47305563433216	34423944
	0,201	7054326	1415092	0,040	49763515314276	35166272
	0,201	7123418	1428952	0,040	50743084002724	35510700
75	0,300	9963550	2986076	0,090	99272318638950	33245077
	0,301	10112342	3042791	0,091	102259450612622	33607118
	0,301	10277541	3092500	0,091	105627849006681	34156138
100	0,400	12416891	4961789	0,160	154179169688990	31073300
	0,401	12557748	5038148	0,161	157697022273756	31300592
	0,401	12574838	5045005	0,161	158126550726244	31343191
125	0,500	14562208	7273823	0,250	212057887273056	29153569
	0,501	14847580	7446032	0,252	220450631856400	29606459
	0,501	14661377	7352651	0,252	214955975536129	29235165
150	0,599	16566344	9929867	0,359	274443753526336	27638212
	0,602	16641793	10014991	0,362	276949257613056	27653471
	0,602	16967396	10210938	0,362	287892527020816	28194523
Sumatoria	6,010	183205253	80612860	2,709	2411724556523250	471307729
Promedio	0,401	12213684	5374191	0,181	301465569565407	58913466
n=	15,000					

Fuente: Esta investigación.

Para ambos principios activos se obtuvo la ecuación de la recta: $Y=bx+a$. En donde X corresponde a la concentración del activo, Y corresponde al área del pico del principio Activo

Tabla 24. Resultados regresión linealidad del sistema.

Principio Activo	Clindamicina	Clotrimazol
Coeficiente de determinación (r^2)	0,9972	0,9916
Intercepto (a)	11408,6086	2618199,9007
Pendiente (b)	1506127,4279	23948858,1816
S_{y,x}	6119,8402	336341,2489
S_b	22278,1389	613042,4215
S_a	4740,2214	260525,1256
Intervalo de confianza de la pendiente	1457998,4348 a 1554256,4209	22624460,5590 a 25273255,8141
Intervalo de confianza del intercepto	1167,9829 a 21649,2163	2055369,5851 a 3181030,2163
Ecuación de la recta	1506127,4279X + 11408,6086	23948858,1816X+2618199,9007
t- calculado	67,6056	39,0656
t- tabulado	2,1604	

Fuente: Esta investigación.

Observando los datos de la tabla 24 se encontró que los coeficientes de determinación son mayores a 0,990 cumpliéndose así el criterio de aceptación propuesto en la tabla 11, entre más cercano este el coeficiente de determinación de la unidad existe una correlación entre las variables x (concentración) y Y (Área) con probabilidad elevada, pero el estudio de la linealidad no solo implica la representación gráfica, sino que es necesario una comprobación estadística para

lo cual se aplicó el test de Student⁵², comparando el valor calculado con el valor tabulado al nivel de significancia del 95% utilizando un contraste de t de dos colas y (n-2) grados de libertad se observa que t calculado es mayor que el t- tabulado lo cual permite afirmar que la linealidad del sistema tiene una correlación significativa entre concentración y el área o la respuesta experimental en el rango de trabajo utilizado (Clotrimazol 0,2 mg/mL hasta 0.6 mg/mL y Clindamicina 0,1 mg/mL hasta 0.3 mg/mL).

Se determinó los errores aleatorios calculando el estadístico $S_{y,x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección del eje Y, a partir de este valor se calculó las desviaciones estándar de la pendiente (S_b) y la desviación estándar en el origen (S_a), a partir de los parámetros S_b y S_a se estimó los límites de confianza de la pendiente (Ver tabla 24). Utilizando las siguientes ecuaciones (ver referencia 92):

$$\text{ECUACIÓN 8 } S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum Y_i^2 - a\sum Y_i - b\sum X_i Y_i}{n - 2}}$$

$$\text{ECUACIÓN 9 } S_b = \sqrt{\frac{S_{y,x}^2}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

$$\text{ECUACIÓN 10 } S_a = \sqrt{S_b^2 * \frac{\sum X_i^2}{n}}$$

Dónde:

b:Pendiente

Y_i : Valor medido en el ensayo

a: Intercepto

X_i : Concentración

n: Numero de mediciones

Σ : Sumatoria

Criterios de aceptación: $r^2 \geq 0,99$

Intervalo de confianza de la pendiente: No debe incluir el cero

4.5 Linealidad del método

Se realizó el análisis por triplicado de muestras de producto, preparando una curva de calibración de cinco puntos, tomando como límite inferior 50% y como límite superior 150%, preparando soluciones producto al 250% a una concentración aproximada de 1 mg/mL de Clotrimazol y 0,5 mg/mL de Clindamicina, con las cuales se realizó las siguientes diluciones

Tabla 25. Resultados preparación soluciones linealidad del método.

Concentración	150%	125%	100%	75%	50%
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clindamicina	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clotrimazol	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Concentración mg/mL	0,300	0,250	0,200	0,150	0,100
Concentración mg/mL	0,620	0,516	0,413	0,310	0,207
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clindamicina	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Peso	<i>6mL.SLN.stock</i>	<i>5mL.SLN.stock</i>	<i>4mL.SLN.stock</i>	<i>3mL.SLN.stock</i>	<i>2mL.SLN.stock</i>
Clotrimazol	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL
Concentración mg/mL	0,298	0,248	0,198	0,149	0,099

Continuación tabla 25

Concentración mg/mL	0,620	0,516	0,413	0,310	0,207
Peso Clindamicin	6mL.SLN.stock 10mL	5mL.SLN.stock 10mL	4mL.SLN.stock 10mL	3mL.SLN.stock 10mL	2mL.SLN.stock 10mL
Peso Clotrimazol	6mL.SLN.stock 10mL	5mL.SLN.stock 10mL	4mL.SLN.stock 10mL	3mL.SLN.stock 10mL	2mL.SLN.stock 10mL
Concentración mg/mL	0,306	0,255	0,204	0,153	0,102
Concentración mg/mL	0,102	0,153	0,204	0,255	0,306

Fuente: Esta investigación

Las concentraciones de las soluciones se calculan teniendo en cuenta las Purezas de las materias primas utilizadas, Clindamicina 83,8% y Clotrimazol 99,3%

Con los datos obtenidos de las áreas y concentraciones respectivas se determinó la recta de regresión y se evaluaron los parámetros estadísticos.

