



INDICE

Contenido	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
III. OBJETIVOS	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.	66
VI. CONCLUSION	103 104
VII. RECOMENDACIONES	
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	105
IX. A N E X O S	



AGRADECIMIENTO.

A mi Dios por ser el mi luz, mi ayudador, mi pronto auxilio en las dificultades, por darme la vida, el entendimiento, la salud, todas las fuerzas necesarias para alcanzar todas mis metas.

A mis Padres por ser ellos mi apoyo moral, mi apoyo económico, sin su ayuda no sería posible el logro de todas mis metas.

A mi Tutor y a todos mis Maestros empezando por los que me dieron clases en la educación primaria hasta los que han sido en la universidad, sin su enseñanza y su paciencia no sería posible la realización de este acto.

A todas aquellas personas que de una u otra manera han servido de motivación para nuestras personas.



DEDICATORIA.

Dedico este trabajo y mi carrera a Dios nuestro señor por ser mi guía en todo momento y no soltarme nunca de su mano y darme la fortaleza necesaria para lograr vencer los obstáculos de mi vida dejándome llegar al final con mucho éxito en mi carrera y que con su ayuda me ilumine para ahora ser una mejor persona y un buen profesional.

A toda mi familia por apoyarme siempre en el transcurso de toda mi carrera.

A cada uno de mis compañeros que en todo tiempo me dieron su apoyo, su amistad y el impulso para seguir adelante.

Ricardo Javier Zapata Zeledón.



DEDICATORIA.

Dedico este trabajo monográfico a:

Dios todo poderoso nuestro padre celestial que me dio fortaleza para seguir adelante y que vela por nuestro bien, dado que su amor es inmenso e infinito hacia cada uno de nosotros.

A mis padres y tutor que me brindaron ayuda con la intención de entregar un trabajo de calidad con mención especial:

PADRES:

Tomasita Solís Torres y Ronaldo José Zamora Sánchez, apoyo y fuerza en todo tiempo.

TUTOR:

Msc. Azucena Montenegro Reyes, por habernos brindado orientación, apoyo, conocimiento, tiempo y voluntad.

Y por último a todos aquellos quienes nos facilitaron fuente de información relacionada con nuestro trabajo monográfico a todos MUCHAS GRACIAS.....

Ronaldo José Zamora Solís.



I. INTRODUCCIÓN

Para la industria farmacéutica una de las características más importantes de toda empresa es la calidad de sus productos, ya que de ésta dependerán tanto el prestigio como el desarrollo económico y el crecimiento de la misma. Atendiendo a esta necesidad se han venido formulando diferentes programas y parámetros para lograr el aseguramiento de la calidad de los distintos productos. Así pues, una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos es la validación de los métodos analíticos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación bien documentada.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado. Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en la United States Pharmacopoeia (USP 34 NF29), son exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

Fisiológicamente los corticoides tienen por misión fundamental la de mantener los mecanismos necesarios que permitan al organismo resistir frente a situaciones de estrés y de cambio. Uno de los efectos más importantes de los glucocorticoides (GC), posiblemente el más valioso en cuanto a su aplicación terapéutica, es su capacidad de modular la respuesta inflamatoria, independientemente del estímulo desencadenante, y la inmunología, tanto humoral como celular.

Con el presente estudio se validó la metodología analítica desarrollada para la identificación y cuantificación de Betametasona Dipropionato al 0.05% en crema por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con el propósito que cumpla con las características idóneas para ser utilizado como método de análisis rutinario en el laboratorio de control de calidad de Laboratorios RAMOS S.A. ⁽¹⁾



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La metodología analítica para identificar y cuantificar Betametasona Dipropionato al 0.05% en la forma farmacéutica de crema por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución cumple con las especificaciones descritas en métodos de referencia validados?



III. OBJETIVOS

1. General.

Validar la metodología analítica propuesta para la identificación y cuantificación de Betametasona Dipropionato 0.05% crema por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución

2. Específicos.

2.1 Desarrollar la técnica analítica para identificar inequívocamente la Betametasona dipropionato en la forma farmacéutica de crema por HPLC.

2.2 Realizar los lineamientos a seguir en la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Betametasona Dipropionato en la forma farmacéutica de crema por HPLC.

2.3 Demostrar mediante los criterios de validación que la metodología analítica por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Betametasona en la forma farmacéutica de crema es exacta, precisa, selecta, lineal y robusta siempre que se trabaje bajo las mismas condiciones propuestas en este trabajo monográfico.

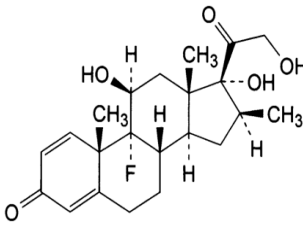
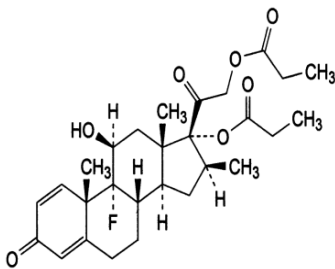
2.4 Comprobar que el método analítico para la identificación y cuantificación de Betametasona 0.05%, crema permite obtener de forma reproducible resultados que cumplan con las especificaciones establecidas utilizando muestras de referencias de otros laboratorios.



IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Propiedades Físicoquímicas y Especificaciones de la Betametasona Dipropionato Materia Prima.

En la siguiente tabla se resumen las especificaciones de la materia prima de Betametasona Dipropionato según referencias farmacopeicas.

Características Comerciales e Identidad de la Materia Prima		
Propiedades	Valor	Referencias
Estructura Betametasona Base química		<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Estructura Betametasona Base empírica	$C_{22}H_{29}FO_5$	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Estructura Betametasona Dipropionato Química		<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Estructura empírica	$C_{28}H_{37}FO_7$	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed.



Facultad de Ciencias Químicas

Betametasona Dipropionato		<ul style="list-style-type: none"> ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Peso molecular Betametasona Base	392.5 g/mol.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Peso Molecular Betametasona Dipropionato	504.6 g/mol.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Nombre Químico Betametasona Base	Pregna-1,4-diene-3,20 dione, 9-fluoro-11,17,21 trihydroxy-16-methyl-, (11b,16b)-.9 Fluoro-11b,17,21-trihidroxi-16b-metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS.
Sinónimos Betametasona Base	Flubenisolonom; 9 α Fluoro 16 β -methylprednisolone; NSC-39470; Sch-4831.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ CLARKS.
Numero de Cash Betametasona Base	378-44-90	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS
Nombre Químico Betametasona Dipropionato.	Pregna-1,4-diene-3,20 dione, 9-fluoro-11-hydroxy-6-methyl-17,21- bis(1 oxopropoxy)-, (11b,16b).	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ FJ 15 Ed. ✓ RFE 2002. ✓ FEUM. ✓ CLARKS
Sinónimos Betametasona Dipropionato	Diprosone	CLARKS
Numero de Cash Betametasona Dipropionato	5593-20-4	<ul style="list-style-type: none"> ✓ USP34NF29. ✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ CLARKS



Características Organolépticas y Solubilidad de Betametasona Dipropionato		
Aspecto	Polvo cristalino.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002.
Color	Blanco o casi blanco.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.
Sabor	Característico.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29. ✓ FEUM.
Solubilidad	Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en acetona y en cloruro de metileno, bastante soluble en etanol y metanol.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29. ✓ CLARKS.
Características Físicoquímicas Betametasona Dipropionato		
Ensayos de Identificación	Espectrofotometría UV-VIS e IR, TLC, HPLC y reacciones cromáticas.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.
Rotación óptica	Entre +60 y +70.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.
Impurezas	≤ 1.25%.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.
Perdida por secado	≤ 1%.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29. ✓ CLARKS.
Residuo de incineración	≤ 0.5%	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29
Pureza	97 y 103 % con respecto a la sustancia desecada.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.
Conservación	Protegido de la luz y a temperatura de 25 °C con variaciones permitidas de ± 5°C.	✓ FB 2010. ✓ RFE 2002. ✓ USP34NF29.

4.2 Especificaciones Físicoquímicas y Métodos de Análisis Según Referencias Farmacopeicas.



Facultad de Ciencias Químicas

Antes de empezar con el trabajo analítico para desarrollar y validar la metodología analítica para identificar y cuantificar el analito de interés, se deben de verificar pruebas de desempeño del producto (características organolépticas, variación de peso, uniformidad de unidades de dosificación, descripción del producto y pH), con el fin de cumplir exigencias farmacopeicas y calidad del producto.

Así mismo el control de estos parámetros proporcionara información valiosa al momento de desarrollar y validar la metodología analítica por HPLC.

En la siguiente tabla se muestran las especificaciones farmacopeicas que debe de cumplir la Betametasona 0.05% Crema. ^(2, 3,4)

Parámetro Evaluado		Especificaciones	Referencias
Características Organolépticas y Físicas			
Aspecto		Homogéneo libre de partículas extrañas	USP34NF29, FB 2010.
Color		Blanco o ligeramente crema	USP34NF29, FB 2010.
Sabor		Característico	USP34NF29, FB 2010.
Variación de Peso	Peso Promedio	20 g ± 5%	USP34NF29, FB 2010.
	%RSD	≤ 6%	USP34NF29, FB 2010.
Características Químicas			
Uniformidad de Unidades de Dosificación		$L_1 \leq 15\%$.	USP34NF29, FB 2010.
pH		4.0-6.5	USP34NF29, FB 2010.
Identificación (HPLC)		El tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la preparación de la solución muestra se debe de corresponder con el tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la solución estándar.	Método Validado Interno.
Pureza (Valoración Betametasona Base).		90% - 110%	Método Validado Interno.
Características de Almacenamiento			
Envasado		Conservar en tubos depresibles o en envases impermeables.	USP34NF29, FB 2010.
Almacenamiento		Conservar a 25 °C con variaciones permitidas de ± 5°C; proteger de la congelación.	USP34NF29, FB 2010.



En la siguiente tabla se muestran los diferentes métodos analíticos primarios existentes para la Identificación y Cuantificación de Betametasona Dipropionato en la especialidad farmacéutica de crema.

Referencia Bibliográfica	Método Para la Cuantificación	Método para la Identificación
USP34NF29	HPLC (Fase Inversa).	TLC
BP 2010	HPLC (Fase Inversa).	IR, HPLC, TLC, Reacciones Cromáticas
FEUM	HPLC (Fase Inversa).	TLC
FJ	HPLC (Fase Inversa).	HPLC
RFE	HPLC (Fase Inversa).	IR, HPLC, TLC, Reacciones Cromáticas
FI	HPLC (Fase Inversa).	HPLC
FE	HPLC (Fase Inversa).	HPLC

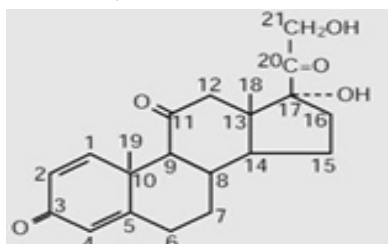
Propiedades fármaco terapéuticas de la Betametasona de Interés.

4.3 Propiedades químicas de interés terapéutico de los glucocorticoides.

Las glándulas suprarrenales son órganos endocrinos multifuncionales que segregan diversos esteroides, que pueden dividirse en corticosteroides, basados en el núcleo de 21 átomos de carbono y en corticoides sexuales, principalmente andrógenos, basados en el núcleo de 19 átomos de carbono. Los corticoides se dividen tradicionalmente en aquellos con acciones glucocorticoidea, de los cuales el cortisol (Hidrocortisona), es el ejemplo endógeno más importante, y aquellos que son primariamente mineralocorticoide de los cuales la aldosterona es la más importante.

La Betametasona es un análogo de la metilprednisolona, con un elevado grado de actividad corticosteroide y mínimo efecto mineralocorticoide.

A partir del esteroide natural cortisol se han obtenido numerosos derivados sintéticos que mantienen algunas de sus propiedades y mejoran otras tal es el caso de la Betametasona. Son estructuras fundamentales para mantener o incrementar las propiedades más características (ver estructura que se muestra a continuación):





- 4.3.1 En el anillo A el grupo cetónico en C3, el doble enlace entre C4 y C5 y el doble enlace entre C1 y C2.
- 4.3.2 En el anillo B, la metilación en C6 y la fluoración en C9 (ver estructura química de la Betametasona).
- 4.3.3 En el anillo C, la función oxígeno en C11 C9 (ver estructura química de la Betametasona).
- 4.3.4 En el anillo D, la hidroxilación en C17 y C21; la hidroxilación o la metilación en C16 reduce la actividad mineralocorticoide C9 (ver estructura química de la Betametasona).
- 4.3.5 El número de derivados es muy amplio, así como las vías de administración por las que se pueden utilizar. Con frecuencia se obtienen ésteres distintos de un mismo producto para emplearlo por vías diferentes, pero con algunos que se usan por vía tópica se consigue mantener su actividad antiinflamatoria y reducir su capacidad de difusión con el fin de circunscribir su acción localmente y restringir la acción sistémica.

4.4 Acciones Fisiológicas y Efecto Farmacológico de la Betametasona.

En ausencia completa de hormonas corticales se produce una depleción del glucógeno hepático y muscular, disminuye la glucemia, se reduce la cantidad de nitrógeno no proteico en la orina, aumenta la eliminación de sodio en orina, disminuyen el volumen plasmático, la contractilidad cardíaca y el gasto cardíaco, desciende la presión arterial, disminuye la concentración de sodio en plasma y aumenta la de potasio y se pierde la capacidad de concentrar o de diluir la orina.

La administración de corticosteroides (Betametasona por medio de la vía oral y parenteral), restablece estas funciones y, si se administran dosis excesivas, se aprecian expansión del volumen plasmático, retención de sodio y pérdida de potasio, aumento de la presión arterial, incremento del glucógeno en hígado y músculo, aumento de la glucemia, reducción de la masa conjuntiva y muscular, y aumento de nitrógeno no proteico en orina; en determinadas circunstancias, además, inhiben la respuesta inflamatoria y ciertas manifestaciones de la respuesta inmunitaria (principalmente por vía tópica).

Este conjunto de acciones suele clasificarse en dos tipos: las glucocorticoides, representadas por la capacidad de almacenar glucógeno hepático y por la actividad antiinflamatoria, y las mineralocorticoides, representadas por la capacidad de retener sodio y agua.

4.5 Técnicas de Separación Analíticas.

Casi todas las muestras que se le presentan al analista farmacéutico son mezclas, algunas veces muy complejas. El análisis de estos mismos componentes en presencia de los restantes, puede sin embargo, ser difícil e incluso imposible, a causa de una interferencia de una



sustancia en la determinación de otra. Las interferencias adoptan varias formas. La sustancia interferente puede responder cuantitativamente al método analítico para el componente deseado. Algunas veces la interferencia es una respuesta parcial, no cuantitativa, a la determinación. Otra forma comúnmente encontrada de interferencia es la inadecuación del método analítico para el componente deseado, originando resultados no cuantitativos incluso para este componente.

Cuando no se pueda aplicar directamente un método analítico a una mezcla, debido a posibles interferencias, tal vez sea necesaria una separación de la mezcla en sus componentes. ^(1,5)

4.6 Métodos para eliminar interferencias en un análisis químico:

Método		Bases del método
Enmascaramiento		Inmovilización del interferente como un complejo no reactivo
Separación mecánica de fase	Precipitación y filtración	Diferencia de solubilidad de los compuestos formados.
	Destilación	Diferencia en la volatilidad de los compuestos.
	Extracción	Diferencias en solubilidad de dos líquidos inmiscibles.
	Intercambio iónico	Diferencia de la estabilidad de los reactivos con una resina de intercambio iónico.
Cromatografía		Diferencia de la velocidad de un movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria.
Electroforesis		Diferencia de la velocidad de migración en un gradiente de campo eléctrico.

En el siguiente trabajo monográfico se hace especial énfasis a la cromatografía, debido a que es la técnica por la cual se identifica y cuantifica nuestro analito en estudio. ^(8, 9,11)

4.7 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC o CLAR).

4.7.1 Fundamentos.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o en sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es la técnica más versátil y utilizada de todos los tipos de cromatografía por elución. La fase móvil es un disolvente líquido que contiene



la muestra como una mezcla de solutos y la fase estacionaria es sólida; esta técnica es independiente de la volatilidad y estabilidad de los compuestos a ser separados.

Las razones de popularidad de esta técnica analítica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria farmacéutica.

Dichas sustancias pueden ser muestras biológicas como las proteínas, oligosacáridos, triglicéridos; así como también fármacos difíciles de analizar tanto cuantitativa como cualitativamente.

La técnica se completa con una serie de detectores cuya aplicabilidad se centra en distintas familias de compuestos (detector diferencial de índice de refracción y detector de fluorescencia), además se incorporan detectores de carácter universal, como son el UV-VIS de fila de fotodiodos y el de más reciente desarrollo detector de espectrometría de masas. El proceso de separación en esta técnica depende de las interacciones que se establecen entre el analito y la fase estacionaria y móvil respectivamente; estableciéndose diversos equilibrios químicos tales como analito-fase estacionaria, analito-fase móvil y fase móvil-fase estacionaria. ^(12, 13,25)

4.7.2 Clasificación de la técnica de HPLC.

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, existen varios tipos de HPLC, entre estos tenemos:

- Cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido.
- De adsorción o cromatografía líquido-sólido.
- De intercambio iónico o cromatografía iónica.
- Cromatografía en fase normal.
- Cromatografía de exclusión molecular.
- Cromatografía en fase reversa.
- Cromatografía de reparto.

4.8 La Cromatografía De Reparto.

4.8.1 Fundamentos.

Debido a que en este trabajo monográfico se utiliza esta modalidad cromatográfica se hará énfasis solo en esta clasificación del HPLC.

El tipo de HPLC más utilizado es la cromatografía de reparto, en la que la fase estacionaria es un segundo líquido inmiscible con la fase móvil líquida. La cromatografía de reparto puede dividirse en variantes líquido-líquido y de líquido-fase enlazada. La diferencia entre



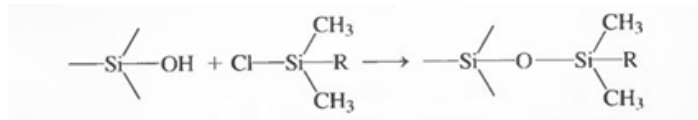
estas dos modalidades radica en la forma de mantener la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del empaquetamiento.

En la cromatografía líquido-líquido, el líquido se mantiene por adsorción física, mientras que en la de fase enlazada se enlaza químicamente. En sus inicios, la cromatografía de reparto solo era del tipo líquido-líquido, pero ahora predomina la de fase enlazada dada su mayor estabilidad.

4.8.2 Empaquetamiento de fases enlazadas.

Muchos empaquetamientos de fase enlazada se preparan por reacción de un órgano clorosilano con los grupos –OH formados en la superficie de partículas de sílice por hidrólisis con ácido clorhídrico diluido caliente. El producto es un organosiloxano.

La reacción de uno de estos sitios SiOH en la superficie de una partícula puede representarse como sigue:



Donde R es frecuentemente un grupo octilo u octaldecilo de cadena recta. Otros grupos funcionales orgánicos que se han enlazado en superficies de sílice son las aminas alifáticas, éteres y nitrilos, así como también hidrocarburos aromáticos. Así pues están disponibles muchas polaridades distintas para la fase estacionaria enlazada.

Los empaquetamientos de fases enlazadas tienen la ventaja de una estabilidad mucho mayor que las fases estacionarias que se mantienen inmóviles físicamente. En estas últimas, se precisa del recubrimiento periódico de las superficies sólidas, ya que la fase estacionaria se disuelve gradualmente en la fase móvil. Además, la elución en gradiente no resulta práctica con empaquetamientos líquido-líquido, de nuevo a causa de las partículas por solubilidad en la fase móvil. La desventaja principal de los empaquetamientos de fase enlazada es su capacidad de muestra un tanto limitada.

4.8.3 Selección de las fases móviles y estacionarias.

El éxito de la cromatografía de reparto requiere el equilibrio apropiado entre las fuerzas intermoleculares de los tres participantes en el proceso de separación (analito, fase móvil y fase estacionaria).



Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en base a la polaridad relativa de cada uno de los tres componentes. En general, la polaridad de los grupos funcionales orgánicos comunes en orden creciente es:

Hidrocarburos < Olefinas < haluros < sulfuros < éteres < compuestos nitro < ésteres ~ Aldehído ~ Cetonas < Alcoholes ~ Aminas < Sulfonas < sulfóxidos < Amidas < Ácidos

Como norma muchas separaciones cromatográficas se realizan haciendo coincidir la polaridad del analito con la de la fase estacionaria, para luego emplear una fase móvil de polaridad muy distinta.

En general, el procedimiento tiene más éxito que cuando se hace coincidir la polaridad del analito con la de la fase móvil y ambas son distintas de la que corresponde a la fase estacionaria. En este caso, es frecuente que la fase estacionaria no puede competir exitosamente por los componentes de la muestra, por lo que los tiempos de retención se hacen demasiado breves para aplicaciones prácticas. En el otro extremo está la situación en que las polaridades del analito y la fase estacionaria son muy similares, en cuyo caso los tiempos de retención se hacen excesivamente prolongados.

4.9 Desarrollo de métodos analíticos frente a los Métodos oficiales y/o de Farmacopeas.

Se puede diferenciar entre desarrollo de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas.

4.9.1 Principios activos de síntesis.

Los métodos oficiales o de Farmacopea se considerarán validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquéllos para los que fuera redactada la monografía.

4.9.2 Especialidades.

No es recomendable considerar ningún método oficial o de Farmacopea totalmente validado para una especialidad, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción.

No obstante pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades tipo, como pueden ser los de la Farmacopea Europea (EP), Farmacopea Americana (USP) o Farmacopea Británica (BP), que permitirán obviar una gran parte del desarrollo analítico.



No existe una guía oficial que indique la óptima secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

4.9.3 Métodos de farmacopea.

Algunas farmacopeas como la USP o la BP, publican monografías para el análisis de especialidades farmacéuticas. Estas pueden tener composiciones diferentes, a escala cualitativa (excipientes) y/o cuantitativo. Es evidente que para estos productos de matrices variables, la monografía puede tomarse como un punto de partida, con el consiguiente ahorro de costos en el desarrollo del método.

En los métodos cromatográficos hay un gran número de variables que entran en juego, por ejemplo, no todos los instrumentos tienen el mismo volumen muerto o longitud de celda del detector.

Puede haber diferencia entre el mismo tipo de fase estacionaria adquirida diferentes fabricantes de columnas. Es frecuente por lo tanto, que siguiendo el método descrito por la farmacopea no sea posible cumplir el ensayo de idoneidad del sistema. Para solucionar estos problemas la farmacopea europea permite a partir del primero de enero de 2001, realizar ajustes en los parámetros Cromatográficos, hasta unos valores máximas fijados sin necesidad de revalidar el método.

4.10 Clasificación de métodos analíticos

Según la normalización y estado de desarrollo del método:

4.10.1 Métodos estándar o normalizados.

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma.

Estos métodos incluyen aquellos publicados por:

- United States Pharmacopeia (USP).
- National Formulary (NF).
- Homeopathic Pharmacopeia of the United States.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- International conference of harmonization (ICH).



- Pharmacopeia Britannica (BP).
- Farmacopea internacional (FI)

Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales es usado. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para asegurar una aplicación consistente.

4.10.2 Métodos desarrollados por el laboratorio.

En ocasiones cada laboratorio elabora sus propios métodos, esto puede deberse a que el análisis es muy específico y se evalúa, por ejemplo, cierta matriz especial que solo interesa al laboratorio; o que debido a restricciones de tipo comercial no se puede disponer de métodos análogos usados en otras empresas o compañías. El laboratorio, por consiguiente, debe evaluar la capacidad de los analistas, equipos y otros recursos relacionados con el método en cuestión. Los métodos deben estar debidamente validados, documentados y autorizados para su uso.

Para la evaluación de la capacidad del método se sugiere realizar comparaciones con otros métodos normalizados. En lo posible se debe usar materiales de referencia, estándares o muestras fortificadas.

4.10.3 Métodos no normalizados.

Los métodos no normalizados son aquellos que no han sido publicados por fuentes autorizadas y/o validadas. Es muy probable que los métodos sin normalización no dispongan de datos de validación o estudios colaborativos fiables o suficientes, por esto se recomienda realizar una validación cuanto sea posible. Si el método sufre cambios se requerirá una re-validación del método. ^(24,23)

4.11 Según categoría de método.

Los métodos también pueden clasificarse según el ámbito en el cual es usado, estos pueden agruparse en cuatro categorías generales:

4.11.1 Categoría I:



Para la cuantificación de materia prima o principio activo en producto terminado.

4.11.2 Categoría II:

Para determinar impurezas en materia prima o compuestos de degradación en producto terminado; o para análisis de residuos en material biológico o alimentos.

4.11.3 Categoría III:

Para determinar las características de funcionamiento como disolución o liberación de droga en el organismo.

4.11.4 Categoría IV:

Pruebas de identificación:

La validación de metodologías analíticas se fundamenta en la determinación de estos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Según la USP 34 NF 29 las metodologías se clasifican en cuatro categorías para su validación y ésta nos indicará qué parámetros deberán evaluarse, en la siguiente tabla se representa lo antes dicho:

Parámetros de desempeño requeridos para la validación de los métodos analíticos

Parámetro de desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativa	Cualitativa		
Selectividad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud	SI	SI	NO	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO

*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba

4.12 Características del desempeño del método cuando se está desarrollando.



Han de evaluarse los parámetros del método analítico cuando este se desarrolla: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad etc.

4.13 Puesta a punto. Características de idoneidad.

La puesta a punto del método analítico, incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

El estudio de robustez se utiliza para optimizar y ver la criticidad del valor de los parámetros del método antes de validar. A partir de este estudio se definirán las características de idoneidad o conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados. Dichas características se reúnen en un ensayo conocido como ensayo de idoneidad.

La comprobación de la idoneidad forma parte integral del método, y debe realizarse cada día al inicio del análisis (dependiendo de la duración de éste, será conveniente realizarlo a intervalos de tiempo), para comprobar el correcto funcionamiento del sistema. Los requerimientos y parámetros a evaluar en un ensayo de idoneidad dependerán del tipo de método.

4.14 Validación de Métodos Analíticos Consideraciones Generales.

4.14.1 Definición, Importancia y Necesidad De Validación

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo:

- Especificar e implementar.
- Aprobar.
- Documentar.

Existen varias formas de llevar a cabo una validación, de acuerdo a sus objetivos y alcances, los cuales dependen del analista, del laboratorio y del uso que se haga del método; además el analista debe conocer los resultados esperados y definir el nivel de confianza. El laboratorio que desarrolla o aplica el método es el responsable del proceso de validación.

Veamos cuatro de las posibles definiciones de validación:

- El establecimiento de una base de datos experimental que certifica el rendimiento de un método analítico teniendo en cuenta su objetivo de diseño.



- La confirmación por medio de una evaluación, con la cual se suministra la evidencia necesaria para ratificar que los objetivos de diseño del método bajo especificaciones particulares se cumplen en su totalidad.
- Obtención de pruebas con arreglo a las Normas de Correcta Fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto (Según las Normas de Correcta Fabricación (edición 99).
- Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de la calidad previamente establecidos.

Dos palabras claves en estas cuatro definiciones reúnen los dos objetivos primordiales de una validación:

- Establecer un método.
- Confirmar su desempeño por medio de tratamientos estadísticos y apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general.

De ahí radica la importancia de una adecuada validación, ya que establece bajo qué circunstancias debe realizarse un análisis asegurando que los datos obtenidos cumplen en la totalidad la calidad deseada, brindando seguridad y respaldo. Además, proporciona criterios para el rechazo o reanálisis de lecturas anómalas.

La validación de un método, generalmente, está íntimamente relacionada con el desarrollo del método. En efecto, a menudo es difícil saber de forma exacta, cuándo termina el desarrollo del método y cuando comienza la validación.

En la figura siguiente se esquematiza el ciclo de una validación, en teoría éste se repite indefinidamente debido a los continuos avances instrumentales y/o al desarrollo de nuevas técnicas.



Ciclo de la validación

4.14.2 Necesidad de una validación

Eurachem, una asociación europea de laboratorios focalizada en el mejoramiento y estandarización de los métodos de análisis químico, propone los siguientes principios para promover una buena práctica en las mediciones de análisis químico:

Las mediciones analíticas deben hacerse para satisfacer un objetivo definido.

Las mediciones analíticas deben realizarse usando métodos y equipos evaluados (cualificados), y así asegurar que estos son adecuados para su propósito.

Los analistas encargados de los ensayos deben estar calificados y ser competentes con las tareas asignadas, además deben demostrar que ellos pueden realizar el análisis de forma adecuada.

Debe de existir un aseguramiento independiente y periódico del desempeño de las técnicas del laboratorio.

4.14.3 Razones que justifican la validación de métodos analíticos.

Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.

Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.

Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.



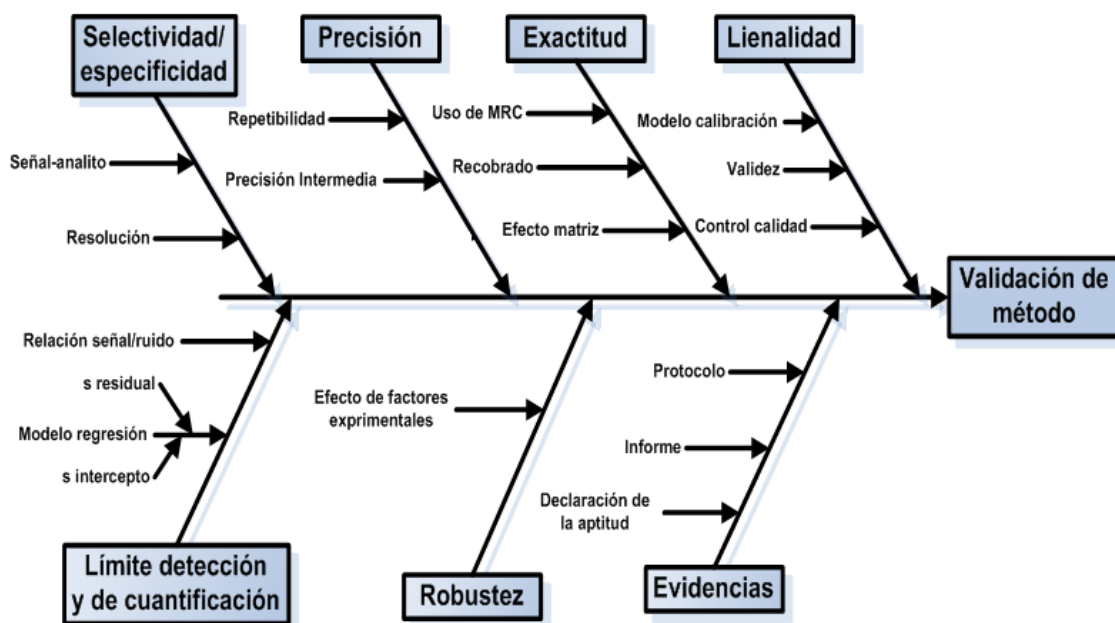
La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

4.15 Características de fiabilidad.

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Las características de fiabilidad comprenden los cinco criterios fundamentales de validación, (no necesariamente aplicables en todos los casos) y de los que derivan en la práctica todos los parámetros de validación:

Los parámetros de desempeño correspondientes a la Categoría I que fueron incluidos en el siguiente trabajo monográfico para la validación de la metodología analítica para la Identificación y cuantificación de Betametasona por HPLC se definen a continuación en el siguiente esquema:



4.16 Parámetros de Desempeño en la Validación de Métodos Analíticos.

A continuación se definirán en orden de secuencias de experimentos los parámetros de validación que fueron determinados en el siguiente trabajo monográfico.



4.16.1 Idoneidad Del Sistema.

Definición.

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema, (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo, el conjunto del sistema, continúa siendo "válido" para el propósito para el que fue concebido. ^(15, 23,22)

Ámbito de aplicación.

El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales.

Procedimiento de determinación de la idoneidad.

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.

Los requisitos que debe cumplir el método analítico se establecen desde la primera fase de desarrollo, aunque en esos momentos no es posible concretar la prueba que permitirá comprobarlos. Durante este período será suficiente el registro de la evolución de los distintos parámetros analíticos a lo largo del tiempo y la comprobación de la precisión del sistema realizando medidas repetidas de una misma preparación de muestra.

Posteriormente, los resultados del estudio de robustez permitirán adquirir el conocimiento necesario para establecer los factores críticos y el impacto que éstos han tenido sobre el comportamiento del método. Este es el momento de diseñar las pruebas a realizar y establecer los criterios que permitan asegurar que los requisitos establecidos se cumplirán más allá del momento concreto en el que se lleva a cabo la validación propiamente dicha.

Los ensayos de idoneidad del sistema que se establezcan vendrán dados por el conocimiento adquirido del método y la viabilidad de su empleo en rutina debiendo corresponderse con los valores mínimos para los que los parámetros estudiados permanecen dentro de las especificaciones establecidas.



Estos ensayos no sólo demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también permiten establecer el criterio por el que modificar las condiciones analíticas descritas en el procedimiento con el fin de alcanzar la idoneidad. Estas modificaciones se encontrarán siempre dentro de unos límites establecidos durante el estudio de robustez.

El procedimiento de realización del test de idoneidad, así como sus criterios de aceptación deben encontrarse perfectamente establecidos dentro del método de análisis, indicando las acciones a realizar en caso de no cumplirse.

Parámetros de evaluación en técnicas cromatográficas en columna.

Los parámetros de evaluación de los ensayos de idoneidad se pueden agrupar en tres categorías:

4.16.2 Precisión.

Se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos tras el análisis de una serie de replicados de una muestra.

La precisión es el parámetro de más amplia aplicación para la evaluación de la idoneidad del sistema. Aunque habitualmente se estudia sobre el área del pico cromatográfico, también puede evaluarse sobre la altura o el tiempo de retención.

Parámetros Cromatográficos:

- Factor de retención.

El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de solutos en columnas Cromatográficas; este factor determina la retención de un soluto.

- Número de platos teóricos.

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas.



- Factor de coleo o asimetría.

Las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permiten una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva.

- Factor de resolución.

La resolución es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posible interferencia

4.16.3 Limite de detección o cuantificación.

Una prueba de idoneidad del sistema también puede ser útil para confirmar la consecución de un determinado limite de cuantificación o de detección, con el fin de comprobar la capacidad de cumplimiento con la función para el cual se ha establecido, por ejemplo para analizar bajos niveles de impurezas.

Por la naturaleza de este parámetro su aplicación será de elección en cualquier método (cromatográfico o no) utilizado para la determinación de impurezas.

5.1 Robustez.

Definición.

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

Ámbito de aplicación.

Aunque tanto las guías ICH como la USP definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, no es considerado, todavía, un requisito necesario para registro de especialidades, sino que se trata de un estudio que surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provocaba serias dificultades en la equivalencia entre los resultados de ambos centros de análisis, de modo que



con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de análisis. Por esta misma razón, las guías ICH recomiendan incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero. Incluso después de realizar el estudio de robustez podría concluirse que se debe modificar algún parámetro del método, obligando a la consiguiente revalidación de los puntos necesarios.

Se considera por tanto que antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar, es recomendable hacer un estudio de robustez de forma que una vez fijados los márgenes en los que el método es robusto, se pudieran incluir éstos como parte del método final, dotándolo así de una cierta flexibilidad. Es decir se tendría una justificación válida que apoyaría la modificación de ciertos parámetros en el caso de que fuera necesario, por ejemplo a la hora de cumplir una idoneidad del sistema en cromatografía.

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. Algunos pueden tener muchos parámetros sobre los que actuar y otros menos. Además éstos no tienen por qué ser sólo factores relacionados con la medida final, sino que pueden ser de cualquier etapa del procedimiento analítico, como por ejemplo la preparación de la muestra. Por esto, la primera etapa del estudio es precisamente analizar todo el método y definir qué factores son los que se espera que influyan más en el resultado final.

Procedimiento de determinación de la robustez.

Factores y niveles de influencia.

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, qué parámetros se van a medir en cada ensayo. En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable sobre la concentración de analito calculada. El estudio de la influencia sobre varios parámetros nunca implica la realización de más ensayos, sino que se puede hacer a partir de los mismos.

Los factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tantos factores cuantitativos (ej. influencia del valor de pH, del valor de temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil en HPLC, etc.) como cualitativos (ej.



fabricante de la columna cromatográfica, fabricante de un determinado reactivo, etc.).

Factores que pueden variarse para la técnica analítica HPLC para determinar la robustez del método.

- a. Composición de la fase móvil:
 - a.i. Porcentaje de orgánico.
 - a.ii. Concentración de sales en el tampón (fuerza iónica).
 - a.iii. Concentración de aditivos (ej. aminas).
 - a.iiii. En gradientes de elución.
- b. Volumen de inyección.
- c. pH de la fase móvil.
- d. Temperatura de la columna.
- e. Flujo.
- f. Tipo de columna.
- g. Detector: Variación de longitud de onda (UV).
- h. Sensibilidad de integración.

Una vez definidos los factores que pueden influir en el análisis se ha de fijar entre qué márgenes de variación se quieren evaluar.

Normalmente los márgenes de fluctuación de cada factor cuantitativo se distribuyen simétricamente respecto al valor nominal descrito en el método de análisis, (ej. pH \pm 0.1) aunque no siempre tenga que ser así, puesto que lo que interesa es fijar unos intervalos que se correspondan con lo que es esperable que el método fluctúe en el proceso.

Tras establecer los factores a estudiar la forma aparentemente más sencilla de comprobar la influencia de cada uno de ellos sobre el método sería comparar los resultados obtenidos modificando dicho factor, pero manteniendo constantes los demás.

Estudio de la Estabilidad.

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez. La estabilidad de las disoluciones de la muestra, después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización. Muchos laboratorios utilizan equipos automáticos que procesan muestras durante largos periodos de tiempo, con lo que la muestra puede permanecer horas preparada antes de ser analizada. De la misma forma debe demostrarse la estabilidad de las muestras y patrones preparados si se utilizan durante varios días.



La forma de evaluación de este parámetro en los métodos cromatográficos en columna (HPLC), consistirá en realizar inyecciones replicadas de una misma muestra a lo largo del tiempo que se considere necesario. En caso de que la estabilidad de la muestra pueda afectar al resultado en el periodo de tiempo evaluado, se ha de hacer constar en el método de análisis.

5.2 Linealidad Rango y Sensibilidad.

Definición.

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango de concentraciones establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.

Función respuesta.

La función de respuesta (curva de calibración) de un método analítico es, dentro de un intervalo de concentraciones, la relación existente entre la respuesta o señal y la concentración o cantidad del analito en la muestra. La función respuesta monótona más simple es la curva de calibración.

Calibración.

La calibración es el proceso que comprende:

- Preparar y analizar una serie de estándares.
- Determinar los valores de respuesta (datos primarios).
- Encontrar el modelo estadístico para ajustar los datos y predecir la concentración de un analito en una muestra.

Ámbito de aplicación.



Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo:

- Valoración del contenido de principio activo.
- Uniformidad de contenido.
- Velocidad de disolución.
- Cuantificación de impurezas.

Evaluación estadística de la linealidad.

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Parte de la inspección visual preliminar que se debe realizar a la regresión lineal, es importante verificar estadísticamente la linealidad y la aleatoriedad de los valores residuales.

5.3 Sensibilidad.

La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta (respuesta vs concentración), es decir, el cambio en la respuesta de un instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito, en otras palabras, es la pendiente de la curva de calibración.

Cuando un método tenga una pendiente más alta que otro, se dice que el primero es más sensible. La IUPAC define la sensibilidad de forma más técnica como "El cambio en la respuesta de un instrumento dividido por el correspondiente cambio del estímulo (señal de entrada). Cuando se ha establecido linealidad en la curva de respuesta este parámetro es constante, sin embargo en métodos no lineales existen valores para distintos rangos de concentración. La sensibilidad en ocasiones es referida al límite de detección pero esto en general no es aceptado.

5.4 Precisión.

Definiciones.

La precisión se relaciona con la dispersión de la medida alrededor de un valor medio central. Expresa el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen



generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

En la precisión pueden considerarse tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. En el siguiente esquema podemos observar de manera más clara la organización jerárquica de estos niveles.

La precisión de un método analítico por lo general se expresa como la varianza, desviación estándar o como la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.

Repetibilidad.

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. La repetibilidad también se conoce como precisión intra-ensayo.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

La repetibilidad a fin de un mejor estudio se divide en dos partes:

Repetibilidad del sistema instrumental.

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas.

Repetibilidad del método.

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.



Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de dos muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

Precisión intermedia.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

Reproducibilidad.

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. No se hará mucha referencia a este parámetro debido a que nuestra validación se centra en el trabajo Intralaboratorio.

La precisión y exactitud a menudo son conceptos que pueden confundirse, para una mejor apreciación de lo que significa cada una podemos analizar la siguiente figura.

Ámbito de aplicación.

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas. Por lo tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni en el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.

5.5 Selectividad.

Definición.



Capacidad de un método analítico para medir e identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida sólo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta solo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

La selectividad de un método analítico se debería 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 analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

Ámbito de aplicación.