Tabla 26. Resultados áreas obtenidas para la linealidad del método.

Nivel %	Clindamicina		Clotrimazol	
	Cantidad adicionada (mg)	Área	Cantidad adicionada (mg)	Área
50	0,999	159706	2,065	6901837
	0,992	154655	2,065	6799934
	1,019	153908	2,010	6711712
75	1,498	235474	3,098	9818486
	1,488	232415	3,098	9596014
	1,529	227484	3,015	9670167

Continuación tabla 26

100	1,998	315562	4,131	12495422
	1,984	303147	4,131	12014897
	2,038	310213	4,020	12311972
125	2,497	385841	5,164	14581383
	2,480	376958	5,164	14301444
	2,548	375598	5,025	14217278
150	2,997	467905	6,196	16896286
	2,977	454988	6,196	16445671
	3,057	454945	6,029	16447063

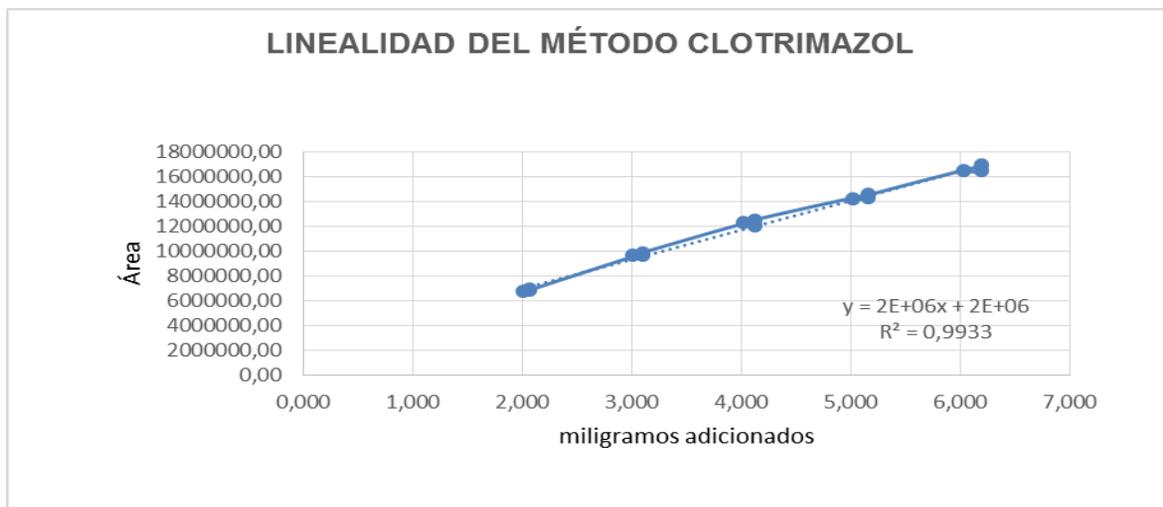
Fuente: Esta investigación.

Gráfico 9. Recta de regresión linealidad del método principio activo Clindamicina.



Fuente: Esta investigación.

Gráfico 10. Recta de regresión linealidad del método principio activo Clotrimazol.



Fuente: Esta investigación.

Como podemos observar en los gráficos 9 y 10 se dibuja una línea punteada casi solapada con la línea de los datos y representa la tendencia de tipo lineal dibujada por el programa Excel e indica el gráfico correspondiente si el coeficiente de determinación es igual a 1.

También se observa un coeficiente de determinación mayor al criterio de aceptación ($r^2 > 0,98$ ver tabla 11) demostrando que la linealidad del método tiene una respuesta de tipo lineal que facilita su trazado e interpretación en el rango de trabajo utilizado.

Tabla 27. Resultados linealidad del sistema para Clindamicina.

Nivel %	mg adicionados	Y	XY	XX	YY	Y/X
50	0,999	159706	159529	0,998	25505846730	159882
	0,992	154655	153447	0,984	23918014370	155872
	1,019	153908	156833	1,038	23687518556	151037
75	1,498	235474	352820	2,245	55447769202	157156
	1,488	232415	345900	2,215	54016732225	156163
	1,529	227484	347712	2,336	51748970256	148827
100	1,998	315562	630427	3,991	99579375844	157955
	1,984	303147	601559	3,938	91897800462	152766
	2,038	310213	632219	4,154	96232105369	152213
125	2,497	385841	963536	6,236	148872891440	154507
	2,480	376958	935036	6,153	142096956806	151970
	2,548	375598	956842	6,490	141073482006	147437
150	2,997	467905	1402164	8,980	218934621120	156141
	2,977	454988	1354306	8,860	207014080144	152856
	3,057	454945	1390778	9,345	206974953025	148820
Sumatoria	30,101	4608795	10383109	67,964	1587001117557	2303600
Promedio	2,007	307253	692207	4,531	198375139695	287950
n=	15,000					

Fuente: Esta investigación.

Tabla 28. Resultados linealidad del método para Clotrimazol.

Nivel %	mg adicionados	Y	XY	XX	YY	Y/X
50	2,065	6901837	14255329	4,266	47635347072732	3341582
	2,065	6799934	14044855	4,266	46239095604422	3292245
	2,010	6711712	13489414	4,039	45047077970944	3339439
75	3,098	9818486	30419241	9,599	96402667332196	3169135
	3,098	9596014	29729987	9,599	92083484688196	3097327
	3,015	9670167	29153117	9,089	93512129807889	3207620
100	4,131	12495422	51617087	17,064	156135558462662	3024881
	4,131	12014897	49632096	17,064	144357737905712	2908556
	4,020	12311972	49489991	16,158	151584654528784	3062936

Continuación tabla 28.