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos. De hecho es muy difícil declarar que no existe interferencia en la determinación de un analito porque siempre existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, hasta el momento desconocida, que interfiera. También se puede dar el caso contrario, de hallar alguna posible interferencia que en la práctica diaria sea improbable que se produzca.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como sobre posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.



El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico. Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta qué punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles.

Los criterios de selectividad que debe satisfacer un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique. El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar la estabilidad del principio activo o de la forma farmacéutica. El método ha de permitir distinguir entre todas las posibles especies químicas existentes o que puedan generarse. Sin embargo, para un método de control de calidad de rutina la existencia de alguna interferencia se podría aceptar si ésta es conocida y de magnitud aceptable. En estos casos la selectividad puede entrar en conflicto con el coste y el tiempo necesarios para la determinación del analíto.

Las conclusiones de los estudios de selectividad están vinculadas al origen de la muestra, la optimización de la preparación, la especificidad de la medida y las condiciones instrumentales. Por tanto, cualquier cambio en las mismas supone una reconsideración del estudio realizado. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto el estudio de la selectividad es el parámetro que en más ocasiones debe revisarse.

A grandes rasgos el estudio de la selectividad variará su planteamiento según el objetivo y la técnica analítica aplicada.

Determinación de la Selectividad según objetivo del ensayo.

Ensayos de Identificación.

Se debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra.

Durante el desarrollo de una molécula la identificación requerirá la comprobación de la estructura de la molécula mientras que en un método para el control de calidad rutinario no será necesaria la confirmación completa de la estructura química o composición del producto y bastará con la comparación con una sustancia de referencia. En estos casos el objetivo es confirmar, con un grado de seguridad aceptable, que el producto se corresponde con lo esperado.

Ensayos para el análisis de impurezas.



Se debe garantizar que el método permite una evaluación de las impurezas y los productos de degradación definidos en estudios previos, sin interferencia de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

Para estos ensayos se presupone que se han realizado estudios previos y se han definido las impurezas y productos de degradación susceptibles de aparecer. Si el método es selectivo para determinados productos de degradación puede utilizarse para controlar la estabilidad del producto.

Ensayos para la determinación de la riqueza de un activo en una especialidad farmacéutica.

El método debe evitar la interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

Una vez demostrada la selectividad del método se puede prescindir de la técnica complementaria. El método seguirá siendo válido mientras se aplique a muestras obtenidas a través de la misma ruta de síntesis y con igual perfil de impurezas. En la aplicación rutinaria del método los parámetros del test de idoneidad del sistema permiten comprobar el mantenimiento de la selectividad del método.

Procedimientos de determinación de la selectividad.

En el estudio de la selectividad, como norma general, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipientes.

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método como se muestra a continuación:

Por adición de las interferencias.

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos para los que se tienen identificadas las posibles interferencias y éstas se encuentran disponibles de forma aislada.

En estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de dichas interferencias. Se evaluará a qué nivel se producen y si es preciso modificar el método o añadir alguna técnica complementaria.



Para una forma farmacéutica y una materia prima los grupos de muestras que se preparan normalmente serían los siguientes:

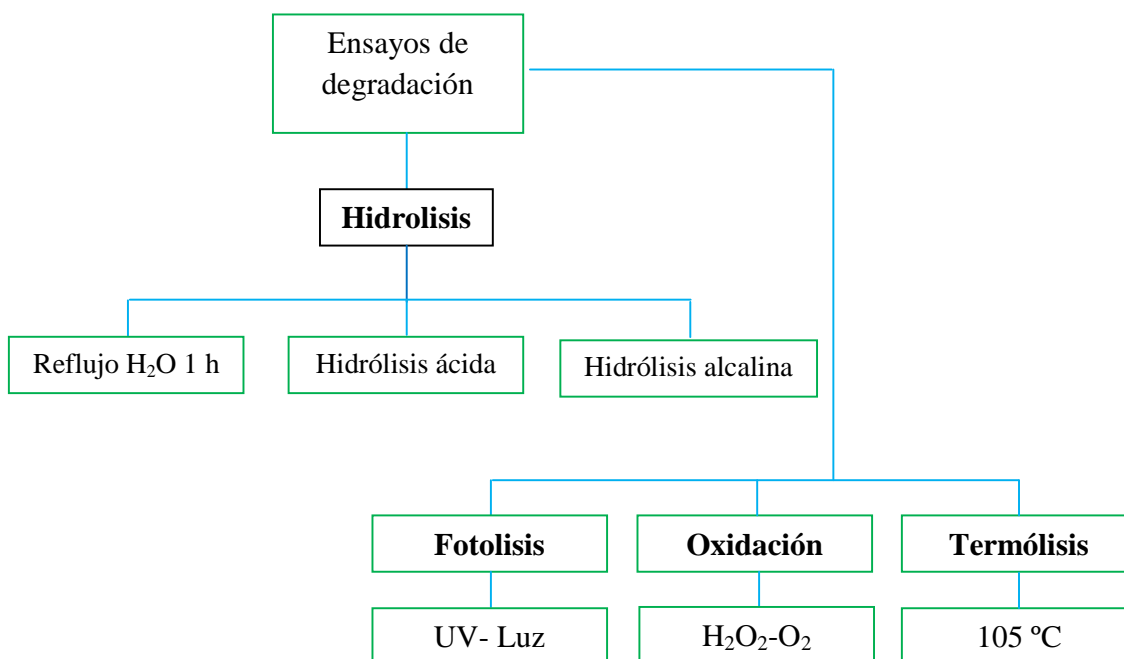
Determinaciones para la forma farmacéutica	Determinaciones para la materia prima
Matriz	Blanco
Analito	Analito
Matriz + Analito	Otras sustancias similares
Matriz + Analito + Impurezas + Productos de degradación.	Analito + productos de degradación + impurezas.

La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés (ej. Agente estabilizante) y las interferencias a su límite máximo establecido.

Aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés.

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas a estrés químico para generar los compuestos potencialmente interferentes; en el siguiente esquema se muestra los diferentes tipos de degradación que puede ser sometida el analito de interés:

Selectividad Frente Estrés Físicoquímico.





Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene sólo de él. Las condiciones de estrés para lograr una degradación del orden del 10-20% en la mayoría de principios activos son:

Condiciones para la forma farmacéutica	Condiciones para la materia prima
Calor (40-70 °C)	Calor (40-100 °C)
Luz	Luz
Humedad relativa (85%)	Ácido (HCl 0.1 N)
	Base (NaOH 0.1 N)
	Oxidante (H ₂ O ₂ 3%)

La evaluación de la degradación se puede determinar comparando los perfiles obtenidos del producto estresado y no estresado. Con esta finalidad puede ser de interés la superposición, de los distintos cromatogramas obtenidos. Dichos cromatogramas se adjuntarán en el informe a una escala razonable que permita la perfecta visualización del perfil obtenido.

Procedimientos que ayudan a la determinación de la selectividad en métodos cromatográficos (HPLC).

Equipo instrumental con detector espectrofotométrico con arreglo de diodos.
 Determinación de los tiempos de retención del analito y productos de degradación.
 Empleo de detectores de mayor selectividad.
 Empleo de técnicas complementarias (espectrofotometría), y de sistemas de acople (cromatografía líquida con detector infrarrojo, CL con detector de masas).
 Superposición de espectros.

5.6 Exactitud.

Definición y generalidades.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. También es llamada en algunos casos fidelidad. En el método de validación se busca con el cálculo de la exactitud valorar conjuntamente los efectos sistemáticos y aleatorios, y está muy ligado con la precisión, incluso algunos autores dividen la exactitud en dos componentes: fidelidad y precisión.

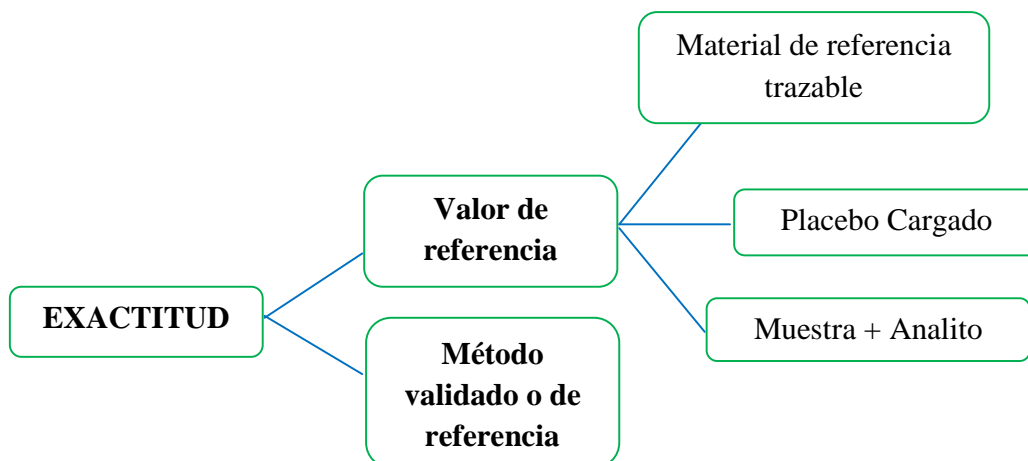


Para no crear confusiones, en este estudio se tomará la exactitud como fidelidad o trueness y la precisión será un factor independiente, aunque no aislado.

Se recomienda que la exactitud se calcule después de que la precisión, linealidad y la selectividad hayan sido establecidas.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

Existen dos procedimientos en general para determinar la exactitud de un método. El primero y más común; es realizar la comparación contra un material de referencia, que puede ser un estándar trazable, un placebo o una muestra con una cantidad de analito conocida. El segundo método es comparar los resultados con otra técnica aún más exacta o que por consenso común es referencia (métodos oficiales), este caso se usa cuando no existen materiales de referencia certificados o trazables. En el siguiente esquema se puede observar la anterior clasificación:



Ámbito de aplicación.

Según la guía (ICH, Q2A) debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.

Procedimientos de determinación de la exactitud.



La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo tres determinaciones por tres niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo.

La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación (ver ecuación) en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.^(23,15)

$$\%R = \frac{X_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Diferencia (Sesgo)} = X_m - \mu$$

Expresión matemática de la exactitud

Donde X_m es el valor medio encontrado y μ es el valor aceptado como verdadero.

Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida.

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición estándar sobre el problema.

Método del placebo cargado.

Se prepara un placebo que contiene todos los ingredientes menos el analito, es decir, que sea la misma matriz. A este se agregan cantidades conocidas de analito, mínimo tres niveles y tres repeticiones a cada uno. Se calcula la recuperación. Este método puede presentar cierto grado de incertidumbre y constituye solo una aproximación a la muestra en casos reales.

Recobrado y evaluación de interferencias (EFECTO DE MATRIZ).

El efecto matriz es el cambio en la pendiente de la curva de calibrado, o alteración de la sensibilidad, producida por la matriz (medio que conforma todos los componentes de la muestra que contiene el analito).



El efecto es producido debido a la particular forma química en que se encuentra el analito en la muestra, y también a su entorno fisicoquímico, esto es, a la presencia de los componentes de la muestra que interaccionan con el analito de interés.

Los componentes de la matriz pueden provocar un efecto depresor o intensificador de la señal analítica o efecto de matriz. Para minimizar este efecto se utiliza el método de adición patrón en la curva de calibración.

Para determinar si existe o no efecto matriz se estima el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de calibración de la muestra versus la curva de calibración del estándar.

5.7 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

Definición y generalidades.

Se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH, QZA).

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

No deben confundirse estos términos con otro al que normalmente se asocian, la sensibilidad, ya que, ésta es la capacidad de un método de análisis para discriminar pequeñas diferencias en concentración o masa del analito. Por lo tanto en términos prácticos, la sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración obtenida al representar la respuesta frente a la concentración. En este sentido una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de cuantificación y de detección, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre el ruido y la señal debida al analito; es decir, a este respecto siempre es preferible un sistema con bajo ruido de fondo a costa de una menor sensibilidad.

Ámbito de aplicación.

De esta definición general se derivan, no obstante una serie de cuestiones previas a resolver, tales como cuando es necesario establecer los límites de cuantificación y



detección para un método de análisis y cuál es el interés en su determinación; es decir, qué aporta a la validación del método establecer dichos límites.

Como ya se ha apuntado con anterioridad, la guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Esto es, ensayos en los que simplemente se determina si la cantidad de impureza presente en la muestra es superior o no al límite establecido en especificaciones, sin dar un valor numérico. Se trata de demostrar de esta forma que el método es realmente capaz de detectar la concentración límite y superiores.

Por otra parte, cuando el método se define como un método de análisis de valoración de contenido en el cual siempre se trabajará en rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo, no sería necesario la determinación de éstos parámetros; no obstante, y como se ha insistido a lo largo de la monografía, la validación permite un mejor conocimiento del método analítico, y desde este punto de vista, saber cuáles son las cantidades mínimas de analito que se podría cuantificar puede resultar muy interesante y en ocasiones útil.

Es importante recordar que una vez establecidos estos límites y como en cualquier otro parámetro de validación, será necesario recalcularlos siempre que se introduzcan variaciones en el método que puedan afectar a su valor, o se modifique el modelo de equipo empleado en el análisis (ej: transferencia de métodos analíticos interlaboratorio).

Métodos determinación del LD y LC.

- ✓ Métodos basados en el examen visual.
- ✓ Método basado en la relación señal/ruido.
- ✓ Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado.
- ✓ Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco.
- ✓ Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero.



V DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1 Descripción de las actividades a realizar.

Para la implementación, desarrollo y validación de la metodología analítica la cuantificación de Betametasona en la crema se realizaron las siguientes actividades:

- ✓ Revisión bibliográfica sobre el desarrollo y validación en bibliografía escrita (libros, farmacopeas, manuales de equipos, revistas, tesis, memorias de práctica, apuntes de cursos, etc.) y en internet.
- ✓ También se consultó a profesionales expertos en el tema acerca de dudas puntuales.
- ✓ Revisión bibliográfica del principio activo Betametasona Dipropionato y los demás componentes de la formulación.
- ✓ Manejo del equipo HPLC (bases del funcionamiento del equipo y sus componentes, manejo del software, mantención, tipos de columnas y sus características, cuidados y precauciones, etc).



- ✓ Implementación de la metodología analítica para la cuantificación de Betametasona en la crema con estándar y producto terminado, verificándose que las condiciones de trabajo eran adecuadas.
- ✓ Definición de las condiciones generales de trabajo (preparación de la muestra, estándar con que se trabajaría, etc).
- ✓ Definición de las técnicas específicas para la evaluación de cada uno de los parámetros de desempeño, los análisis estadísticos que se aplicarán a los resultados de cada parámetro y los criterios de aceptación para cada uno de éstos.
- ✓ Redacción del documento que contenga toda la información pertinente del tema.
- ✓ Ensayos preliminares de la medición de los parámetros de desempeño.
- ✓ Realización de la validación de la metodología de Betametasona en la crema.
- ✓ Tratamiento de datos.
- ✓ Emisión de documentos finales.

5.2 Población en estudio.

La población en estudio fueron 30 tubos de Betametasona 0.05% Crema y 10 tubos de placebo del mismo producto, el número de lote de dichos tubos fue de 630810 y 640810 respectivamente.

5.3 Muestra.

El procedimiento a seguir para la selección de las muestras a utilizar en la realización de los análisis será a través de Tabla Mil Estándar empleando un Muestreo Aleatorio Simple; tomando para ello una muestra del 16% del universo en estudio.

Las Muestras a utilizar tanto de Placebo como de Producto Terminado son solicitadas al Departamento de Investigación y Desarrollo.

Una vez recibidas las muestras se trasladan al Departamento de Control de Calidad al Área de Fisicoquímica de LABORATORIOS RAMOS S.A, se identifican como muestras para desarrollo y validación y se almacenan a temperatura entre 15°C-30°C.

5.4 Alcance.

El análisis propuesto aplica para la Identificación y Cuantificación de Betametasona 0.05%, Crema que contiene como principio activo Betametasona



Dipropionato equivalente a Betametasona Base se realizara por el método de cromatografía líquida de resolución

5.5 Area de estudio.

La ejecución de las características de fiabilidad o parámetros de validación del método de análisis de Betametasona 0.05%, Crema se realizan en el Departamento de Control de Calidad, en el que se encuentra todo el material analítico, documentación actualizada y aprobada, equipos y dispositivos de seguimiento y medición necesarios para realizar los parámetros de validación.

5.6 Materiales usados en el trabajo analítico.

Los materiales siguientes se utilizan para el desarrollo y validación de la metodología analítica:

5.7 Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) SHIMADZU modular.

Módulos	Descripción	Modelo	Serie
Bandeja para recipientes de la Fase móvil	Bandeja de capacidad de 6 recipientes de Fase Móvil.	-----	-----
Recipientes para la Fase Móvil	Cuatro recipientes para fase móvil y un recipiente para el lavado del automuestreador todos de capacidad de 900 mL.	DURAM SCHOTT	-----
Desgasificador	Desgasificador en línea de la Fase Móvil.	Promminince Degasser	DGU-20A5



Facultad de Ciencias Químicas

Bomba	Cuaternaria	LC – 20 AT	L 20114759006
Inyector	Automático	SIL – 20 AHT	L 20344755432
Horno	Horno para la columna cromatográfica.	CTO- 20 ^a	L 20204751139
Detector	Espectrofotométrico con Arreglo de Diodos.	SPD- M20A	L 20154750747
Integrador	Integrador entre el equipo y el PC.	INT-205P	L-254254789

Nombre	Descripción
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18 150 mm x 4.6 mm 5 µm.
Balanza Analítica	Marca: A&D; Modelo: HM-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.01 mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 5 a 40°C y Humedad Relativa: ≤ 85%.
Baño ultrasónico	Fisher Scientific
Bomba de succión	Para filtrar y desgasificar solventes o la fase móvil.
Pipetas volumétricas	Pipetas volumétricas clase A marca Pyrex.
Filtros	Filtro de papel marca Whatman, acrodiscos de 0.45µm y filtros de membrana de 0.45 µm para filtrar solventes y fase móvil.
Espátulas	Espátula para pesar los estándares y los reactivos a usar.
Balones	Balones Pyrex clase A.
Vasos de Precipitación	Beaker Pyrex.
Probetas	Probetas.
Jeringa de plástico	Para la toma de muestra.
Viales	Marca Agilent de 1.3 mL..
Destilador de Agua	Destilador de Agua potable.
Computadora	Toshiba.
Impresora	Hp laser.
Calculadora	CASIO.
Barra magnética	-----
Cocina con agitador magnético	-----

5.8 Reactivos Utilizados.



Los reactivos siguientes se utilizaran durante la ejecución de esta validación:

Reactivo	Pureza en %	Grado	Lote	Marca
Acetonitrilo	99.95%	HPLC	75-05-8	JB Baker
Ácido Acético Glacial	100.2%	ACS	102831	JB Baker
Metanol	99.99%	HPLC	67-56-1	JB Baker
Metanol	99.98%	ACS	J21C60	JB Baker
Ácido Clorhídrico	37.4%	ACS	J19C04	JB Baker
Hidróxido de Sodio	98.4%	ACS	1310732	JB Baker
Peróxido de Hidrogeno	30.0	ACS	125454	MERCK
Agua Destilada	----	----	----	

5.9 Estándares de Referencia.

Primario: Betametasona Dipropionato.

Marca	Estándar de referencia primario USP
Pureza	99.7%
Fecha de Fabricación	06/2009
Fecha de Vencimiento	05/2014
Fabricante	USP34NF29

Secundario: Betametasona Dipropionato.

Lote	BDP/N/002/09
Pureza	100.39%
Fecha de Fabricación	06/2009
Fecha de Vencimiento	05/2014
Fabricante	Ipca Laboratories Limited

Secundario: Betametasona Base.

Lote	Bb/N/042/10
Pureza	99.75 %
Fecha de Fabricación	07/2009
Fecha de Vencimiento	07/2014
Fabricante	Ipca Laboratories Limited



Secundario: Betametasona Valereato.

Lote	BV/V/055/11
Pureza	98.85 %
Fecha de Fabricación	08/2010
Fecha de Vencimiento	08/2016
Fabricante	Ipca Laboratories Limited

Secundario: Betametasona Benzoato.

Lote	BBE/N/542/09
Pureza	99.37 %
Fecha de Fabricación	05/2008
Fecha de Vencimiento	05/2011
Fabricante	Ipca Laboratories Limited

Secundario: Betametasona Acetato.

Lote	BAE/N/777/12
Pureza	100.05%
Fecha de Fabricación	06/2010
Fecha de Vencimiento	05/2014
Fabricante	Ipca Laboratories Limited

Secundario: Dexametasona Base.

Lote	DX1234578
Pureza	99.57 %
Fecha de Fabricación	07/2009
Fecha de Vencimiento	05/2014
Fabricante	-----

5.10 Procedimiento Analítico para la Identificación y Cuantificación de Betametasona 0.05% Crema.

5.10.1 Solución de Ácido Clorhídrico 0.1 N (100 mL).



En un balón volumétrico de 100 mL, agregar 25 mL de Agua Destilada. Agregar 0.8 mL de Ácido Clorhídrico concentrado y agitar. Enfriar a temperatura ambiente y aforar hasta volumen con Agua Destilada.

5.10.2 Solución Hidróxido de Sodio 0.1 N (100 mL).

Pesar 400 mg de Hidróxido de Sodio y transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Agregar 25 mL de Agua Destilada y disolver manualmente por un minuto. Enfriar a temperatura ambiente y aforar hasta volumen con Agua Destilada.

5.10.3 Solución Metanólica de Ácido Acético Glacial, 0.035 N, 1 L (Solución Diluyente).

En un balón volumétrico de 1 L, agregar 200 mL de Metanol ACS, posteriormente con ayuda de una pipeta volumétrica adicionar 2 mL de Ácido Acético Glacial. Mezclar manualmente y aforar hasta volumen con Metanol ACS.

5.10.4 Preparación de la Fase Móvil.

En una probeta de 500 mL mezclar de forma adecuada 10 partes de Metanol grado HPLC, 58 partes de Acetonitrilo y 32 partes de Agua Destilada, filtrar por medio de filtro nylon de 0.45 μ m con ayuda de succión al vacío; y proteger la solución anterior del contacto del oxígeno.

5.11 Método de Identificación de Betametasona Dipropionato en el Producto Betametasona 0.05% Crema.

Preparar una Solución Estándar, una Solución Muestra, una Solución Placebo y una mezcla de Corticoides de la siguiente manera.

5.11.1 Preparación de Solución Estándar.

Pesar la cantidad de 16.1 mg de estándar secundario de Betametasona Dipropionato (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalente a 12.5 mg de Betametasona Base y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente, aforar con Solución Diluyente, agitar manualmente por 30 segundos. Solución N^o1.



De la Solución N°1 tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Filtrar la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μ m y llenar viales.

Concentración final de Betametasona Base: 10 μ g/mL.

5.11.2 Preparación de Solución Muestra.

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de crema de Betametasona 0.05%, equivalente a 2.5 mg de Betametasona Base, adicionar aproximadamente 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar vigorosamente la solución por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución por medio de papel filtro de 110 mm de diámetro. Solución N°1.

De la Solución N°1 tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota filtrada de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, Filtrar la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μ m y llenar viales.

Concentración final de Betametasona Base: 10 μ g/mL.

5.11.3 Preparación de la Solución de Corticoides.

Pesar aproximadamente las cantidades de 12.5 mg de Betametasona Base, 16.1 mg de Betametasona Dipropionato, 11.3 mg de Betametasona Acetato, 9.9 mg de Betametasona Benzoato, 10.3 mg de Betametasona Valereato (todas las pesadas de los esteres de Betametasona son equivalentes a 12.5 mg de Betametasona Base) y 12.5 mg de Dexametasona Base, y transferir de forma cuantitativa cada pesada a un balón volumétrico de 100 mL, adicionar aproximadamente 50 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente, aforar con Solución Diluyente, agitar manualmente por 30 segundos. Solución 1.

De la solución anterior tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con



Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Filtrar la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Concentración final de Betametasona Base: 10 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración final de Dexametasona: 10 $\mu\text{g/mL}$.

5.11.4 Preparación de Solución Placebo.

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de Placebo de Betametasona 0.05%, Crema, adicionar aproximadamente 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo por 5 minutos. Filtrar una porción de la solución por papel filtro de 110 mm de diámetro. Solución 1.

De la solución anterior tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota filtrada de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar los viales.

Concentración final de Betametasona Base: 0.0 $\mu\text{g/mL}$.

Condiciones Cromatográficas y del Método de Identificación.

Columna	Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18 150 mm x 4.6 mm 5 μm .
Fase Móvil	Agua: Acetonitrilo: Metanol (32:58:10).
Sistema de Bombeo	Ternario o Isocrático.
Flujo	1.0 mL/min.
Presión	90 \pm 10 Bar.
Volumen de Inyección	20 μL .
Temperatura Horno Columna	30.0 °C.
Sistema de Detección	Espectrofotométrico con Serie de Diodos.
Longitud de Onda	240 nm.
Factor de Respuesta	Tiempos de Retención.
Tiempo de Retención	4.5-5.9 Minutos.



(Betametasona Dipropionato)	
Tiempo de Corrida	6.5 Minutos.
Estándar de Referencia	Betametasona Dipropionato Estándar de Referencia Secundario.
Concentración Nominal	10 µg/mL de Betametasona Base.

5.11.5 Procedimiento y Criterio de Aceptación.

Procedimiento.

Inyectar por triplicado las soluciones anteriormente preparadas en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución y registrar los tiempos de retención promedio obtenidos tras la inyección del estándar, muestra y placebo respectivamente.

Criterio de Aceptación.

El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de la solución estándar secundario de Betametasona Dipropionato se debe de corresponder con el tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la preparación de la solución muestra.

El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de la solución estándar secundario de Betametasona no debe de corresponder con el tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la preparación de la solución placebo.

El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de la solución estándar de Betametasona Dipropionato se debe de corresponder con el tiempo de retención del pico de Betametasona Dipropionato en el cromatograma de la preparación de la mezcla de estándares de Betametasona Base, Dipropionato, Valeriato, Benzoato, Acetato y Dexametasona.

5.12 Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato Equivalente a Betametasona en el Producto Betametasona 0.05% Crema.



Preparar una Solución Estándar, una Solución Muestra, una Solución Placebo y una Solución de Placebo Cargado de la siguiente manera.

5.12.1 Preparación de Solución Estándar.

Pesar la cantidad de 16.1 mg de estándar secundario de Betametasona Dipropionato (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalente a 12.5 mg de Betametasona Base y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente, aforar con Solución Diluyente, agitar manualmente por 30 segundos. Solución N°1.

De la Solución N°1 tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Filtrar la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Concentración final de Betametasona Base: 10 $\mu\text{g/mL}$.

5.12.2 Preparación de Solución Muestra.

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de crema de Betametasona 0.05%, equivalente a 2.5 mg de Betametasona Base, adicionar aproximadamente 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos.

Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar vigorosamente la solución por 1 minuto.

Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución por medio de papel filtro de 110 mm de diámetro. Solución N°1.

De la Solución N°1 tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota filtrada de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, Filtrar la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Concentración final de Betametasona Base: 10 $\mu\text{g/mL}$.

5.12.3 Preparación de Solución de Placebo Cargado.



Pesar en un beaker de 250 mL, 5 g de Placebo de Betametasona 0.05 %, Crema; pesar por aparte 6.43 mg de Betametasona Dipropionato (ajustar la pureza si es menor del 100%) equivalente a 5 mg de Betametasona Base, adicionar 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar vigorosamente por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución por papel filtro de 110 mm de diámetro. Solución N°1.

De la Solución N°1 tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota filtrada de 5 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 µm y llenar los viales.

Concentración de Betametasona Base: 10 µg/mL.

5.12.4 Preparación de Solución Placebo.

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de Placebo de Betametasona 0.05%, Crema, adicionar 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos.

Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar vigorosamente la solución anterior por 1 minuto.

Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución por papel filtro de 110 mm de diámetro. Solución N°1.

De la Solución N°1 tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota filtrada de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 µm y llenar los viales.

Concentración final de Betametasona Base: 0.0 µg/mL.

Condiciones Cromatográficas y del Método de Cuantificación.

Columna	Agilent Zorbax Eclipse XDB C-18 150 mm x 4.6 mm 5 µm.
Fase Móvil	Agua: Acetonitrilo: Metanol (32:58:10).



Sistema de Bombeo	Ternario o Isocrático.
Flujo	1.0 mL/min.
Presión	90 ± 10 Bar.
Volumen de Inyección	20 µL.
Temperatura Horno Columna	30.0 °C.
Sistema de Detección	Espectrofotométrico con Serie de Diodos.
Longitud de Onda	240 nm.
Factor de Respuesta	Áreas.
Tiempo de Retención (Betametasona Dipropionato)	4.5-5.9 Minutos.
Tiempo de Corrida	6.5 Minutos.
Estándar de Referencia	Betametasona Dipropionato Estándar de Referencia Secundario.
Concentración Nominal	10 µg/mL de Betametasona Base.

5.12.5 Procedimiento y Criterio de Aceptación.

Inyectar por triplicado las soluciones anteriormente preparadas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución y registrar las áreas obtenidas tras la inyección del estándar, muestra, placebo y placebo cargado respectivamente.

El contenido de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en la Crema se debe de encontrar en el rango de $100.00 \pm 10.00\%$.

5.13 Procedimiento para la determinación de los parámetros de desempeño en la validación de la metodología analítica.

5.13.1 Idoneidad del Sistema.

Preparar 3 soluciones estándares tal como se indica en el apartado 5.11.1 del presente documento y realizar inyecciones por quintuplicado de cada solución estándar.

El análisis de los resultados se realiza mediante el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa de los resultados obtenidos (Áreas y Altura de los picos) y determinando los parámetros cromatográficos que permitan una evaluación de la eficacia del sistema cromatográfico, (Tiempos de Retención, Número de Platos Teóricos, Factor de Asimetría y Factor de Capacidad).

Criterios de Aceptación	
Parámetros Evaluados	Especificaciones
Parámetros Cuantitativos	



Áreas	%RSD \leq 2.0% (Comparar los dos %RSD y el menor será el factor de Respuesta en la cuantificación).
Altura	
Parámetros Cualitativos	
Tiempos de Retención	%RSD \leq 2.0%
Parámetros Cromatográficos	
Numero de Platos Teóricos	$N \geq 2000$
Factor de Simetría	$0.8 \leq T \leq 2.0$
Factor de Retención	$2.0 \leq k' \leq 20.0$

5.13.2 Robustez.

La robustez se verificará mediante la realización de cambios en las condiciones nominales del método analítico, los factores de variación en el método analítico son la Longitud de Onda del máximo de absorción del analito (± 2 nm), el flujo (± 0.1 mL) y la proporción de solventes orgánicos (± 2 %) usado para la elución del soluto. Del producto terminado preparar una Solución Muestra tal como se muestra en 5.11 del presente documento y una Solución Estándar tal como en 5.11 del presente documento y desarrollar las condiciones de cambio en el análisis descritas en la tabla siguiente:

Nº de Experimentos	Longitud de Onda (± 2 nm)	Flujo (± 0.1 mL/min)	Proporción de Solventes Orgánicos (± 2 %)	
			Metanol (%)	Acetonitrilo (%)
1 (Control)	240	1.0	10	58
2	238	0.9	9	57
3	242	0.9	9	57
4	238	1.1	9	57
5	242	1.1	9	57
6	238	0.9	11	59
7	242	0.9	11	59
8	238	1.1	11	59
9	242	1.1	11	59



Inyectar las soluciones muestras y estándares por triplicado por cada Factor de Cambio. El análisis de los resultados se realiza mediante el cálculo del Porcentaje de Desviación Estándar Relativa de los resultados obtenidos de los 9 experimentos, los intervalos de confianza de los porcentajes recuperado de los 9 experimentos, el porcentaje recuperado de cada variación del método y determinando los parámetros cromatográficos que permitan una evaluación de la eficacia del sistema cromatográfico, (Numero de Platos Teóricos, Factor de Asimetría, Factor de Resolución y Factor de Capacidad).

Criterios de Aceptación	
Parámetros Evaluados	Especificaciones
Parámetros Cuantitativos	
Porcentaje Recuperado Por cada Factor de Cambio	100.00 ± 3.0%.
Promedio del Porcentaje Recuperado obtenido en los 9 ensayos	
Parámetros Cualitativos	
Tiempos de Retención	El %RSD por cada experimento ≤ 2.0% y el promedio de los 9 %RSD por ensayo debe de ser ≤ 3.0%.
Parámetros Cromatográficos	
Numero de Platos Teóricos	$N \geq 2000$
Factor de Simetría	$0.8 \leq T \leq 2.0$
Factor de Retención	$2.0 \leq k' \leq 20.0$

5.13.3 Selectividad del Método.

Frente a Excipientes.

➤ Preparación de Solución Placebo.

Preparar una solución de placebo según como se indica en la sección 5.12.4 del presente documento.

➤ Preparación de Solución Muestra.

Preparar una solución Muestra según como se indica en la sección 5.12.2 del presente documento.

➤ Preparación de la Mezcla de Corticoides.

Preparar una mezcla de Corticoides en solución según como se indica en la sección 5.11.3 del presente documento.



➤ **Preparación de Solución Estándar.**

Preparar una solución estándar según como se indica en la sección 5.11.1 del presente documento.

Inyectar por triplicado las soluciones anteriormente preparadas y registrar los respectivos cromatogramas.

➤ **Criterio de Aceptación**

1. La banda de elución principal del pico en el cromatograma de la preparación de la solución estándar se corresponde con la banda de elución principal del pico principal en el cromatograma de la solución muestra.
2. La banda de elución de todos los picos producidos por la preparación de la solución placebo no eluyen cerca de la banda de elución (Resolución mayor de 2) del pico principal en la preparación de la solución estándar y muestra en sus respectivos cromatogramas.
3. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de la solución estándar de Betametasona Dipropionato se debe de corresponder con el tiempo de retención del pico de Betametasona Dipropionato en el cromatograma de la preparación de la mezcla de estándares de Betametasona Base, Dipropionato, Valeriato, Benzoato, Acetato y Dexametasona.

Frente a Estrés Químico.

Solución Estándar.

➤ **Hidrólisis Ácida.**

Pesar la cantidad de 16.1 mg de estándar secundario de Betametasona Dipropionato (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalente a 12.5 mg de Betametasona Base y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, adicionar 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente y adicionar 10 mL de Ácido Clorhídrico 0.1 N, aforar con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto; almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas. Solución N°1.

De la solución anterior tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con



Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

➤ **Hidrólisis Alcalina.**

Pesar la cantidad de 16.1 mg de estándar secundario de Betametasona Dipropionato (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalente a 12.5 mg de Betametasona Base y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, adicionar 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente y adicionar 10 mL de Hidróxido de Sodio 0.1 N, aforar con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto; almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas. **Solución N°1.**

De la solución anterior tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

➤ **Oxidación.**

Pesar la cantidad de 16.1 mg de estándar secundario de **Betametasona Dipropionato** (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalente a 12.5 mg de **Betametasona Base** y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, adicionar 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente y adicionar 10 mL de Peróxido de Hidrogeno 3%, aforar con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto; almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas. **Solución N°1.**

De la solución anterior tomar, con ayuda de una pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferirlo a un balón volumétrico de 25 mL, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Procedimiento y Criterio de Aceptación.

Injectar por triplicado las soluciones anteriormente preparadas y registrar los respectivos cromatogramas.

Comparar los cromatogramas del estándar a condiciones normales con los cromatogramas del estándar sometido a estrés químico y evaluar si el grado de



respuesta del método analítico es únicamente proporcionado por el analito de interés sin interferencias de picos adyacentes sobre la banda de elución principal del pico de Betametasona Dipropionato.

Solución Muestra.

➤ **Hidrólisis Ácida.**

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de crema de Betametasona 0.05%, equivalente a 2.5 mg de Betametasona Base, adicionar 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, adicionar 10 mL de Ácido Clorhídrico 0.1 N, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución anterior por papel filtro de 110 mm de diámetro. Almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas.

Solución N°1.

De la solución anterior tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 µm y llenar los viales.

➤ **Hidrólisis Alcalina.**

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de crema de Betametasona 0.05%, equivalente a 2.5 mg de Betametasona Base, adicionar 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, adicionar 10 mL de Hidróxido de Sodio 0.1 N, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de la solución anterior por papel filtro de 110 mm de diámetro. Almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas.

Solución N°1.

De la solución anterior tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con



Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar los viales.

➤ **Oxidación.**

En un beaker de 250 mL, pesar 5 g de crema de Betametasona 0.05%, equivalente a 2.5 mg de Betametasona Base, adicionar 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, adicionar 10 mL de Peróxido de Hidrogeno 3%, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos.

Filtrar una porción de la solución anterior por papel filtro de 110 mm de diámetro. Almacenar la solución analítica así obtenida a 40°C y 75% de humedad relativa por 72 horas. **Solución N°1.**

De la solución anterior tomar con la ayuda de una pipeta volumétrica una alícuota de 10 mL, transferir a un balón volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente, filtrar una porción de la solución anterior por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar los viales.

Procedimiento y Criterio de Aceptación.

Injectar por triplicado las soluciones anteriormente preparadas y registrar los respectivos cromatogramas.

Comparar los cromatogramas del estándar y muestra a condiciones normales con los cromatogramas de la muestra sometido a estrés químico y evaluar si el grado de respuesta del método analítico es únicamente proporcionado por el analito de interés sin interferencias de picos adyacentes sobre la banda de elución principal del pico de Betametasona Dipropionato.

5.13.4 Estabilidad de la solución Estándar.

Preparar una solución de estándar secundario de Betametasona Dipropionato tal como se indica en el apartado 5.11.1 del presente documento.



Inyectar por hexaplicado la solución preparada anteriormente y registrar sus respectivas áreas y porcentajes recuperados. (Esta lectura corresponde al tiempo cero de prueba).

Almacenar la solución a temperatura ambiente e inyectar por hexaplicado cada solución en el Cromatógrafo a los siguientes tiempos de muestreo y registrar sus respectivas áreas y porcentajes recuperados: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas.

Criterio de Aceptación.

La solución Estándar es estable en la condición de almacenamiento evaluada si el valor de la media para el factor de recuperación se encuentra dentro del rango de $100.00 \pm 2.0\%$.

5.13.5 Estabilidad de la solución Muestra.

Preparar 1 Soluciones Muestra según como se indica en el apartado 5.12.1 del presente documento.

Inyectar por hexaplicado la solución preparada anteriormente y registrar sus respectivas áreas y porcentajes recuperados. (Esta lectura corresponde al tiempo cero de prueba).

Almacenar la solución a temperatura ambiente e inyectar por hexaplicado cada solución en el Cromatógrafo a los siguientes tiempos de muestreo y registrar sus respectivas áreas y porcentajes recuperados: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 horas.

Criterio de Aceptación.

La solución Muestra es estable en la condición de almacenamiento evaluada si el valor de la media para el factor de recuperación se encuentra dentro del rango de $100.00 \pm 3.0\%$.

5.13.6 Repetibilidad.

Sistema.

Preparar una solución estándar a la concentración nominal tal como se indica en el apartado 5.11.1 del presente documento.



Inyectar 10 veces la solución Estándar y registrar sus respectivas áreas.

El análisis de los resultados se realiza mediante el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa e Intervalo de Confianza de los resultados obtenidos.

El análisis debe de ser realizado por un mismo analista en un mismo día en el mismo laboratorio.

Criterio de Aceptación	
Parámetro Evaluado	Especificación
Promedio del % Recuperado	100.00 ± 2.00%
%RSD	% RSD ≤ 2%
Intervalos de confianza de la media.	La media de los porcentajes debe encontrarse dentro del intervalo determinado en el cual se considera que se encuentra el valor verdadero

Método.

Preparar dos soluciones Muestra a la concentración nominal tal como se indica en el apartado 5.12.1 del presente documento e inyectar cada solución por quintuplicado.

Determinar el porcentaje recuperado, la media y coeficiente desviación de los porcentajes recuperados.

El análisis debe ser realizado por un mismo analista y en un mismo día y laboratorio.

El análisis de los resultados se realiza mediante el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa e Intervalo de Confianza de los resultados obtenidos.

Criterio de Aceptación	
Parámetro Evaluado	Especificación
Promedio del % Recuperado	100.00 ± 3.00%
%RSD	% RSD ≤ 3%



Intervalos de confianza de la media.	La media de los porcentajes debe encontrarse dentro del intervalo determinado en el cual se considera que se encuentra el valor verdadero
--------------------------------------	---

Precisión Intermedia.

La realización de este parámetro será realizado por dos analistas durante tres días consecutivos.

Preparar por cada analista y por cada analista tres soluciones muestra tal como se indica en el apartado 5.12.1 del presente documento.

Realizar inyecciones por triplicado de cada solución y por cada analista durante 3 días consecutivos.

Determinar el porcentaje recuperado por día y analista, el porcentaje de desviación estándar relativa y el promedio del porcentaje recuperado para los datos obtenidos por los 2 analistas en los 3 días.

Criterio de Aceptación	
Parámetro Evaluado	Especificación
Promedio del % Recuperado	100.00 ± 3.00%
%RSD	% RSD ≤ 3%

5.13.7 Linealidad y Rango.

Sistema.

El presente parámetro de validación se evaluará en un rango de concentraciones del 80% al 120%; en intervalos de 10%, para un total de 5 puntos.