125	5,164	14581383	75292427	26,663	212616715611306	2823879
	5,164	14301444	73846936	26,663	204531300485136	2769665
	5,025	14217278	71435851	25,246	202130993729284	2829546
150	6,196	16896286	104694792	38,394	285484463697510	2726826
	6,196	16445671	101902640	38,394	270460094640241	2654103
	6,029	16447063	99167498	36,355	270505864878906	2727767
Sumatoria	61,407	179209563	808171257	282,859	2318727186415920	44975506
Promedio	4,094	11947304	53878084	18,857	289840898301990	5621938
n=	15,000					

Fuente: Esta investigación.

Para ambos principios activos se obtuvo la ecuación de la recta: $Y=bx+a$

En donde $X=$ mg de activo adicionado

$Y=$ Área del pico del principio activo

Tabla 29. Resultados regresión linealidad del método.

Principio Activo	Clindamicina	Clotrimazol
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9961	0,9933
Intercepto (a)	6083,9238	2253069,4948
Pendiente (b)	150079,4540	2368023,7744
$S_{y,x}$	7180,1002	302150,8273
S_b	2611,4931	53861,1214
S_a	5558,8152	233891,6568
Ecuación de la recta	$Y= 150079,4540X + 6083,9238$	$Y= 2368023,7744X + 2253069,4948$
t- calculado	57,4688	43,9654
t -tabulado	2,1604	

Fuente: Esta investigación.

Observando los datos de la tabla 29 se encontró que los coeficientes de determinación son mayores a 0,98 cumpliéndose así el criterio de aceptación propuesto en la tabla 11, también es necesario mencionar que la literatura consultada establece un valor de coeficiente de determinación mayor a 0,99; el valor de 0,98 que se propuso es el parámetro que utiliza el laboratorio, entre más cercano este el coeficiente de determinación de la unidad existe una correlación entre las variables x (concentración) y Y (Área) con probabilidad elevada, pero el estudio de la linealidad no solo implica la representación gráfica, sino que es necesario una comprobación estadística para lo cual se aplicó el test de Student, comparando el valor calculado con el valor tabulado al nivel de significancia del 95% utilizando un contraste de t de dos colas y (n-2) grados de libertad se observa que t calculado es mayor que el t- tabulado lo cual permite afirmar que la linealidad del método tiene una correlación significativa entre concentración y el área o la respuesta experimental en el rango de trabajo utilizado (Clotrimazol 0,2 mg/mL hasta 0.6 mg/mL y Clindamicina 0,1 mg/mL hasta 0.3 mg/mL)

Se determinó los errores aleatorios calculando el estadístico $S_{y,x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección del eje Y, a partir de este valor se calculó las desviaciones estándar de la pendiente (S_b) y la desviación estándar en el origen (S_a), a partir de los parámetros S_b y S_a (Ver tabla 29 y ecuaciones 8, 9 y 10).

Por solicitud de la empresa se realizó un análisis adicional no reportado en la revisión bibliográfica realizada para la evaluación de la linealidad comparando las áreas obtenidas en la linealidad del sistema y la linealidad del método, se calculó la recuperación o porcentaje de recobro, para esto se tomó el promedio de las inyecciones obtenidas en la linealidad del sistema para cada nivel obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 30. Resultados recobro linealidad del método Clindamicina.

Nivel %	Cantidad adicionada mg	Área	Cantidad recuperada mg	% Recobro
50	0,999	159706	1,019	102,054
	0,992	154656	0,987	99,494
	1,019	153908	0,982	96,408
75	1,498	235474	1,454	97,022
	1,488	232415	1,435	96,409
	1,529	227484	1,404	91,880
100	1,998	315562	2,003	100,283
	1,984	303146	1,925	96,989
	2,038	310213	1,969	96,638
125	2,497	385841	2,491	99,730
	2,480	376958	2,433	98,093
	2,548	375598	2,424	95,167
150	2,997	467905	3,045	101,602
	2,977	454988	2,961	99,465
	3,057	454945	2,960	96,838
Promedio	2,007	307253	1,999	97,871
Desviación estándar				3
%CV				2,696

Fuente: Esta investigación.

Tabla 31.Resultados recobro linealidad del método Clotrimazol.

Nivel %	Cantidad adicionada mg	Área	Cantidad recuperada mg	% Recobro
50	2,065	6901837	1,970	95,380
	2,065	6799934	1,941	93,972
	2,010	6711712	1,916	95,319
75	3,098	9818486	2,916	94,123
	3,098	9596014	2,850	91,991
	3,015	9670167	2,872	95,266
100	4,131	12495422	4,000	96,830
	4,131	12014897	3,846	93,106
	4,020	12311972	3,941	98,048
125	5,164	14581383	4,971	96,273
	5,164	14301444	4,876	94,425
	5,025	14217278	4,847	96,466
150	6,196	16896286	6,071	97,985
	6,196	16445671	5,910	95,372
	6,029	16447063	5,910	98,019
Promedio	4,094	11947304	4,293	95,505
Desviación estándar				1,810
%CV				1,895

Fuente: Esta investigación.

Para el cálculo de la cantidad recuperada en miligramos y del porcentaje de recobro se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{ECUACIÓN 11 } mg \text{ Recuperados} = \frac{W_{promstd} * \text{Área}_{mta}}{\text{Área}_{promstd}}$$

$W_{promstd}$: Peso promedio de estándar en el nivel correspondiente en mg

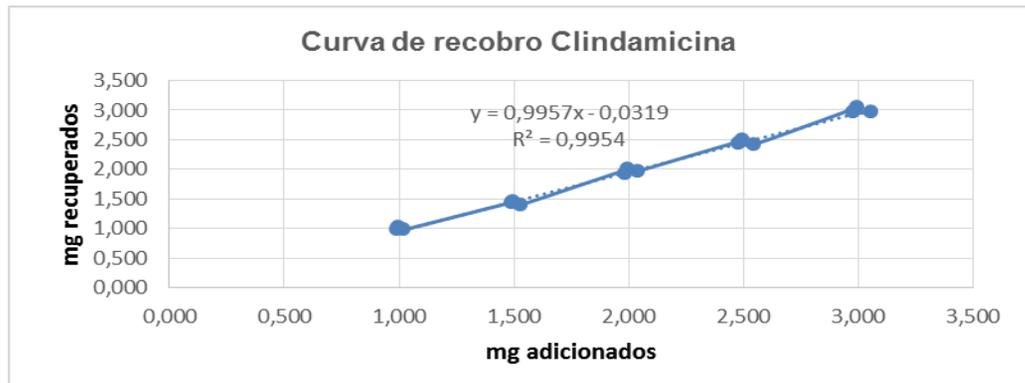
$\text{Área}_{promstd}$: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de la solución de estándar en el nivel deseado.