Pesar las cantidades de 12.9 mg, 14.5 mg, 16.1 mg, 17.7 mg y 19.3 mg de estándar secundario de *Betametasona Dipropionato* (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalentes a 10 mg, 11.25 mg, 12.5 mg, 13.75 mg y 15 mg de *Betametasona Base* y transferirlos de manera independiente a balones volumétricos de 50 mL debidamente rotulados, adicionar aproximadamente 25 mL de Solución



Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente, aforar con Solución Diluyente, agitar manualmente por 30 segundos. **Solución N°1.**

De las soluciones anteriores tomar, con ayuda de pipetas volumétricas, alícuotas de 1 mL y transferirlas de manera independientes a balones volumétricos de 25 mL debidamente rotulados, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Filtrar una porción de las soluciones anteriores por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Concentraciones finales de **Betametasona Base**: 8 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 11 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$.

Realizar el análisis de las muestras en sentido creciente de concentración y realizando inyecciones por triplicado de cada concentración; Realizar este procedimiento 3 veces.

Tabular los resultados obtenidos en los 3 ensayos.

Procesar los resultados obtenidos haciendo uso del programa **EXCEL** y **STATGRAPHICS** y determinar:

- Porcentaje desviación estándar relativa de los Factores de Respuesta.
- Coeficiente de correlación.
- Coeficiente de Determinación.
- Intervalo de confianza para el intercepto.
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto.
- Intervalo de confianza de la pendiente.
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.
- Análisis de varianza ANOVA.
- Test de Cochran.
- Gráfico de residuales.

Criterio De Aceptación	
Parámetro Evaluado	Especificación
%RSD de los factores de respuesta.	% RSD \leq 2%
Coeficiente de Correlación	R \geq 0.99



Coefficiente de Determinación	$R^2 \geq 0.98$
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto.	$t_{exp} < t_{tabla}$
Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$
Análisis de varianza ANOVA	$F_1_{exp} > F1_{tabla}$ $F_2_{exp} < F2_{tabla}$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$
Gráfico de Residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia

Método.

El presente parámetro de validación se evaluará en un rango de concentraciones del 80% al 120%; en intervalos de 10%, para un total de 5 puntos.

Pesar en beakers de 250 mL (debidamente rotulados), las siguientes cantidades de crema de **Betametasona 0.05%**: 8 g, 9 g, 10 g, 11 g y 12 g equivalentes a 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg y 6 mg de **Betametasona Base**, adicionar aproximadamente 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto en cada beaker y programar a 60 ° C la temperatura del agitador magnético, disolver las porciones pesadas de crema por agitación magnética durante 10 minutos.

Transferir el contenido de cada uno de los beakers cuantitativamente a balones volumétricos de 100 mL debidamente rotulado, enfriar a temperatura ambiente,



aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de cada una de las soluciones anteriores por papel filtro de 110 mm de diámetro. **Solución N°1.**

De las soluciones anteriores tomar con la ayuda de pipetas volumétricas alícuotas filtradas de 5 mL, transferirlas a balones volumétricos de 25 mL debidamente rotulados y aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente por 1 minuto, filtrar una porción de las soluciones anteriores por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar los viales.

Concentraciones de **Betametasona Base**: 8 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 11 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$.

Realizar el análisis de las muestras en sentido creciente de concentración y realizando inyecciones por triplicado de cada concentración.

Realizar este procedimiento 3 veces.

Tabular los resultados obtenidos en los 3 ensayos.

Realizar el mismo tratamiento estadístico indicado para Linealidad del Sistema. Ver criterios de aceptación para Linealidad del Sistema excepto.

Criterios de Aceptación	
Parámetro Estadístico	Especificación
Porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de Respuesta.	$\text{RSD} \leq 3\%$

5.13.8 Exactitud del Sistema.

Para la evaluación de la Exactitud del Sistema se trabajará con 3 niveles de concentración 80%, 100% y 120%.

Procedimiento.



Pesar las cantidades de 12.9 mg, 16.1 mg y 19.3 mg de estándar secundario de **Betametasona Dipropionato** (ajustar la pureza si es menor del 100%), equivalentes a 10 mg, 12.5 mg y 15 mg de **Betametasona Base** y transferirlos de manera independiente a balones volumétricos de 50 mL debidamente rotulados, adicionar aproximadamente 25 mL de Solución Diluyente, disolver por agitación ultrasónica durante 3 minutos, enfriar a temperatura ambiente, aforar con Solución Diluyente, agitar manualmente por 30 segundos. **Solución N°1.**

De las soluciones anteriores tomar, con ayuda de pipetas volumétricas, alícuotas de 1 mL y transferirlas de manera independientes a balones volumétricos de 25 mL debidamente rotulados, aforar hasta volumen con Solución Diluyente, agitar de forma manual por 30 segundos. Filtrar una porción de las soluciones anteriores por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar viales.

Concentraciones finales de **Betametasona Base**: 8 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$.

Realizar el análisis de las soluciones en sentido creciente de concentración y realizando inyecciones por triplicado de cada concentración.

Procesar los resultados obtenidos determinando:

- Porcentaje de recuperación para cada inyección.
- Promedio de los resultados para cada nivel de concentración.
- Porcentaje de Desviación Estándar Relativa.
- Test de Cochran, para averiguar si las variancias de las 3 concentraciones son equivalentes es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.
- Test de Student, si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ significa que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 por lo que la exactitud es correcta.

Criterios de Aceptación	
Parámetro	Especificaciones
% Recuperado	100.00% \pm 2.00%
Test de cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$
Test de t	$T_{\text{exp}} < T_{\text{tabla}}$
% RSD	$\text{RSD} \leq 2\%$



5.13.9 Exactitud del Método.

Para la evaluación de la Exactitud del Método se trabajará a 3 niveles de concentración 80%, 100% y 120%.

Preparación de Solución Placebo Cargado (Exactitud del Método).

Pesar en beakers de 250 mL (debidamente rotulados), 4 g, 5 g y 6 g de Placebo de **Betametasona 0.05 %**, **Crema**; pesar por aparte 5.14 mg, 6.43 mg y 7.72 mg de **Betametasona Dipropionato** (ajustar la pureza si es menor del 100%) equivalentes a 4 mg, 5 mg y 6 mg de **Betametasona Base**, y transferir a los beakers según su orden numérico, adicionar aproximadamente 75 mL de Solución Diluyente, agregar un magneto y programar a 60° C la temperatura del agitador magnético, disolver la porción pesada de crema por agitación magnética durante 10 minutos. Transferir el contenido del beaker cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar a temperatura ambiente, aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente. Sumergir la solución anterior en un baño de hielo y metanol por 10 minutos. Filtrar una porción de las soluciones anteriores por papel filtro de 110 mm de diámetro.

De la soluciones anteriores tomar con la ayuda de pipetas volumétricas alícuotas filtradas de 5 mL, transferir a balones volumétrico de 25 mL y aforar hasta volumen con Solución Diluyente y mezclar manualmente, filtrar una porción de las soluciones anteriores por medio de acrodiscos de 0.45 μm y llenar los viales.

Concentraciones Finales de **Betametasona Base**: 8 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$.

Realizar el análisis de las muestras en sentido creciente de concentración y haciendo inyecciones por triplicado de cada concentración. Las determinaciones deben ser realizadas por un mismo analista.

Criterios de Aceptación	
Parámetro Evaluado	Especificación
% Recuperado	97% - 103%
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$
Test de t	$T_{\text{exp}} < T_{\text{tabla}}$
C. Variación	$CV \leq 3\%$



Limite de Detección y Límite de Cuantificación.

5.13.10 Límite de Detección.

Para estimar el límite de detección, en la metodología analítica para la cuantificación de Betametasona en la crema, se determinara a través del cálculo de la desviación estándar residual (S_r) y la pendiente de la curva de calibración estándar.

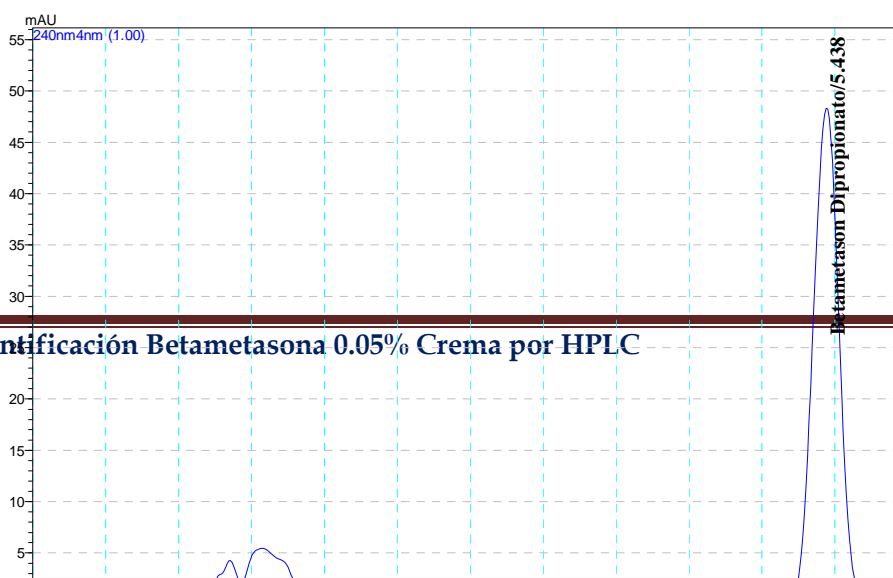
5.13.11 Límite de Cuantificación.

Para estimar el límite de de cuantificación en la metodología analítica para la cuantificación de Betametasona en la Crema se determinara a través de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración estándar.

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

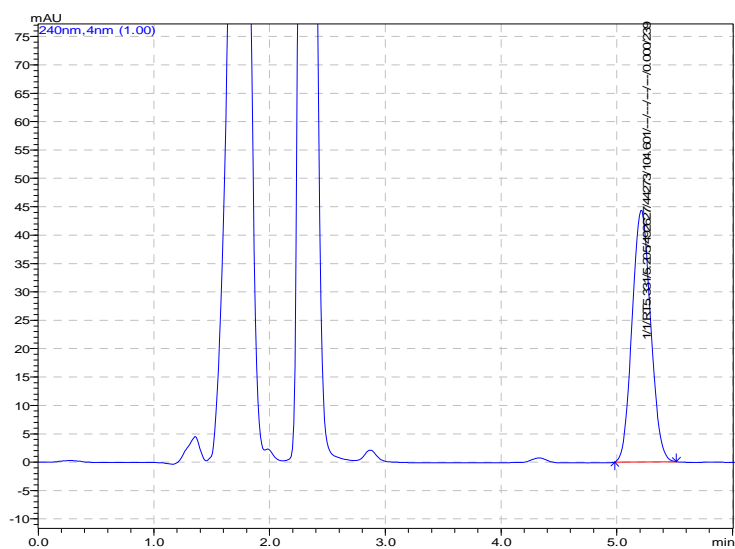
6.1 Identificación.

Para la evaluación del Método de Identificación del principio activo se desarrolló el procedimiento indicado en el apartado 5.11 del presente documento, obteniéndose los siguientes resultados:



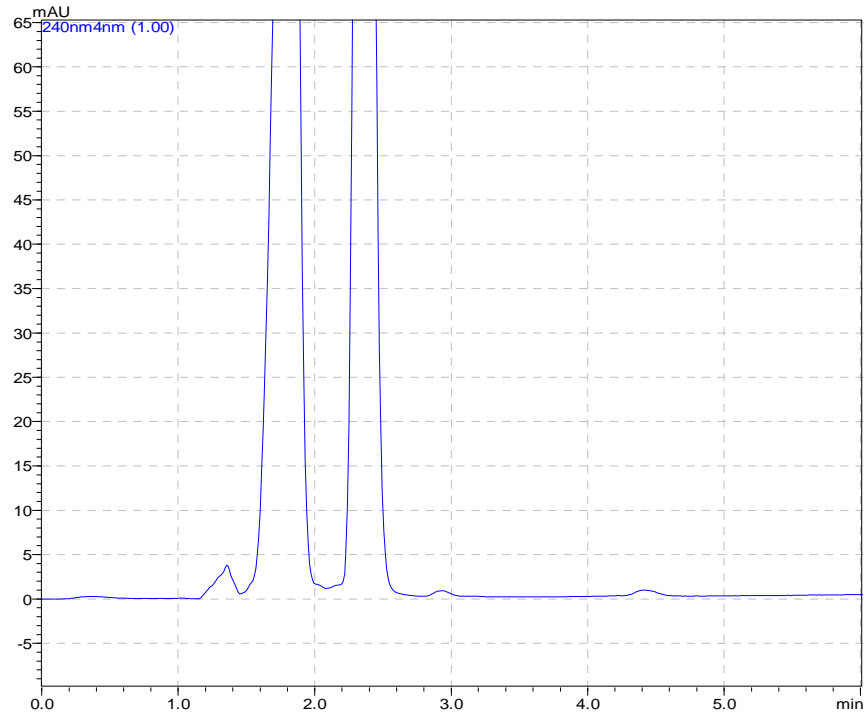


Cromatograma N°1: Cromatograma de la preparación de la solución estándar secundario de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base.

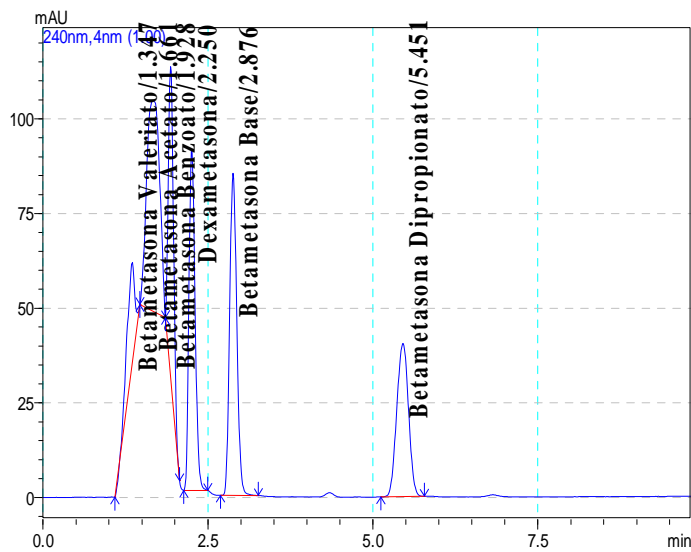




Cromatograma N°2: Cromatograma de la preparación de la solución muestra en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema.



Cromatograma N°3: Cromatograma de la preparación de la solución Placebo en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema.





Cromatograma N°4: Cromatograma de la preparación de la solución mezcla de Corticoides en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema.

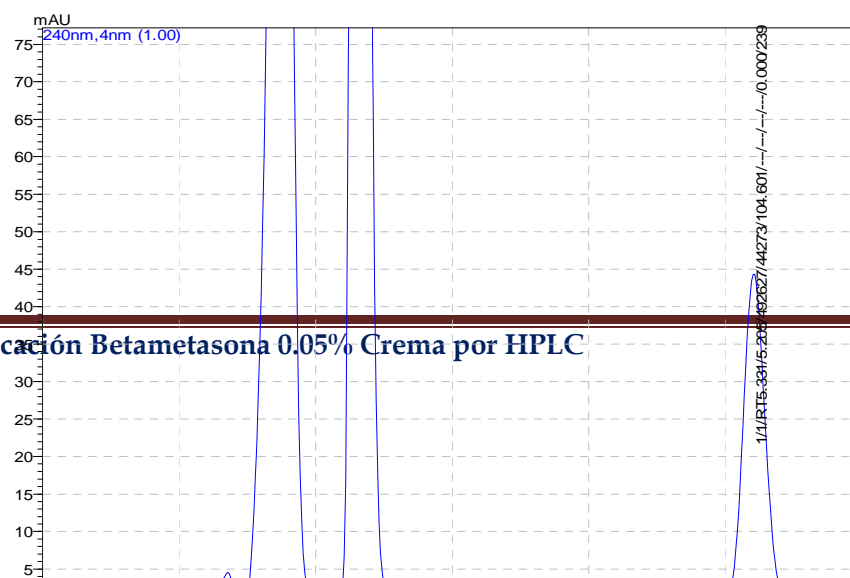
Criterio de Aceptación del Método de Identificación		
Tipo de Solución	Resultados	Especificación
Muestra	Cumple	Identificación Positiva
Placebo	Cumple	Identificación Negativa
Mezcla de Corticoides	Cumple	Identificación Positiva

Análisis

El método de Identificación para el principio activo *Betametasona Dipropionato* equivalente a *Betametasona Base* en el producto *Betametasona 0.05 %, Crema* cumple con los criterios de aceptación establecidos ya que al comparar los cromatogramas obtenidos se demuestra que el tiempo de retención de la banda de elución principal en el cromatograma de la solución muestra (*cromatograma 2*) se corresponde con el tiempo de retención en la banda principal de elución del pico obtenido en el cromatograma de la solución estándar (*cromatograma 1*) y al inyectar una mezcla de esteres de Betametasona (*cromatograma 4*) y su isómero se obtienen resultados satisfactorios ya que la banda de elución principal del pico de Betametasona Dipropionato se corresponde con el tiempo de retención del pico de la solución estándar; y al inyectar una solución placebo (*cromatograma 3*) del producto se demuestra que no existe ninguna elución cercana de los excipientes en la banda de elución principal de la Betametasona Dipropionato; por lo cual se demuestra que el método es capaz de identificar el principio activo de interés en la formulación en presencia de sustancias interferentes.

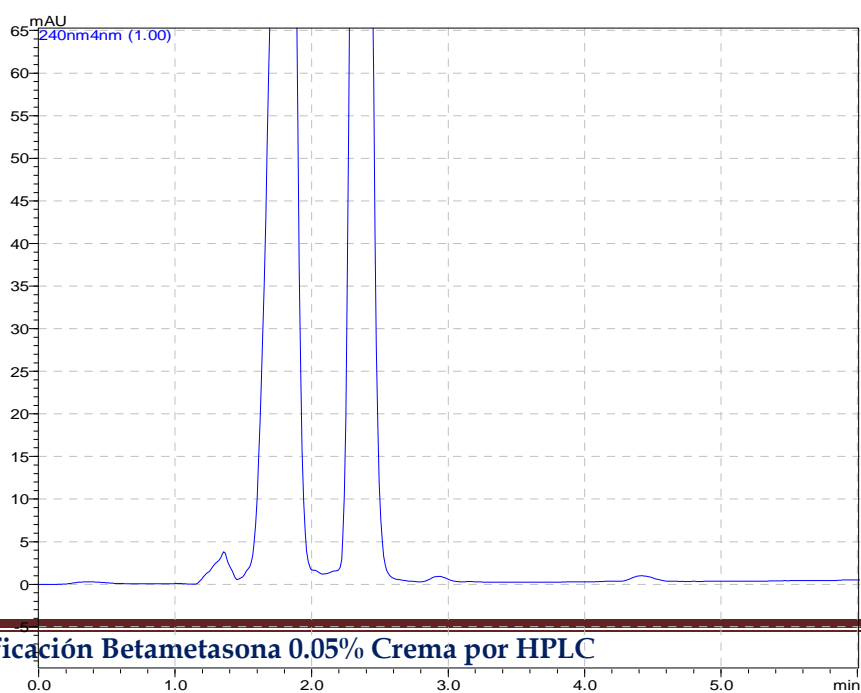
6.2 Selectividad Frente Excipientes.

Se evaluó la influencia del placebo (excipientes o matriz) en la determinación del principio activo contenido en la crema, tal como se muestra en los cromatogramas.