Área_{mta} : Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de cada muestra correspondiente al pico deseado.

$$\text{ECUACIÓN 12 } \% \text{ Recobro} = \frac{mg_{recuperados}}{mg_{agregados}} \times 100$$

Como podemos observar los valores de los coeficientes de variación de las tablas 30 y 31 son de 2,696 y 1,895; los coeficientes de variación aceptados S para el porcentaje de recobro específicamente para el análisis entre los miligramos adicionados y recuperados por el laboratorio Quality Farma Análisis S.A.S deben ser menores al 4%. Se determinó la recta de regresión recta entre los miligramos adicionados y los miligramos recuperados para cada activo y se evaluaron los parámetros estadísticos, como se indica a continuación:

Gráfico 11. Recta de regresión lineal para los miligramos recuperados de principio activo Clindamicina.



Fuente: esta investigación.

Gráfico 12. Recta de regresión lineal para los miligramos recuperados de principio activo Clotrimazol.



Fuente: esta investigación.

Como podemos observar en los gráficos 11 y 12 se dibuja una línea punteada casi solapada con la línea de los datos y representa la tendencia de tipo lineal dibujada por el programa Excel e indica el gráfico correspondiente si el coeficiente de determinación es igual a 1.

Con base en los cálculos presentes en el documento VE-F-002 paginas 13 al 18, se resume los resultados en la siguiente tabla.

Tabla 32. Resultados regresión mg recuperados vs mg adicionados.

Principio Activo	CLINDAMICINA	CLOTRIMAZOL
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9954	0,9963
Intercepto (a)	-0,0319	0,0107
Pendiente (b)	0,9957	0,9762
Porcentaje promedio del recobro	97,8715	95,5049
Porcentaje de covarianza del recobro (% CV)	2,6962	1,8951
t- calculado	52,8169	59,489
t -tabulado	2,1604	

Fuente: Esta investigación.

Observando los datos de la tabla 32 se encontró que los coeficientes de determinación son mayores a 0,98 cumpliéndose así el criterio de aceptación propuesto en la tabla 11, entre más cercano este el coeficiente de determinación de la unidad existe una correlación entre las variables X (concentración) y Y (Área) con probabilidad elevada, pero el estudio de la linealidad no solo implica la representación gráfica, sino que es necesario una comprobación estadística para lo cual se aplicó el test de Student, comparando el valor calculado con el valor tabulado al nivel de significancia del 95% utilizando un contraste de t de dos colas y (n-2) grados de libertad se observa que t calculado es mayor que el t-tabulado lo cual permite afirmar que la recuperación tiene una correlación significativa entre mg adicionados y mg recuperados.

4.6 Precisión (repetibilidad)

Se evaluó la precisión para la señal de Clotrimazol y Clindamicina, inyectando consecutivamente seis (6) veces 5 uL de una solución muestra de producto. Se comparó con seis inyecciones obtenidas de una solución estándar a la misma concentración, determinando el promedio, coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación obtenido.

Tabla 33. Resultados solución estándar repetibilidad Clindamicina.

Inyección	Peso mg	ÁREA
1	5,00	317526
2		309201
3		310793
4		308318
5		312029
6		316929
Promedio		312466
Desviación estándar		3908,40
% CV		1,25

Fuente: Esta investigación.

Tabla 34. Resultados solución estándar Repetibilidad Clotrimazol.

Inyección	Peso mg	ÁREA
1	10,00	12212704
2		12280497
3		12440907
4		12398042

Continuación tabla 34.

5		12314216
6		12639960
Promedio		12381054
Desviación estándar		150880,11
% CV		1,22

Fuente: Esta investigación.

Tabla 35. Resultados muestras repetibilidad Clindamicina.

Inyección	Peso mg	Área muestra	% Recuperado
Std	5,00	312466,0	NA
1	4,80	293339	97,79%
2		297454	99,16%
3		299351	99,79%
4		295105	98,38%
5		293771	97,93%
6		296516	98,85%
Promedio			98,65%
Desviación estándar			0,01
% CV			0,78

Fuente: Esta investigación.

Tabla 36. Resultados muestras repetibilidad Clotrimazol.

Inyección	Peso mg	Área muestra	% Recuperado
Std	9,99	12381054,3	NA
1	10,0	12177205	98,06%
2		12380552	99,70%

Continuación tabla 36

3		12374323	99,65%
4		12442998	100,20%
5		12333325	99,32%
6		12328388	99,28%
Promedio=			99,37%
Desviación estándar=			0,01
% CV=			0,73

Fuente: Esta investigación.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor al 2% (Ver tabla 11)

En los valores obtenidos en las tablas 33 y 34 se observa un coeficiente de variación menor al 2%^{92,93} para los estándares (1,25% y 1,21% respectivamente para Clindamicina y Clotrimazol) lo cual indica un alto grado de concordancia en los resultados obtenidos bajo el mismo proceso experimental, al calcular el porcentaje de recuperación utilizando la ecuación 2, se observa unos valores promedio de recuperación del 98,65% para Clindamicina (Tabla 35) y de 99,37%

⁹² QUATTROCCHI O. (1992) op, cit., p. 317.

⁹³ ARTEAGA AGUIRRE (2001) op, cit., p. 70.

para Clotrimazol (Tabla 36) y de igual manera se encontraron coeficientes de variación menores a la unidad permitiendo concluir que el método es repetible bajo el mismo proceso experimental efectuado sobre la misma muestra bajo condiciones constantes establecidas.

4.7 Precisión intermedia.

Se realizó por dos analistas, en diferentes días preparando por triplicado muestras de producto, como se describe en la sección 3.1.9, y solución estándar en la sección 3.1.6, se resume los resultados en las siguientes tablas

Tabla 37. Resultados % recuperado Clindamicina precisión intermedia.