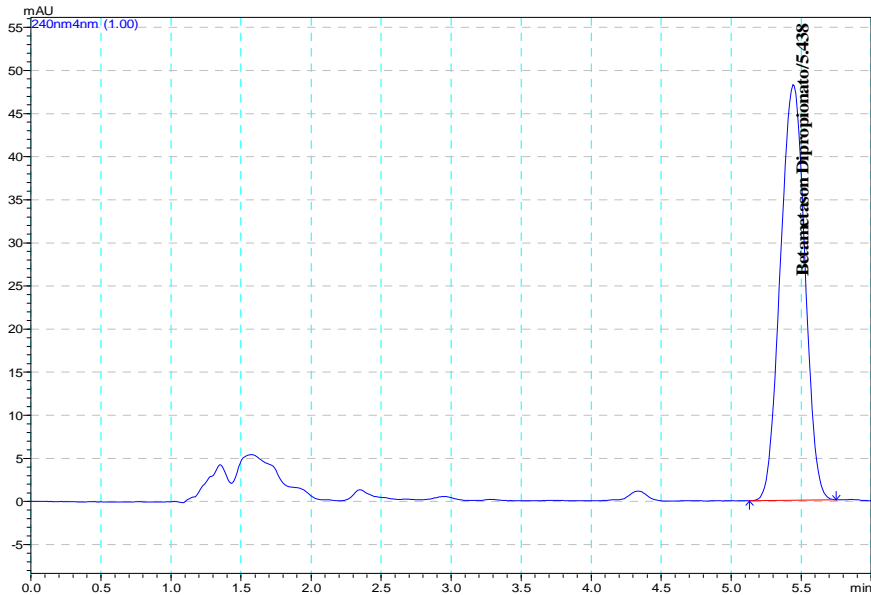


Cromatograma N°5: Cromatograma de la preparación de la solución muestra en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema

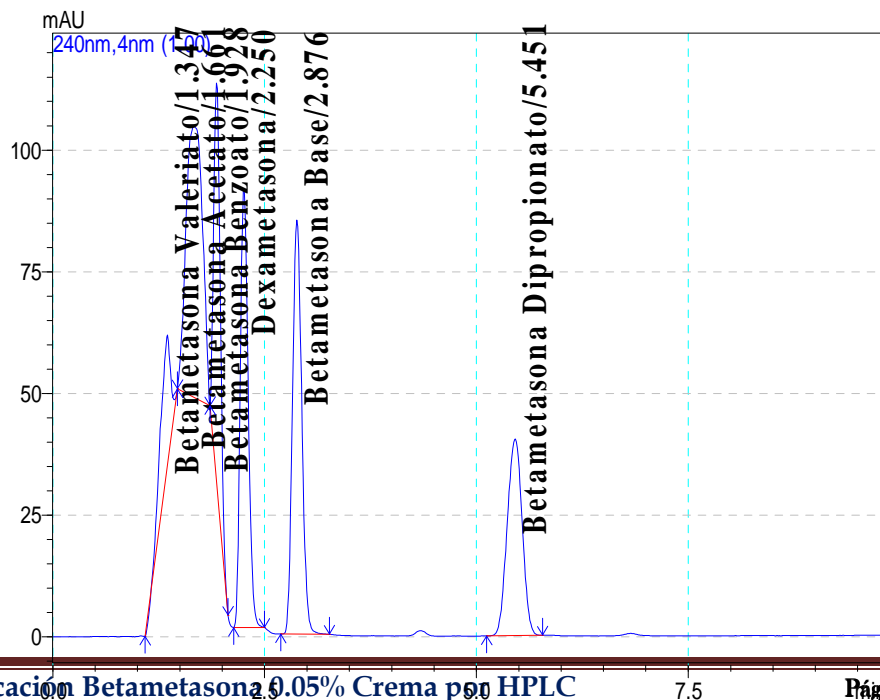




Cromatograma N°6: Cromatograma de la preparación de la solución Placebo en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema.



Cromatograma N°7: Cromatograma de la preparación de la solución estándar secundario de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base.





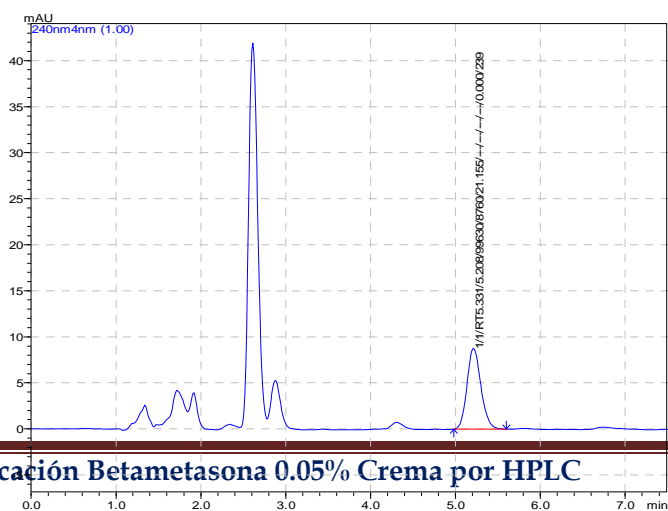
Cromatograma N°8: Cromatograma de la preparación de la solución mezcla de Corticoides en la determinación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base en el Producto Betametasona 0.05 % Crema.

Análisis

En los cromatogramas anteriores se observa que el placebo o matriz de excipientes no interfiere en la banda de elución principal del pico principal en el cromatograma de la solución muestra de Betametasona Dipropionato, y de igual manera se demuestra que el tiempo de retención en la banda de elución del pico principal en el cromatograma de la solución estándar se corresponde con el tiempo de retención en la banda de elución principal en los cromatogramas de la preparación de la solución muestra y mezcla de corticoides respectivamente; por lo que se demuestra que el método analítico es capaz de discriminar cualquier influencia ya sea por excipientes o sustancias con estructura similar en la determinación cuantitativa del principio activo de interés.

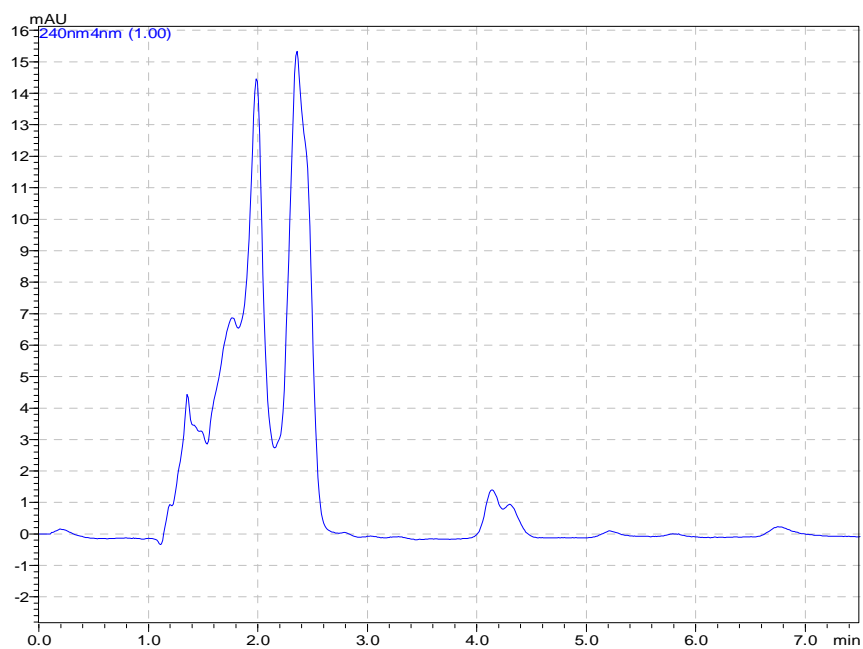
Estrés Químico.

En este parámetro se evaluaron la influencia ejercida de las soluciones estándar y muestra expuestas a diferentes tipos de agentes degradantes tal y como se demuestra en los siguientes cromatogramas.

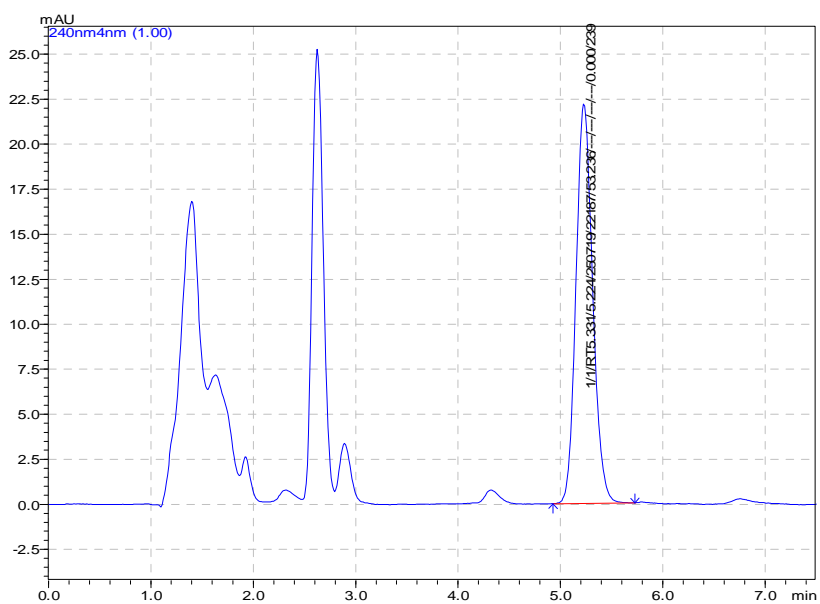




Cromatograma N°9: Cromatograma de la preparación de la solución estándar sometida a hidrólisis ácida (HCl 0.1 N).

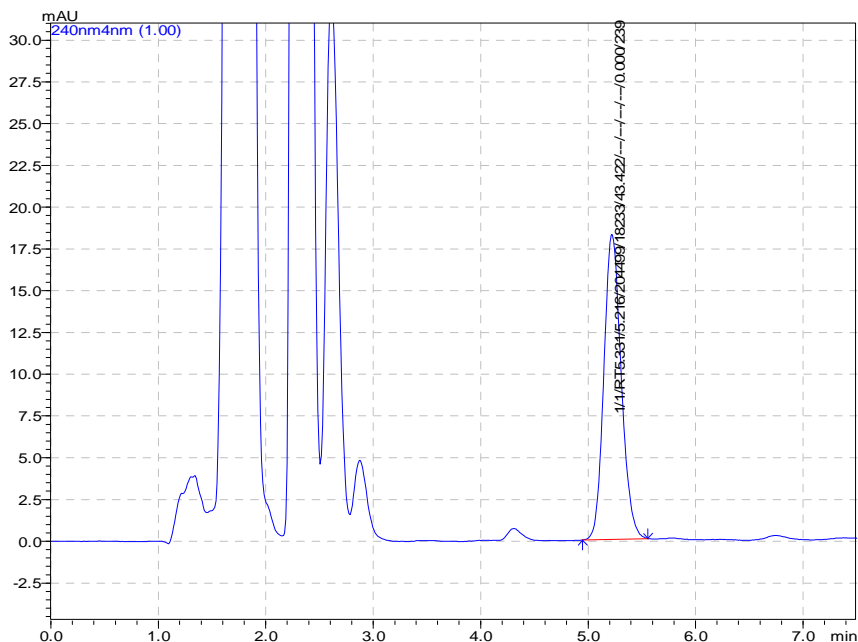


Cromatograma N°10: Cromatograma de la preparación de la solución estándar sometida a hidrólisis alcalina (NaOH 0.1 N).

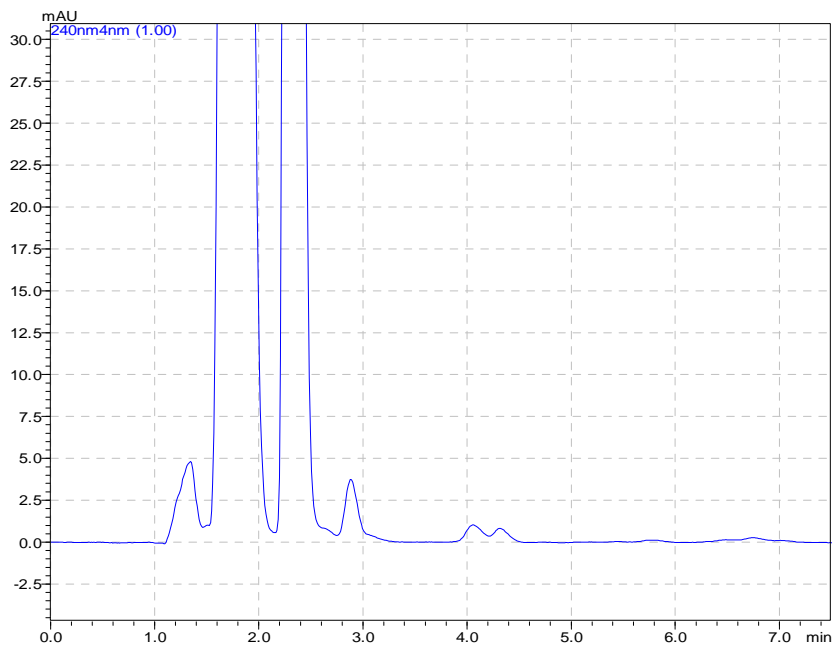




Cromatograma N°11: Cromatograma de la preparación de la solución estándar sometida a oxidación (H_2O_2 3%).

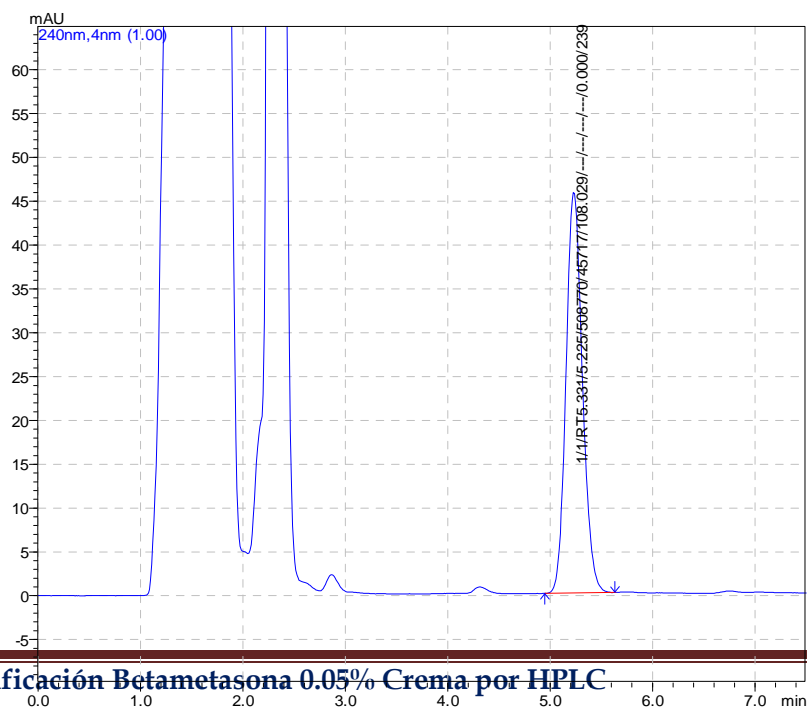


Cromatograma N°12: Cromatograma de la preparación de la solución muestra sometida a hidrólisis ácida (HCl 0.1 N).





Cromatograma N°13: Cromatograma de la preparación de la solución muestra sometida a hidrólisis alcalina (NaOH 0.1 N).





Cromatograma N°14: Cromatograma de la preparación de la solución muestra sometida a oxidación (H₂O₂ 3%).

Conclusión.

En los cromatogramas anteriores se demuestra que el método es selectivo ya que al someter tanto las soluciones estándares y muestra se demuestra que cuando se degrada la molécula los productos de degradación no interfieren en la banda de elución principal en el cromatograma de la preparación de la solución estándar y muestra tanto para el tratamiento ácido como también el medio oxidante con peróxido de hidrógeno, mientras que para la hidrólisis alcalina se demuestra que la molécula se degrada totalmente y según los cromatogramas obtenidos dichos compuestos de degradación no interfieren con la banda de elución por lo que el método es selectivo aun en presencia de sus propios metabolitos de degradación.

6.3 Idoneidad del Sistema.

Para la determinación del presente parámetro se siguió el procedimiento descrito en el apartado 5.13.1 del presente documento, obteniéndose los siguientes resultados en la siguiente tabla:

Idoneidad del Sistema del Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base.

N° de Soluciones	N° de Inyecciones	Conc. Empleada (µg/mL)	Tiempo de Retención	Áreas	Altura	Factor de Capacidad	Número de Platos Teóricos	Factor de Simetría
1	1	10	5.345	482415	2231	5.549	5180.284	1.108
	2	10	5.34	482515	2219	5.543	5083.684	1.094
	3	10	5.349	482378	2238	5.548	5128.305	1.092
	4	10	5.344	483905	2251	5.534	5316.872	1.111
	5	10	5.341	484649	2250	5.530	5234.420	1.108
2	1	10	5.344	488416	2257	5.541	5157.682	1.090



Facultad de Ciencias Químicas

	2	10	5.354	489208	2208	5.536	5429.738	1.120
	3	10	5.333	489187	2232	5.554	5129.929	1.126
	4	10	5.335	489421	2249	5.519	5263.779	1.118
	5	10	5.349	490093	2221	5.565	5311.929	1.098
3	1	10	5.337	487571	2226	5.535	5235.212	1.109
	2	10	5.358	488548	2214	5.547	5407.005	1.098
	3	10	5.383	484480	2212	5.534	5440.551	1.097
	4	10	5.365	485436	2223	5.512	5176.760	1.106
	5	10	5.359	487334	2225	5.543	5264.97	1.099
Promedio			5.35	486370.40	2230.39	5.539	5250.74	1.10
Desviación estándar			0.0132	2807.9249	3.9962	0.0133	112.7814	0.0108
%RSD			0.25	0.58	0.69	0.24	2.15	0.97

Conclusión.

A como se muestra en la tabla anterior el sistema (reactivos, analista, sistema cromatográfico, equipos) es idóneo para la determinación cuantitativa del principio activo de interés ya que se obtuvieron tiempos de retención reproducibles (%RSD $T_r = 0.25\%$), número de platos teóricos (5250.74), factor de simetría (1.10) y factor de capacidad (5.539) dentro del criterio de aceptación establecido lo que demuestra que el sistema cromatográfico separa de forma eficiente el analito de interés por lo que se adecua de forma idónea a las condiciones de análisis propuestas.

Al comparar las señales cuantitativas del sistema cromatográfico (áreas y altura de picos), se demuestra que las áreas es la señal idónea para la cuantificación del analito de interés debido a que presenta una mayor reproducibilidad (%RSD áreas = 0.58%).

Criterio De Aceptación Para Idoneidad Del Sistema Del Método De Cuantificación



Parámetros	Especificación	Datos experimentales	Cumplimiento (C/NC)
%RSD Áreas	$\leq 2\%$	0.58%	C
%RSD Tr	% RSD $\leq 3\%$	0.25%	C
Promedio T	0.8 – 2.0	1.10	C
Promedio N	>2000	5250.74	C
Factor de Capacidad	$2.0 \leq k_s \leq 20$	5.539	C

6.4 Robustez.

La robustez fue evaluada mediante cambios en las condiciones de análisis tales como: longitud de onda, variación de proporción de solventes orgánicos en la fase móvil, flujo, obteniéndose los siguientes resultados.

Parámetro de Robustez del Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base.

Nº de Inyección	Nº de Experimento	Condiciones de Análisis	$\mu\text{g/ml}$	%R	Tr	k_s	R_s	N	T
1	1	Flujo = 1 mL, Fase móvil Org= 68, $\lambda=240$ nm	10	100.84	5.35	5.235	3.84	5180.28	1.11
2				101.48	5.34	5.654	3.86	5083.68	1.09
3				100.53	5.35	5.354	3.85	5128.31	1.09
1	2	Flujo = 0.9 mL, Fase Móvil org = 66, $\lambda=238$ nm	10	102.72	6.37	6.235	3.95	5708.65	1.1
2				102.52	6.35	6.69	3.98	5752.17	1.09
3				102.54	6.36	6.83	3.99	5648.86	1.08
1	3	Flujo = 0.9 mL, Fase Móvil org = 66, $\lambda=242$ nm	10	98.39	6.37	6.46	3.94	5706.01	1.1
2				100.34	6.35	6.7	3.98	5747.11	1.09
3				100.35	6.36	6.6	3.94	5643.77	1.08
1	4	Flujo = 1.1 mL,	10	103.85	5.25	4.35	3.62	4771.35	1.08



2		Fase Móvil org= 66, $\lambda=238$ nm		103.66	5.23	4.34	3.6	4773.17	1.11
3				103.4	5.24	4.31	3.65	4853.61	1.08
1	5	Flujo = 1.1 mL, Fase Móvil org= 66, $\lambda=242$ nm	10	98.67	5.25	4.35	3.62	4771.35	1.08
2				98.58	5.23	4.68	3.58	4772.18	1.11
3				98.4	5.24	4.47	3.66	4850.48	1.08
1	6	Flujo = 0.9 mL, Fase Móvil org = 70, $\lambda=238$ nm	10	102.35	5.22	6.24	2.93	5210.91	1.11
2				102.71	5.22	6.92	2.93	5250.53	1.11
3				102.23	5.22	6.22	2.93	5192.91	1.11
1	7	Flujo = 0.9 mL, Fase Móvil org = 70, $\lambda=242$ nm	10	102.24	5.22	5.2	2.94	5212.11	1.11
2				102.2	5.22	5.79	2.92	5251.77	1.11
3				102.34	5.22	5.15	2.92	5194.04	1.11
1	8	Flujo = 1.1 mL, Fase Móvil org = 70, $\lambda=238$ nm	10	102.7	4.27	4.54	2.69	4457.01	1.1
2				103.87	4.29	4.65	2.73	4669.83	1.11
3				103.75	4.29	4.47	2.76	4707.3	1.1
1	9	Flujo = 1.1 mL, Fase Móvil org = 70, $\lambda=242$ nm	10	98.3	4.27	4.86	2.67	4458.72	1.1
2				98.16	4.29	4.86	2.67	4667.31	1.11
3				98.86	4.29	4.76	2.67	4706.64	1.1
Promedio				101.33	5.28	5.246	3.36	5087.78	1.1
Desviación Estándar				1.98	0.71	1.95	0.52	408.06	0.01
Porcentaje de desviación estándar relativa				1.95	13.41	3.32	15.53	8.02	1.15

Conclusión.

En la tabla anterior se obtienen los resultados para la estimación de la robustez del método, lo cual se demuestra que el método es robusto cuando se realizan cambios en la metodología nominal del método; ya que el porcentaje recuperado promedio y por cada factor de cambio se mantuvo dentro del criterio de aceptación establecido y los parámetros Cromatográficos (N, Rs, ks y T) que garantiza que el sistema de elución del analito sea eficiente se mantuvieron dentro del criterio de aceptación establecido tanto en cada experimento como el promedio de todos los experimentos, por lo que se concluye que el método es robusto.

Criterio De Aceptación Para la Robustez Del Método De Cuantificación			
Parámetros	Especificación	Datos experimentales	Cumplimiento (C/NC)
Promedio %R	100.00 \pm 3.00%	101.33%	C



%RSD %R	% RSD. ≤ 3%	1.95%	C
Promedio T	0.8 – 2.0	1.10	C
Promedio N	>2000	5087.78	C
Promedio ks	$2.0 \leq ks \leq 20$	5.246	C
Promedio Rs	$Rs \geq 2.00$	3.39	C

6.5 Estabilidad del Sistema.

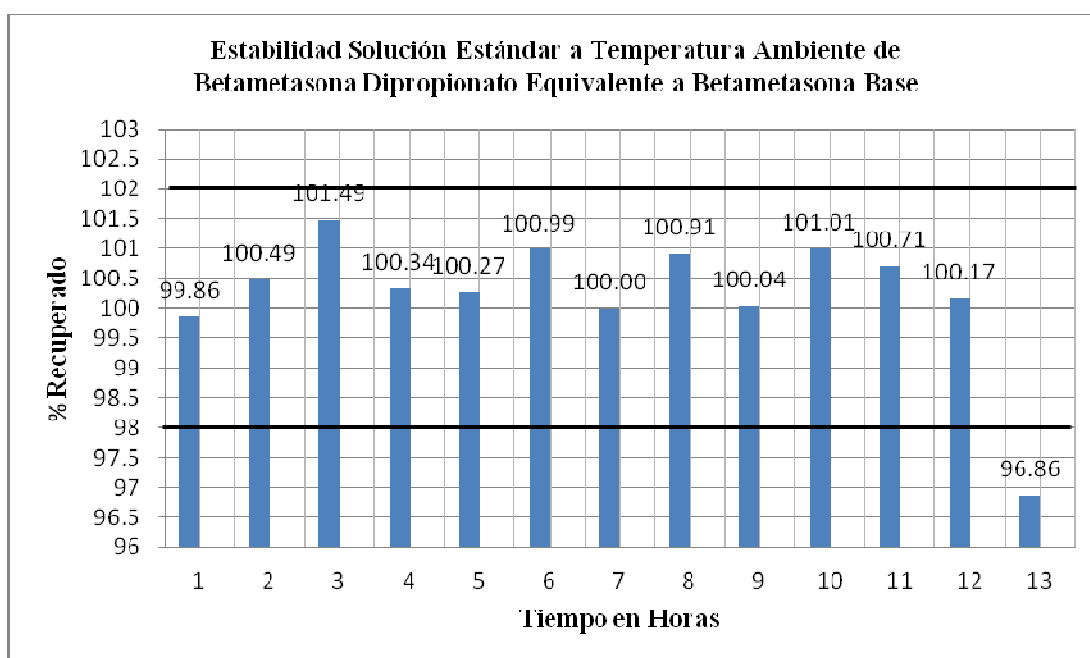
La estabilidad del sistema se determino siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.13.4 del presente documento obteniéndose los siguientes resultados agrupados en la siguiente tabla y grafico.

Soluciones Trabajo	N° de Inyecciones	TIEMPO EN HORAS												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solución estándar a temperatura ambiente	1	99.64	100.42	101.63	99.76	98.98	101.44	99.82	101.23	99.23	101.12	100.48	99.28	96.98
	2	99.56	99.67	101.57	99.52	100.47	101.12	100.12	100.75	99.90	100.63	100.62	100.07	96.90
	3	100.19	100.84	101.98	100.31	101.49	101.58	99.35	101.26	100.06	101.66	100.88	99.79	97.07
	4	100.01	100.51	101.27	100.71	99.98	100.34	100.25	100.26	101.25	101.68	100.03	101.13	96.55
	5	100.21	100.02	101.24	99.18	100.88	101.09	100.60	100.71	100.37	100.63	102.56	99.24	96.12
	6	99.55	101.45	101.24	102.56	99.81	100.35	99.88	101.26	99.41	100.33	99.68	101.52	97.52
t-Student	Valor Crítico	2.57	2.12	9.86	2.02	1.41	5.01	0.70	4.41	0.74	5.84	2.47	0.69	10.23
F-Fisher	Valor Crítico	0.20	0.25	1.09	0.07	0.13	0.35	0.54	0.59	0.19	0.30	0.10	0.11	0.43
F-ANOVA	Valor Crítico	5.32	2.97	55.98	0.81	3.32	12.26	0.28	15.48	0.79	11.34	2.66	0.99	121.39

Conclusión.



La comparación estadística de las varianzas y la media de los porcentajes recuperados de las soluciones estándares en cada tiempo en comparación con el tiempo inicial (hora 0), arrojo diferencias significativas a las dos horas de muestreo ya que el valor calculado en la t-student es mayor que el valor crítico, esto se verifico contrastando los porcentajes recuperados en cada tiempo de análisis el cual demuestra que a la primera hora de muestreo los porcentajes obtenidos son significativamente diferentes a los porcentajes obtenidos al tiempo inicial de análisis ya que el valor calculado de F-fisher a la primera hora es mayor que el F-fisher crítico con un nivel de confianza del 95%, por lo cual por medio de un análisis de varianza se demuestra que a las dos horas de muestreo los porcentajes obtenidos son afectados significativamente por el tiempo de muestreo debido a que el valor de F de ANOVA es mayor que el F de ANOVA crítico; sin embargo al observar el grafico que a continuación se presenta se demuestra que la solución estándar de trabajo se mantiene estable durante las primeras 10 horas de muestreo ya que el valor del porcentaje recuperado se mantiene dentro del rango de $100.00\% \pm 2.00\%$, no así la muestra a las 12 horas por lo cual aunque estadísticamente el valor de los porcentajes recuperados es afectada por el paso del tiempo las soluciones son estable y se recomienda utilizarlas durante las primeras 10 horas después de preparadas.





6.6 Estabilidad del Método.

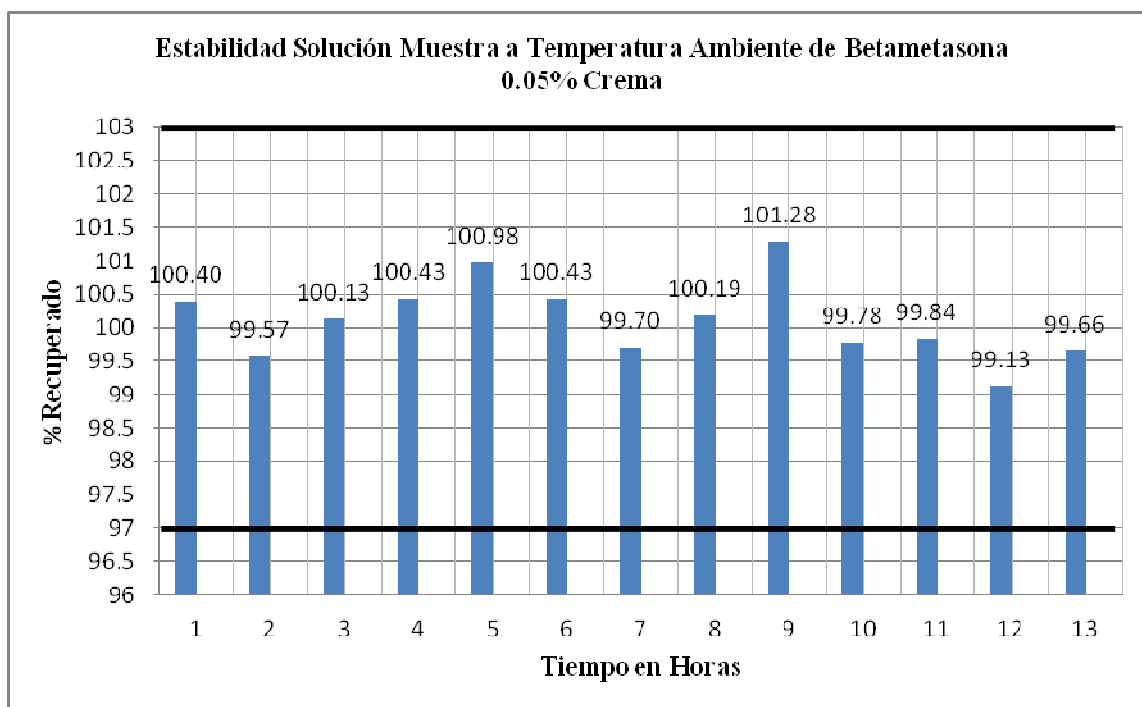
La estabilidad del método se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.13.5 del presente documento obteniéndose los siguientes resultados agrupados en la siguiente tabla y gráfico.

Soluciones Trabajo	N° de Inyecciones	TIEMPO EN HORAS												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solución estándar a temperatura ambiente	1	99.86	98.60	100.55	101.87	101.77	102.46	97.45	99.94	101.64	98.85	99.36	98.08	97.88
	2	98.99	99.25	97.53	99.51	99.72	100.41	99.77	99.82	99.77	101.96	100.13	100.00	99.58
	3	102.76	101.35	103.28	99.40	102.37	98.18	100.93	101.39	102.70	100.13	99.57	101.10	99.75
	4	101.21	98.39	99.16	98.29	99.78	100.20	100.28	99.83	103.05	98.01	99.30	96.94	102.09
	5	98.60	99.40	101.21	100.84	101.36	101.00	98.48	98.81	101.13	100.65	99.04	99.93	100.41
	6	100.95	100.42	99.07	102.65	100.86	100.33	101.30	101.34	99.43	99.06	101.66	98.70	98.24
t-Student	Valor Crítico	2.57	1.56	0.35	0.03	0.92	0.03	1.35	0.54	1.46	0.60	0.80	1.47	0.87
F-Fisher	Valor Crítico	0.20	1.91	0.60	0.88	2.10	1.26	1.10	2.41	1.10	1.19	2.60	1.06	1.03
F-ANOVA	Valor Crítico	5.32	1.11	0.06	0.00	0.57	0.00	0.63	0.07	1.03	0.52	0.55	2.06	0.68

Conclusión.



La comparación estadística de las medias en cada tiempo de muestreo no arroja diferencia significativa con respecto al tiempo de muestreo inicial ya que el t-student calculado para cada tiempo de muestreo con respecto al tiempo cero no arroja diferencias estadísticas significativas sin embargo al comparar las varianzas de cada tiempo con respecto al tiempo inicial se encontró diferencias significativas a la primera hora de muestreo por lo que los datos obtenidos son diferentes a los datos obtenidos al tiempo inicial, esto se contrasto con un análisis de varianza el cual los datos obtenidos demuestran que no hay diferencias significativas según el tiempo de muestreo ya que el valor de F de ANOVA es menor que el F de ANOVA critico y al observar el grafico que se presenta a continuación se demuestra que la solución muestra se mantiene estable durante todo el tiempo prueba ya que los porcentajes recuperados calculados se encuentran dentro del criterio de aceptación establecido.



6.7 Precisión.

6.7.1 Repetibilidad Sistema.

El presente parámetro se realizó preparando una Solución Estándar a la concentración nominal tal como se indica en el apartado 5.13.6 del siguiente documento y efectuando 10 inyecciones consecutivas, mostrándose los valores obtenidos en la siguiente tabla.



Tabla de Repetibilidad del Sistema del Método de Cuantificación.

Nº de Inyecciones	Porcentaje recuperado
1	98.1480
2	98.0637
3	98.5971
4	98.2373
5	98.4556
6	98.3370
7	98.4885
8	98.8315
9	98.8454
10	99.1987
Promedio	98.5203
Desviación estándar	0.3551
% RSD.	0.3604
Valor máximo	99.1986



Valor mínimo	98.0637	
Rango	1.1349	
Intervalo de confianza	Superior	98.7743
	Inferior	98.2663

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación estadística de la repetibilidad del Sistema se comprueba que el sistema es preciso y tiene una buena repetibilidad ya que el promedio de los resultados **98.52%** se encuentra dentro del criterio de aceptación (98% - 102%), el Porcentaje de desviación estándar relativa **0.36%** es menor al 2%; y el valor promedio de los datos se encuentra dentro del intervalo de confianza para la media en el intervalo entre **98.27% – 98.77 %**.

Criterio De Aceptación De Repetibilidad Del Sistema Del Método De Cuantificación			
Parámetro	Especificación	Datos Experimentales	Declaración de la Prueba
Porcentaje recuperado	100.00% ± 2%	98.52%	CUMPLE
%RSD	≤ 2%	0.36%	CUMPLE
Intervalo de confianza	La media de los resultados debe encontrarse entre 98.27% – 98.77% .	98.52%	CUMPLE

6.8 Repetibilidad del Método.

Para la evaluación estadística de este parámetro se prepararon 2 soluciones de muestra a la concentración nominal tal como se indica en el apartado 5.13.6 del presente documento, cada muestra se inyectó en el cromatografo por quintuplicado obteniéndose los siguientes resultados copilados en la siguiente tabla.



Tabla de Repetibilidad del Método de Cuantificación Betametasona 0.05% Crema.

Nº de Soluciones	Nº de Inyecciones	Porcentaje Recuperado
Solución N° 1	1	98.6026
	2	98.3561
	3	99.0768
	4	99.1791
	5	99.1833
Solución N° 2	6	100.6979
	7	100.4298
	8	100.5178
	9	100.5234
	10	100.6747
Promedio		99.7242
Desviación estándar		0.9284
% RSD		0.9309
Valor mínimo		98.3561



Valor máximo	100.6979	
Rango	2.3418	
Intervalo de confianza	Superior	100.3882
	Inferior	99.0601

Tal como se muestra en la tabla anterior el %RSD es menor del 3% por lo que el método para cuantificar Betametasona es reproducible; los porcentajes recuperados para cada inyección se encuentra dentro del criterio de aceptación y el promedio de los porcentajes se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido.

Criterio De Aceptación De Repetibilidad Del Método Para Método De Cuantificación			
Parámetro	Especificación	Datos Experimentales	Declaración de la Prueba
Porcentaje Promedio	100.00% ± 3%	99.72%	CUMPLE
%RSD	≤ 2%	0.93%	CUMPLE
Intervalo de confianza	La media de los porcentajes debe encontrarse dentro del intervalo 99.06% – 100.39% .	99.72%	CUMPLE

6.9 Precisión Intermedia.

El presente parámetro se llevó a cabo preparando tres soluciones Muestra a la concentración nominal tal como se establece en el apartado 5.13.6 del presente documento, efectuando inyecciones por triplicado de cada solución.

El análisis fue realizado por dos analistas por 3 días consecutivos, presentando los siguientes resultados.



Tabla de Porcentajes Recuperados Precisión Intermedia Método de Cuantificación.

N° de soluciones	Analista N° 1			Analista N° 2		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
Solución 1	100.0211	101.4661	97.1877	101.9881	97.2925	97.4642
	100.6755	101.8074	97.1050	101.1018	97.8059	97.3057
	99.7080	101.2864	97.0746	101.4696	97.2942	98.2235
Solución 2	99.6644	101.2488	97.1073	101.1669	97.3669	98.8210
	99.4781	101.4315	97.3083	101.0563	97.5411	100.6759
	99.9018	100.9630	97.2915	101.6258	97.7339	100.4938
Solución 3	99.7791	101.1155	97.3519	100.5760	97.1506	100.0133
	100.1963	100.6315	97.3279	100.9070	97.6509	101.0773
	100.0174	101.6622	97.5512	101.7173	97.8544	100.3083
Media Total Por Analista	99.4948			99.3956		
Media Total	99.4452					
S Por Analista	1.7331			1.7835		



% RSD por Analista	1.7419	1.7943
% RSD Total	1.7681	

Según el tratamiento estadístico aplicado a los resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de Precisión Intermedia se observa que el método tiene una precisión correcta ya que el valor del % RSD (**1.77 %**) para los 2 analistas en los 3 días cumplió con el criterio establecido ($\leq 3\%$) por lo que el método es reproducible durante los días y cambio de analista.

Criterio De Aceptación Para Precisión Intermedia Del Método De Cuantificación			
Parámetro a evaluar	Especificación	Datos experimentales	Declaración Prueba
%RSD	$\leq 3\%$	1.77 %	CUMPLE
% Recuperado Promedio	100.00% \pm 3%	99.45 %	CUMPLE

6.10 Linealidad del Sistema.

Para la evaluación de la Linealidad del Sistema se desarrollaron 3 curvas de acuerdo al procedimiento establecido en el apartado 5.13.7 del presente documento y se realizó el tratamiento estadístico de las 3 curvas obteniéndose los siguientes resultados resumidos en las siguientes tablas



Resumen del tratamiento estadístico de la Linealidad del Sistema.

Nivel de Concentración	Concentración $\mu\text{g/mL}$ (x)	Áreas promedio 3 curvas (y)	Promedio	Factor de respuesta (y/x)
80%	8	386630.33	391972.7778	48328.7917
80%	8	394462.67	391972.7778	49307.8333
80%	8	394825.33	391972.7778	49353.1667
90%	9	435391.67	439730.3333	48376.8519
90%	9	438268.00	439730.3333	48696.4444
90%	9	445531.33	439730.3333	49503.4815
100%	10	484161.33	488512.8889	48416.1333
100%	10	487626.33	488512.8889	48762.6333
100%	10	493751.00	488512.8889	49375.1
110%	11	532784.67	535296.7778	48434.9697
110%	11	536912.33	535296.7778	48810.2121
110%	11	536193.33	535296.7778	48744.8485
120%	12	579747.00	582374.2222	48312.25
120%	12	587280.33	582374.2222	48940.0278



120%	12	580095.33	582374.2222	48341.2778
------	----	-----------	-------------	------------

Resumen Estadístico del Análisis de Regresión Lineal.

Coefficiente de correlación **r: 0.99.**

Promedio del Factor de Respuesta **f=48780.27**

Coefficiente de determinación **r²: 0.99.**

Porcentaje Desviación Estándar Relativa % RSD_f= **0.87.**

Ecuación de Regresión: **Y= 47636.93 X + 11208.07.**

Linealidad del Sistema de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base (3 curvas promediadas).