	Analista 1 %	Analista 2 %
Día 1	99,595	101,553
	101,234	100,920
	99,585	99,568
Día 2	101,886	99,922
	101,124	100,075
	101,054	100,371

Fuente: Esta investigación.

Tabla 38. Resultados % recuperado Clotrimazol precisión intermedia.

	Analista 1 %	Analista 2 %
Día 1	100,966	100,277
	100,981	100,423
	100,354	100,399
Día 2	100,664	101,042
	99,794	100,719
	101,018	100,830

Fuente: esta investigación.

Tabla 39. Resultados precisión intermedia.

PRINCIPIO ACTIVO	CLINDAMICINA	CLOTRIMAZOL
Promedio del porcentaje de recobro	100,574	100,622
Coefficiente de variación (% CV)	0,817	0,379

Fuente: Esta investigación.

Tabla 40. Análisis de Varianza Clindamicina.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor F tabulado</i>
Muestra	0,32640	1	0,32640	0,59537	0,46253	5,31766
Analista	0,35638	1	0,35638	0,65005	0,44340	5,31766
Analistas/	2,36158	1	2,36158	4,30767	0,07162	5,31766
Día	4,38582	8	0,54823			
Total	7,43018	11				

Fuente: Esta investigación

Tabla 41. Análisis de Varianza Clotrimazol.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor F tabulado</i>
Muestra	0,03724	1	0,03724	0,26720	0,61920	5,31766
Analista	0,00065	1	0,00065	0,00464	0,94738	5,31766
Analistas/ Día	0,44704	1	0,44704	3,20739	0,11108	5,31766
Total	1,15997	8	0,13938			
		11				

Fuente: Esta investigación.

Criterios de aceptación:

El % CV debe ser menor o igual a 2%.

Análisis de varianza: F calculada para la fuente de variación Analista debe ser menor a la F tabulada

Análisis de varianza: F calculada para la fuente de variación Analista/día debe ser menor a la F tabulada.

El método analítico para cuantificar Clotrimazol y Clindamicina es reproducible debido a que los resultados de la tabla 39 presenta un coeficiente de variación menor a 2% para ambos principios activos es decir presente un alto grado de concordancia en los resultados obtenidos, se realizó el análisis de varianza para verificar que las fuentes de variación analista y analista/día no fueran significativas, con ayuda del test de Fisher se encontró que el valor de F calculado es menor al valor de F tabulado por lo cual se puede concluir que las fuentes de variación analizadas no son significativas, por lo cual el método es reproducible bajo modificaciones de los factores día de análisis y cambio de analista.

4.8 Límites de detección y cuantificación.

Se analizaron muestras de producto (placebo adicionado) con concentraciones, próximas al límite de cuantificación esperado (ver tabla 11), se preparó 3 soluciones a 10,0 ppm, a 7,5 ppm y a 5,0 ppm se inyectó dos veces cada estándar y se obtuvo los siguientes resultados

Tabla 42. Resultados soluciones para límites de detección y de cuantificación de Clindamicina.

Concentración (ppm)	Área	Área promedio	Desviación estándar
10,0	137012,0 136770,0	136891,0	171,2
7,5	81417,0 80236,0	80827,5	835,1
5,0	13439,0 15341,0	14390,0	1344,9

Fuente: Esta investigación.

Tabla 43. Resultados soluciones para límites de detección y de cuantificación de Clotrimazol.

Concentración (ppm)	Área	Área promedio	Desviación estándar
20,0	952752,0 906158,0	929455,0	32946,9
15,0	729458,0 705204,0	717331,0	17150,2
10,0	424584,0 425965,0	425275,5	976,5

Fuente: Esta investigación.

Con los resultados obtenidos se determinó la ecuación de la recta: $Y = bx + a$ de la concentración vs área promedio para cada principio activo, los valores obtenidos se registran en la tabla 44, en donde:

X= concentración del activo en ppm

Y=área

Tabla 44. Resultados de la regresión concentración vs áreas.

Principio Activo	Clindamicina	Clotrimazol
Coefficiente de determinación (r^2)	0,998	0,992
Intercepto (a) (Y_b)	-106382,333	-65583,917
Pendiente (b)	24500,200	50418,050
Ecuación de la recta	$Y = 24500,200X - 106382,333$	$Y = 50418,050X - 65583,917$

Fuente: Esta investigación

Extrapolando a concentración cero se obtiene como señal ruido la correspondiente al término independiente (Y_b), para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se construye la recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, obteniendo las ecuaciones de la recta $Y = bx + a$ presentes en la tabla 45,

en donde: X= concentración del activo en ppm

Y= Desviación estándar de la señal

Tabla 45. Resultados de la regresión concentración vs desviación estándar de la señal.

Principio Activo	Clindamicina	Clotrimazol
Coefficiente de determinación (r^2)	0,994	0,999

Continuación tabla 45.

Intercepto (a) (S_b)	2544,406	-30931,090
Pendiente (b_s)	-234,759	3197,042
Ecuación de la recta	Y=-234,759X+ 2544,406	Y=3197,042X - 30931,090

Fuente: esta investigación.

Se considera que la desviación estándar de las respuestas corresponderá al valor de la ordenada en el origen de esta recta, con los valores obtenidos se procede a calcular los límites teóricos de detección y cuantificación usando las ecuaciones 4 y 5.

Tabla 46. Resultados límite de cuantificación y detección para Clotrimazol y Clindamicina.

Principio Activo	Clotrimazol	Clindamicina
Y_b	-106382,333	-65583,917
S_b	2544,406	-30931,090
Límite de detección	1,814 ppm	2,687 ppm
Límite de cuantificación	4,293 ppm	3,107 ppm

Fuente: esta investigación.

4.9 Exactitud

La exactitud permite determinar la proximidad entre el valor aceptado convencionalmente como verdadero o de referencia y el valor experimentalmente encontrado, para esta validación se comparó inyecciones de solución estándar preparadas a la concentración especificada en la sección 3.1.6 con respecto a soluciones del producto con concentraciones cercanas al 75%, 100%, 125%, se expresa la exactitud como porcentaje de recuperación usando la ecuación 3. se presentan los siguientes resultados.

Tabla 47. Resultados porcentaje de recuperación del método de muestreo de Clindamicina.

Nivel	Peso	Área	Promedio	% Recuperado
%	mg			
STD	5,0	309201,0	310085,3	NA
		310793,0		
		308318,0		
		312029,0		
75	3,8	234105,0	233788,0	100,0
		233471,0		
	3,8	226859,0	231841,5	99,2
		236824,0		
100	5,0	318833,0	318641,0	102,3
		318449,0		
	5,0	318078,0	316781,0	101,7
		315484,0		
125	6,3	390797,0	386625,5	99,3
		382454,0		
	6,3	381557,0	381819,5	98,0
		382082,0		

Fuente: esta investigación.

Tabla 48. Resultados porcentaje de recuperación del método de muestreo de Clotrimazol.

Nivel %	Peso mg	Área	Promedio	% Recuperado
STD	10,0	12280497,0	12358414,8	NA
		12440904,0		
		12398042,0		
		12314216,0		
75	7,6	9653012,0	9698548,0	102,5
		9744084,0		
	7,8	9990499,0	9919748,5	102,2
9848998,0				
100	9,9	12504896,0	12645911,0	102,9
		12786926,0		
	9,9	12667518,0	12703706,0	103,4
		12739894,0		
125	12,7	15813590,0	15685090,0	99,8
		15556590,0		
	12,8	15836366,0	15710867,5	99,1
		1558536,09		

Fuente: Esta investigación.

Tabla 49. Resultados globales Exactitud de Clotrimazol y Clindamicina.

Principio Activo	Promedio porcentaje de recobro	Porcentaje de Covarianza (% CV)	Intervalo de confianza para la media (%)
Clindamicina	100,085	1,605	98,399 a 101,771
Clotrimazol	101,668	1,747	99,804 a 103,532

Fuente: Esta investigación.

Criterios de aceptación:

%CV de recobro \leq 2%.

Intervalo de confianza para la media debe incluir el 100% o el promedio del porcentaje de recobro debe incluir en el rango 97%-103%.

En base a los resultados presentes en la tabla 49 se puede concluir que el porcentaje de covarianza menor a 2% indica un alto grado de concordancia en los resultados obtenidos y los promedios de los porcentajes de recobro de 100,08% y 101,67% respectivamente para Clotrimazol y Clindamicina permiten afirmar que el método es exacto en base a los estándares de referencia utilizados.

4.10 Robustez

Se prepararon muestras de producto, las cuales se analizaron bajo condiciones normales y realizando los siguientes cambios:

- Bajo condiciones normales
- Cambio de columna de Shodex C18 4E, 250mm a LiChrospher 100 RP 18 (5 μ m).
- Cambio de temperatura de temperatura ambiente a 45°C
- Cambio de proporciones de la fase móvil Acetonitrilo-Solución fosfato monobásico de potasio 70:30 a 60:40
- Cambio en el Flujo a 0,75 mL/min

Criterio de aceptación: la diferencia aritmética entre el porcentaje recuperado en condiciones normales y el porcentaje recuperado en el cambio no sea mayor a dos..

Tabla 50. Resultados porcentaje recuperado de Clindamicina a condiciones de robustez.

% Recuperado							
Muestra	Área std	Peso std	Norma l	columna	Temperatura	Fase Móvil	Flujo
1	285123	4,921	93,087	92,651	91,820	103,85 2	122,51 8
2	284938		93,800	92,061	92,894	100,76 0	122,21 7
3	283316		94,971	92,250	92,468	101,59 9	123,60 0
Promedio	284459	4,921	93,953	92,321	92,394	102,07 1	122,77 8
Desviación estándar	994,18 0	N/A	0,951	0,302	0,541	1,599	0,727
% CV	0,349	N/A	1,012	0,327	0,586	1,566	0,592
Diferencia Aritmética	N/A	N/A	N/A	1,632	1,559	8,118	28,825

N/A: No aplica

Fuente: Esta investigación

Tabla 51. Resultados porcentaje recuperado de Clotrimazol a condiciones de robustez

% Recuperado							
Muestra	Área std	Peso std	Normal	columna	Temperatura	Fase Móvil	Flujo
1	12517482	9,990	98,874	115,768	96,809	105,560	129,378
2	12497257		99,932	115,022	96,238	104,722	128,468
3	12452715		99,368	115,168	95,345	105,747	128,715
Promedio	12489151	9,990	99,391	115,319	96,131	105,343	128,854
Desviación estándar	33135,592	N/A	0,530	0,395	0,738	0,546	0,471
% CV	0,265	N/A	0,533	0,343	0,767	0,518	0,365
Diferencia Aritmética	N/A	N/A	N/A	15,928	3,260	5,952	29,463

N/A: No aplica

Fuente: Esta investigación.

El estudio de robustez permite concluir que este método es robusto para cambios de columna y temperatura para identificación y cuantificación de Clindamicina y no es robusto para ningún cambio realizado para la identificación y cuantificación de Clotrimazol bajo el criterio de aceptación propuesto. Sin embargo, al observar los coeficientes de variación obtenidos para cada cambio se observa que son menores a 2% lo cual indica que los resultados son cercanos o similares para cada cambio realizado.

4.11 INCERTIDUMBRE

Finalmente se determinó algunas incertidumbres de tipo A. Para la estimación de la incertidumbre, la guía para la expresión de la incertidumbre (GUM) recomienda:

- Definir el mensurando, el mensurando es la magnitud que se desea medir

- Definir y organizar las magnitudes de influencia
- Cuantificar las magnitudes de influencia y su dispersión
- Obtener la mejor estimación del mensurando
- Determinación de la incertidumbre estándar combinada, consiste en combinar las contribuciones a la incertidumbre del mensurando
- Determinar el valor que abarca el nivel del mensurando a cierto nivel de confianza por medio del cálculo de la incertidumbre expandida

4.11.1 Determinación de incertidumbre de tipo A

Las incertidumbres de tipo A son todas aquellas que su fuente de variación es producto de los valores obtenidos mediante el proceso de medición, para el caso de la validación realizada calcularemos las siguientes incertidumbres:

- Idoneidad del sistema
- Valoración de producto
- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Exactitud

4.11.1.1 Incertidumbre asociada a la idoneidad del sistema

En primera instancia debemos definir el mensurando, para las mediciones de idoneidad del sistema el mensurando es el área obtenida en las inyecciones, se debe calcular la incertidumbre típica, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ECUACIÓN 13} \quad u_t = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde S corresponde a la desviación estándar y n al número de mediciones, u_t es la incertidumbre típica, una vez calculada la incertidumbre típica se puede calcular la incertidumbre expandida con un factor de cobertura de 2 (el factor

de cobertura de 2 nos da un nivel de confianza del 95%) mediante la siguiente formula.

$$\text{ECUACIÓN 14 } U = \upsilon * K$$

Donde U corresponde a la incertidumbre expandida y K corresponde al factor de cobertura

Teniendo en cuenta los valores de la tabla 12 y 13 y aplicando la formula anterior tenemos los siguientes resultados

Tabla 52. Resultados incertidumbre idoneidad del sistema.

Principio activo	n	Mensurando (Área promedio)	Desviación estándar de Área	Incertidumbre típica	Incertidumbre Expandida con un factor K=2	Resultado con incertidumbre a un nivel de confianza del 95%
Clindamicina	6	295247	4924,23	2010,30	4020,60	295247± 4020,60
Clotrimazol	6	12314323	83586,71	34124,13	68248,26	12314323±68248,26

Fuente: Esta investigación.

4.11.1.2 Incertidumbre asociada a la repetibilidad

Para la repetibilidad definimos como mensurando el porcentaje de recuperación obtenido en la serie de inyecciones de producto (Ver tabla 35 y 36) y en base a las ecuaciones presentadas en la sección 4.11.1.1 calculamos la incertidumbre típica, y la incertidumbre expandida.

Tabla 53. Resultados incertidumbre Repetibilidad.

Principio activo	n	Mensurando (% Recuperación)	Desviación estándar	Incertidumbre típica	Incertidumbre Expandida con un factor K=2	Resultado con incertidumbre a un nivel de confianza del 95%
Clindamicina	6	98,65%	0,008	$3,26 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$	$98,65 \pm 6,5 \times 10^{-3}$
Clotrimazol	6	99,37%	0,007	$2,85 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-3}$	$99,37 \pm 5,7 \times 10^{-3}$

Fuente: Esta investigación.

4.11.1.3 Incertidumbre asociada a la precisión intermedia

Para la precisión intermedia definimos como mensurando el porcentaje de recuperación obtenido en la serie de inyecciones de producto (Ver tabla 37, 38, y 39), se sabe con base al estudio de la precisión intermedia que los factores de variación analista y día de análisis no tienen una influencia significativa en el resultado por lo cual el cálculo de incertidumbre se hará de manera conjunta para todos los porcentajes de recuperación obtenidos en los dos días de análisis en base a las ecuaciones presentadas en la sección 4.11.1.1 calculamos la incertidumbre típica, y la incertidumbre expandida.

Tabla 54. Incertidumbre precisión intermedia.

Principio activo	n	Mensurando (% Recuperación)	Desviación estándar	Incertidumbre típica	Incertidumbre Expandida con un factor K=2	Resultado con incertidumbre a un nivel de confianza del 95%
Clindamicina	12	100,08	0,82	0,24	0,47	$100,08 \pm 0,47$

Continuación tabla 54.

Clotrimazol	1	101,67	0,60	0,17	0,34	101,67±0,34
	2					

Fuente: Esta investigación.

4.11.1.4 Incertidumbre asociada a la valoración del producto.

Para la incertidumbre asociada a la valoración de producto definimos como mensurando el porcentaje de activo obtenido en la serie de inyecciones de producto y en base a las ecuaciones presentadas en la sección 4.11.1.1 calculamos la incertidumbre típica, y la incertidumbre expandida.

Tabla 55. Resultados incertidumbre Repetibilidad.

Principio activo	n	Mensurando (% activo)	Desviación estándar	Incertidumbre típica	Incertidumbre Expandida con un factor K=2	Resultado con incertidumbre a un nivel de confianza del 95%
Clindamicina	6	99,37	0,004	$1,63 \times 10^{-3}$	$3,26 \times 10^{-3}$	$99,37 \pm 3,26 \times 10^{-3}$
Clotrimazol	6	100,09	0,006	$2,45 \times 10^{-3}$	$4,90 \times 10^{-3}$	$100,09 \pm 4,90 \times 10^{-3}$

Fuente: Esta investigación.

4.11.1.5 Incertidumbre asociada a la exactitud.

Para la incertidumbre asociada a la exactitud definimos como mensurando el porcentaje de activo obtenido en la serie de inyecciones de producto obtenidos en el estudio de este parámetro de validación (Ver tabla 49) y en base a las ecuaciones presentadas en la sección 4.11.1.1 calculamos la incertidumbre típica, y la incertidumbre expandida.

Tabla 56. Resultados incertidumbre exactitud.

Principio activo	n	Mensurando (% activo)	Desviación estándar	Incertidumbre típica	Incertidumbre Expandida con un factor K=2	Resultado con incertidumbre a un nivel de confianza del 95%
Clindamicina	6	100,08	1,61	0,66	1,32	100,08± 1,31
Clotrimazol	6	101,67	1,78	0,73	1,46	101,67±1,45

Fuente: Esta investigación.

CONCLUSIONES

- La evaluación la idoneidad del sistema cromatográfico demuestra que el sistema es adecuado para utilización del método propuesto debido a que cumple con todos los criterios de aceptación propuestos (Ver tabla 2).
- Se logró identificar los picos de los activos Clotrimazol y Clindamicina debido a que se presentó tiempos de retención similares tanto en el estándar mixto como en la solución producto.
- Los cromatogramas obtenidos en la selectividad permite concluir que no se presenta picos que puedan interferir con la identificación y la cuantificación de los activos Clotrimazol y Clindamicina, por lo cual este método permite la identificación inequívoca de los analitos estudiados, En cuanto a la degradación del producto se concluye mediante la información de las tablas 17 y 18 que el producto sufre una degradación leve para exposición de luz UV; degradación moderada en condiciones de hidrolisis básica y acida; y degradación severa cuando se trata con agentes oxidantes.
- El estudio de linealidad permitió establecer que el método es lineal dentro del rango de de 0,2 mg/mL de Clotrimazol a 0,6 mg/mL, y de Clindamicina de 0,1 mg/mL a 0,3 mg/mL.
- Los resultados del parámetro precisión permite concluir que el método es repetible y reproducible para cuantificar Clotrimazol y Clindamicina.

- Los resultados del parámetro exactitud permite concluir que el método es exacto debido a que se encontró %CV de recobro $\leq 2\%$ y el intervalo de confianza para la media incluye el 100%.
- Se encontró los límites de detección y cuantificación para Clindamicina de 3,107 ppm y 2,687 ppm, mientras que para el clotrimazol los límites de detección y cuantificación encontrados son 1,814 ppm y 4,293 ppm respectivamente.
- El estudio de robustez permite concluir que este método es robusto para cambios de columna y temperatura para identificación y cuantificación de Clindamicina y no es robusto para ningún cambio realizado para la identificación y cuantificación de Clotrimazol.
- Se logró desarrollar un método analítico validado para la identificación y cuantificación de Clotrimazol y Clindamicina en capsula blanda sin una referencia literaria existente para la cuantificación de estos principios activos de forma rápida, sencilla, a bajo costo y adaptable a las condiciones de trabajo de la empresa Quality Farma Análisis S.A.S y demostrando que está basado en principios científicos.

RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos a lo largo de la validación se recomienda seguir la metodología planteada sin realizar ninguna modificación debido a que en el estudio del parámetro de robustez se demostró que ninguno de los cambios estudiados satisfacen el criterio de aceptación de la validación.
- Para los análisis de rutina se recomienda usar concentraciones bajas dentro del rango estudiado en la linealidad del método, con el objetivo de reducir costos de producto y de sustancias de referencia.
- Con base a estos resultados de degradación se recomienda la no exposición de las muestras a condiciones oxidativas ni su cercanía a sustancias oxidantes.
- La validación de la técnica deberá ser revisada si se cambia el sistema cromatográfico fuera del rango evaluado y si se hacen cambios en la composición cualicuantitativa del producto

REFERENCIAS

AGARWAL, D. JAIN, D. TRIVEDI, P. Simultaneous spectrophotometric estimation of tinidazole and clotrimazole in tablet formulations, 1998, En: Journal of Indian Drugs p. 499.

ARTEAGA AGUIRRE, Leticia. et al. Validación de métodos analíticos. Ed, Asociación Española de farmacéuticos de la industria, 2001. 11p.

DEL MONTE, J. Desarrollo y Validación de Metodologías para Minimizar la Incertidumbre de los Calibradores en Determinaciones por HPLC en Muestras Biológicas. Tesis de Maestría. En: Universidad Tecnológica Nacional. Buenos Aires (2012).

Drugs.com.[en línea]. <https://www.drugs.com/pro/clotrimazole.html>. [citado 16 de agosto del 2017].

FIEGER-BUSCHGES, H. et al. Determination of clindamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography using coupled columns. 1999, En: Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. vol. 21, p. 281–286.

FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances and excipients. Vol. 11. New York: Academic Press, 2000. p 266.

Fungal Guide .ca. Vancouver , B.C. Canada (sitio de internet) disponible en <http://www.fungalguide.ca/treatments/clotrimazole.html>. [citado 16 de agosto del 2017].

HERNANDEZ, G. MORENO, A. ZARAGOZA, F. PORRAS, A. Tratado De Medicina Farmaceutica. Editorial medica panamericana S.A, 2010. 104p.

HERNÁNDEZ BALLESTEROS, Bertha Angélica. Validación de Método Analítico por HPLC Para Disolución de Levonorgestrel 1,5 mg Grageas. En: Universidad de Veracruzana. Tesis. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. México.(2014)

HORNEDO, A., et al. High-performance liquid chromatography of clindamycin and clindamycin phosphate with electrochemical detection, 1990. En: Journal of Chromatography. vol. 21, p. 217–225.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedure, 2005. 2p.

MAHMOOD, S. et al. Method Development and Validation for the Estimation and Evaluation of Clotrimazole (an-Antifungal Drug) in Tablet Preparation by UV-VIS Spectroscopy. En: International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2015, vol. 32, no. 2, p. 55-58.

MENDOZA, N. Farmacología médica, Ed medica panamericana, p 6

MIFSUD, M, et al . (2014). A simple HPLC-UV method for the determination of clindamycin in human plasma. En: Journal of Chemistry Pharmacy, 2014, vol. 6, no. 1, p. 696-704.

MILLER, N. y MILLER, C. Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica, Ed Pearson Educación S. A, 2002. 101p.

PLATZER, D. WHITE, B. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, p. 84–88.

QUALITY FARMA ANÁLISIS S.A.S. VE-P-008 plan de validación de métodos analíticos, 2016. p. 1-15.

QUATTROCCHI, O. ALBERAILA, S. LABA, R. INTRODUCCION A LA HPLC, 1992. p 316-317.

SEETHALAKSHMI, N. et al. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of metronidazole, clindamycin phosphate and clotrimazole in combined pharmaceutical dosage forms, 2015. En: Journal of Pharmacy and Applied Sciences. Vol. 4, No 2, p. 67-774.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). the united states pharmacopeia, 2016. 1583p.

Universidad Autónoma de Puebla. [en línea].
http://www.geocities.ws/tecno_farma/capsulas.htm. [citado 16 de agosto del 2017].

VAIDYA, VV. et al. Simultaneous HPTLC determination of clotrimazole and tinidazole in a pharmaceutical formulation, 2007. En: Journal of Planar Chromatography Modern TLC. Vol. 21, p. 145-147.

VLADIMIROV, S. et al. (1997). High performance liquid chromatographic determination of clindamycin in pharmaceutical formulations. 1997, En: Journal of the Serbian Chemical Society. vol. 21, p. 177–181