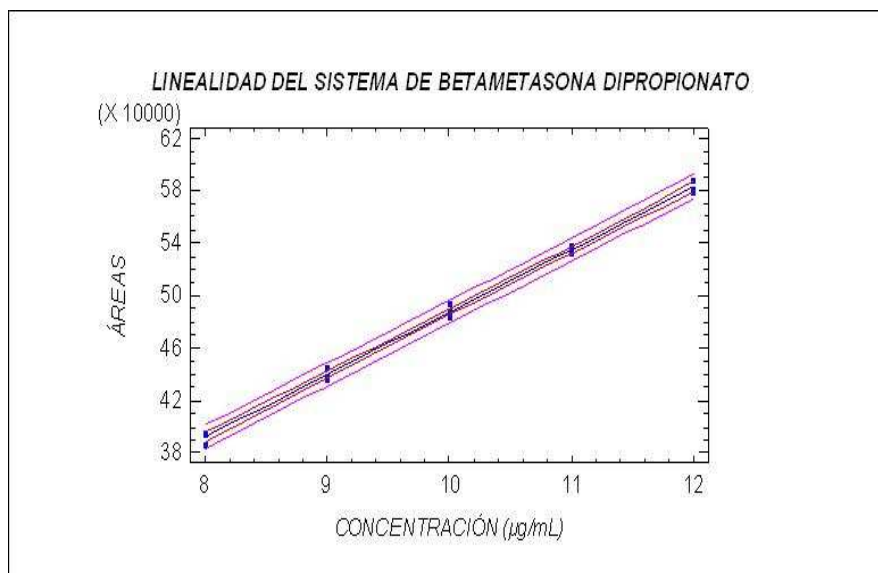


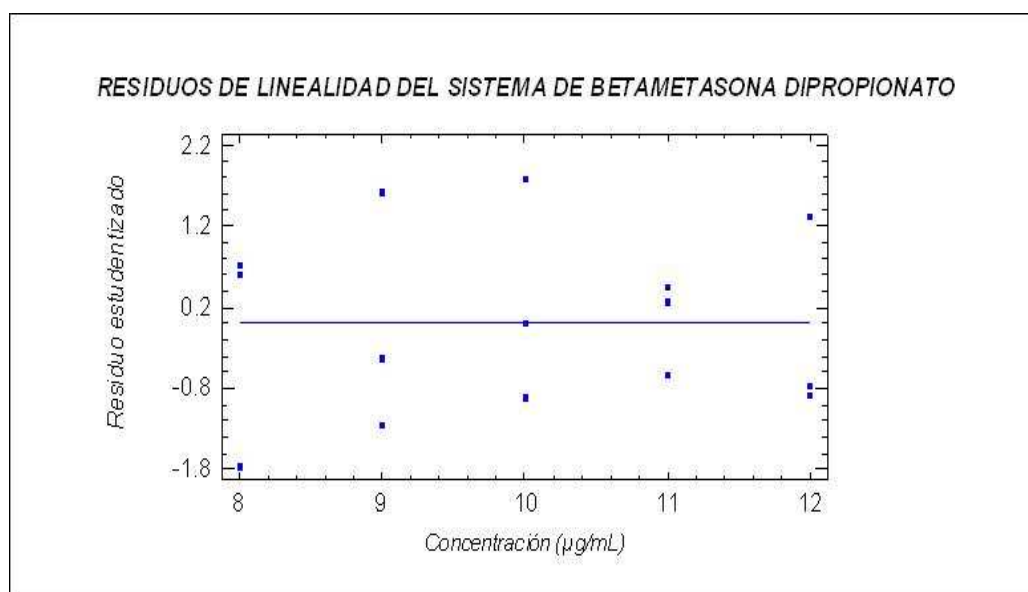
Tabla de Significación Estadística de la Pendiente y del Intercepto (Prueba t de Student)

Variable	Valor	Error	t _{tab.}	t _{Exp.}	Min.	Máx.	Especificación	Observación
----------	-------	-------	-------------------	-------------------	------	------	----------------	-------------



		Típico						
Intercepto (a)	11208.07	7129.18	2,16	1.57	-4193.81	26609.94	t tabla > t exp ; el intervalo debe incluir el cero	Incluye el cero
Pendiente (b)	47636.93	705.89	2,16	67.48	46111.92	49161.95	t tabla < t exp ; el intervalo no debe incluir el cero	No incluye el cero

Residuos para Linealidad del Sistema del Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base.



Homogeneidad de Variancias

	Valor G Experimental	Valor G Tabulado	Especificación
Prueba G de Cochran		0,68	Si $G_{exp} < G_{tabla}$, las variancias de las concentraciones



	0.31		son homogéneas.
--	------	--	-----------------

Análisis de la Variancia: ANOVA.

	Suma de Cuadrados	g.l	Varianza	F _{experimental}	F _{tabla}	Especificación
Regresión	68078322522	1	68078322522	4554.17	4.67	F _{1exp} > F _{1tabla} , demuestra que la pendiente es distinta de cero
Residual	194331486.1	13	14948575.86			
Falta de Ajuste	3789189.615	3	1263063.205	0.07	3.71	F _{2exp} < F _{2tabla} , los datos obtenidos se ajustan al modelo de regresión lineal
Error Experimental	190542296.5	10	19054229.65			
Total	68272654008	14	4876618143			

Conclusión:

La **Linealidad del Sistema** para Betametasona Dipropionato se verificó en un rango de concentración de 80% a 120% correspondiente al intervalo de concentraciones de 8 µg/mL – 12 µg/mL.

Al aplicar el análisis de regresión al promedio de los datos obtenidos en las 3 curvas se obtuvo una ecuación de la recta correspondiente a **Y= 47636.93 X + 11208.07**, Coeficiente de Correlación Lineal de **r: 0.99**, y Coeficiente de Determinación de **r²: 0.99**.

Al aplicar el test de significación estadística del intercepto, este resultó ser no significativo, ya que la t experimental (**1.57**) es menor que la t tabulada (**2.16**) para un α igual a 0.05%, lo que indica que el rango incluye el cero (**- 4193.81 a 26609.94**) por lo que no presenta sesgo.

De igual forma, al aplicar el test de significación estadística de la pendiente los resultados fueron satisfactorios al evidenciar una pendiente significativamente diferente de cero, pues la t experimental (**67.48**) fue mayor que la t tabulada (**2.16**) para un α igual a 0.05%, el rango obtenido fue de (**46111.92 a 49161.95**).

El promedio de los factores de respuesta (Áreas/Concentración) fue de **48780.27** y un % RSD de **0.87 %** el cual es menor del 2%. Se aplicó a los datos experimentales una prueba G de Cochran con un α igual a 0.05% para comprobar la homogeneidad de las variancias (Homocedasticidad) siendo la G experimental (**0.31**) menor que la G tabulada (**0.68**) lo que evidencia que las variancias de las concentraciones son



homogéneas, es decir que el factor concentración no interfiere en la variabilidad de los resultados. También se hizo un gráfico de análisis de los residuales, el que muestra que no existe tendencia de error sistemático en la distribución de los residuales.

Se realizó un análisis de varianza del que se puede deducir que existe una relación lineal entre la variable dependiente (Áreas) y la variable independiente (cantidad adicionada), puesto que la F_1 experimental (**4554.17**) es mayor que la F_1 de la tabla (**4.67**), lo que demuestra que la pendiente es distinta de cero. También se observó que los resultados experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal, puesto que la F_2 experimental (**0.07**) es menor que la F_2 de la tabla (**3.71**), para un α igual a 0.10%.

6.11 Linealidad Método.

Para la evaluación de la Linealidad del Método se desarrollaron 3 curvas de acuerdo al procedimiento establecido en el apartado 5.13.7 del presente documento y se realizó el tratamiento estadístico de las 3 curvas obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla del tratamiento estadístico de la Linealidad del Método.

Nivel de Concentración	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Área promedio 3 curvas	Promedio	Factor de respuesta (y/x)
80%	8	394661.33	390056.11	49332.67
80%	8	386674.33	390056.11	48334.29
80%	8	388832.67	390056.11	48604.08
90%	9	445259.33	440738.22	49473.26
90%	9	433638.33	440738.22	48182.04
90%	9	443317.00	440738.22	49257.44
100%	10	488445.67	487665.67	48844.57
100%	10	485930.33	487665.67	48593.03



100%	10	488621.00	487665.67	48862.10
110%	11	543704.67	537455.33	49427.70
110%	11	530481.67	537455.33	48225.61
110%	11	538179.67	537455.33	48925.42
120%	12	589780.00	585869.00	49148.33
120%	12	581289.67	585869.00	48440.81
120%	12	586537.33	585869.00	48878.11

Resumen estadístico del Análisis de Regresión Lineal

Coefficiente de Correlación r : **0.99**.

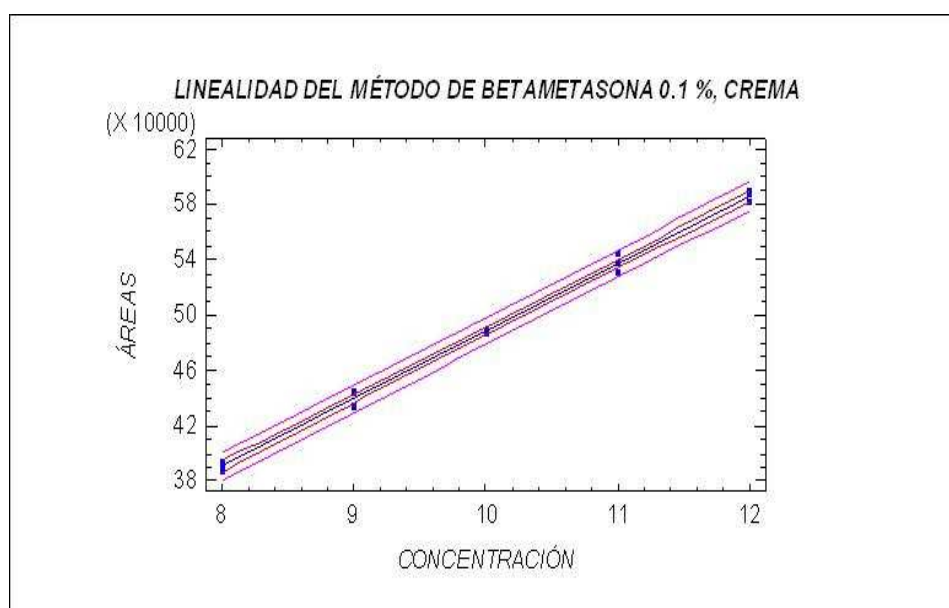
Promedio del Factor de Respuesta f : **48835.30**.

Coefficiente de Determinación r^2 : **0.99**.

Coefficiente de Variación $C.V_f$: **0.88 %**.

Ecuación de Regresión: $Y = 48834.29 X + 13.98$.

Linealidad del Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base contenido en el producto Betametasona 0.05 %, Crema (3 curvas promediadas).

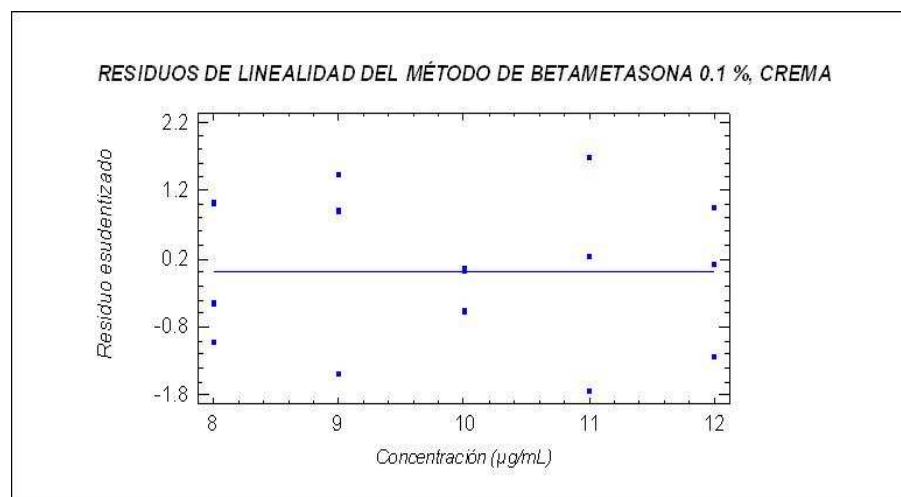


Significación Estadística de la Pendiente y del Intercepto (Prueba t de Student).



Variable	Valor	Error Típico	$t_{tab.}$	$t_{Exp.}$	Min.	Máx.	Especificación	Observación
Intercepto (a)	13.98	8060.88	2.16	0.0017	-17400.76	17428.72	$t_{tabla} > t_{exp}$; el intervalo debe incluir el cero	Incluye el cero
Pendiente (b)	48834.29	798.15	2.16	61.18	47109.97	50558.60	$t_{tabla} < t_{exp}$; el intervalo no debe incluir el cero	No incluye el cero

Residuos de Linealidad del Método de Cuantificación de Betametasona Dipropionato equivalente a Betametasona Base contenido en el producto Betametasona 0.05 %, Crema.



Homogeneidad de Variancias

	Valor G Experimental	Valor G Tabulado	Especificación
Prueba G de Cochran	0.38	0,68	Si $G_{exp} < G_{tabla}$, las variancias de las concentraciones son



			homogéneas.
--	--	--	-------------

Análisis de la Variancia: ANOVA

	Suma de Cuadrados	g.l	Varianza	F _{experimental}	F _{tabla}	Especificación
Regresión	71543633139	1	71543633139	3743.56	4.67	F _{1exp} > F _{1tabla} , demuestra que la pendiente es distinta de cero
Residual	248444839.2	13	19111141.48			
Falta de Ajuste	7348387.081	3	2449462.36	0.10	3.71	F _{2exp} < F _{2tabla} , los datos obtenidos se ajustan al modelo de regresión lineal
ErrorExperimental	241096452.1	10	24109645.21			
Total	71792077978	14	5128005570			

Conclusión:

La **Linealidad del Método** para la cuantificación de Betametasona Dipropionato contenido en el producto **Betametasona 0.05 %, Crema** se verificó en un rango de concentración de 80% a 120% correspondiente al intervalo de concentraciones de 8 µg/mL – 12 µg/mL.

Al aplicar el análisis de regresión al promedio de los datos obtenidos en las 3 curvas se obtuvo una ecuación de la recta correspondiente a **Y = 48834.29 X + 13.98**, Coeficiente de Correlación Lineal de **r: 0.99**, un Coeficiente de Determinación **de r²: 0.99**.

Al aplicar el test de significación del intercepto, este resultó ser no significativo, ya que la t experimental (**0.0017**) es menor que la t tabulada (**2.16**) para un α igual a 0.05%, lo que indica que el rango incluye el cero (**- 17400.76 a 17428.72**) por lo que no presenta sesgo. De igual forma, al aplicar el test de significación de la pendiente los resultados fueron satisfactorios al evidenciar una pendiente significativamente diferente de cero, pues la t experimental (**61.18**) fue mayor que la t tabulada (**2.16**) para un α igual a 0.05%, el rango obtenido fue de (**47109.97 a 50558.60**).

El promedio de los factores de respuesta (Área/Concentración) fue de **48835.30** y un % RSD de **0.88%** el cual es menor del 2%. Se aplicó a los datos experimentales una prueba G de Cochran (**Tabla 15**) con un α igual a 0.05% para comprobar la homogeneidad de las variancias (Homocedasticidad) siendo la G experimental (**0.38**) menor que la G tabulada (**0.68**) lo que evidencia que las variancias de las



concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no interfiere en la variabilidad de los resultados. También se hizo un gráfico y análisis de los residuales, el que muestra que no existe tendencia de error sistemático en la distribución de los residuales.

Se realizó un análisis de varianza (**Tabla 16**) del que se puede deducir que existe una relación lineal entre la variable dependiente (área) y la variable independiente (cantidad adicionada), puesto que la F_1 experimental (**3743.56**) es mayor que la F_1 de la tabla (**4.67**), lo que demuestra que la pendiente es distinta de cero. También se observó que los resultados experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal, puesto que la F_2 experimental (**0.10**) es menor que la F_2 de la tabla (**3.71**), para un α igual a 0.10%.

6.12 Exactitud del Sistema.

Se realizó analizando 3 soluciones de estándar a 3 niveles de concentración diferente (80%,100% y 120%) y realizando lecturas por triplicado de cada solución, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla de Exactitud del Sistema.

% de Concentraciones empleadas	Porcentaje Obtenido	Porcentaje recuperado	Media	Desv. Estándar	%RSD	Varianza
80	81.1092	101.3865	101.4176	0.0764	0.0753	0.0058
	81.0894	101.3618				
	81.2037	101.5047				
100	99.9748	99.9748	100.1641	0.1778	0.1775	0.0316
	100.3277	100.3277				
	100.1899	100.1899				



Facultad de Ciencias Químicas

120	117.6895	98.0746	98.2969	0.2658	0.2704	0.0707
	118.3096	98.5914				
	117.8696	98.2247				
	Media Total	99.9596				
	Desv. Estándar	1.3699				
	%RSD	1.3705				

Según los datos obtenidos en la tabla anterior, el promedio de los resultados obtenidos (**99.96 %**) cumple con el criterio de aceptación (98% - 102%) y el porcentaje de desviación estándar relativa (**1.37 %**) es menor al 2%.

Test de Cochran.

G de Cochran	
Especificación	$G_{exp} < G_{tabla}$
G de tabla	0.87
G experimental	0.65

Como se muestra en la tabla anterior el parámetro cumple con el test de Cochran, demostrando así que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Test de T Student.

t de student	
Especificación	$t_{exp} < t_{tabla}$
t de tabla	2.306



Facultad de Ciencias Químicas

t exp	0.09
-------	------

De igual manera se evaluó el test de t student el cual resultó satisfactorio ya que los resultados cumplieron con el criterio de aceptación, demostrando que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, por lo que la exactitud del sistema es correcta.

Criterio De Aceptación Para Exactitud Del Sistema Del Método De Cuantificación				
Parámetro a evaluar	Especificación	Datos experimentales		Cumplimiento
Porcentaje recuperado	97% - 103%	99.96%		CUMPLE
%RSD	≤ 3%	1.37%		CUMPLE
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$	$G_{tabla}=0.87$	$G_{exp} = \mathbf{0.65}$	CUMPLE
Test t de student	$t_{exp} < t_{tabla}$	$t_{tabla} = 2.306$	$t_{exp} = \mathbf{0.09}$	CUMPLE

6.13 Exactitud del Método.

La Exactitud del Método se evaluó en el intervalo de concentraciones del 80% al 120%, preparándose para ello 3 soluciones y realizando lecturas por triplicado para cada solución, obteniéndose los siguientes resultados:



Tabla de Exactitud del Método.

% de Concentraciones empleadas	Porcentaje obtenido	Porcentaje recuperado	Media	Desv. Estándar	%RSD	Varianza
80	81.0853	101.3567	101.5940	0.2253	0.2218	0.0508
	81.4439	101.8049				
	81.2965	101.6206				
100	100.7259	100.7259	100.6927	0.0967	0.0960	0.0093
	100.5838	100.5838				
	100.7685	100.7685				
120	118.5415	98.7846	98.8821	0.1027	0.1039	0.0106
	118.7872	98.9894				
	118.6468	98.8723				



Media Total	100.3896
Desv. Estándar	1.2035
% RSD	1.1988

En la tabla anterior se observa que el porcentaje recuperado promedio (**100.39%**) se encuentra dentro del intervalo establecido (97% - 103%) evidenciando que los resultados poseen una gran proximidad al valor que es aceptado como valor verdadero, también se observa un porcentaje de desviación estándar relativa igual a **1.20 %** el cual es menor que 3%.

Test de Cochran

G de Cochran	
Especificación	$G_{exp} < G_{tabla}$
G de tabla	0.87
G experimental	0.72

A como se muestra en la tabla anterior el parámetro cumple con el test de Cochran, demostrando así que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Test de t student.

t de student	
Especificación	$t_{exp} < t_{tabla}$



Facultad de Ciencias Químicas

t de tabla	2.306
t exp	0.98

De igual manera se evaluó el test de t student el cual resultó satisfactorio ya que los resultados cumplieron con el criterio de aceptación, demostrando que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, por lo que la exactitud es correcta.

Criterio De Aceptación Para Exactitud Del Método De Cuantificación				
Parámetro a evaluar	Especificación	Datos experimentales		Cumplimiento (C/NC)*
Porcentaje recuperado	97% - 103%	100.39%		CUMPLE
%RSD	$\leq 3\%$	1.20 %		CUMPLE
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$	$G_{tabla}=0.87$	$G_{exp} = \mathbf{0.72}$	CUMPLE
Test de t student	$t_{exp} < t_{tabla}$	$t_{tabla} = 2.306$	$t_{exp} = \mathbf{0.98}$	CUMPLE

6.14 Limite de Detección y Límite de Cuantificación.

El límite de detección y cuantificación calculados a partir de la desviación estándar de la residual y pendiente de la curva estándar se muestran en la siguiente tabla.

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual	1945.935
Pendiente	48834.29
LD ($\mu\text{g/ml}$)	0.1348
LC ($\mu\text{g/ml}$)	1.2342



VII. CONCLUSIÓN.

1. La metodología analítica es selectiva debido a que los productos de degradación de la Betametasona Dipropionato producidos durante el desarrollo y validación de la metodología analítica no interfieren en la banda de elución principal del analito.
2. La metodología aprobó los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia del sistema y del método al ser el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) menor al 2% para el sistema y menor del 3 % para el método.



3. Para la exactitud, el porcentaje de recuperación promedio estuvo dentro de los límites (97,0 –103,0%) y se comprobó que no difiere estadísticamente del 100%.
4. Se demostró que la metodología analítica cumple con los parámetros mínimos Descritos en la USP 34/NF 29 para los parámetros estadísticos: Linealidad, Precisión, Exactitud, Selectividad, por lo tanto la técnica se encuentra validada.

VIII. RECOMENDACIONES

1. En todo método debe de realizarse un buen estudio de robustez para optimizar la criticidad de los valores de los parámetros del método debido a que a través de este estudio se definirán las características de idoneidad conjunto de parámetro que garanticen que el sistema responde en cualquier momento del análisis.
2. Toda medición analítica debe realizarse usando métodos y equipos evaluados y así asegurarse que estos sean adecuados para su propósito.



3. Debe evaluarse los diseños de experimentos, cálculos efectuados en el presente trabajo, junto con el marco teórico, los cuales servirán de base para realizar futuros estudios de carácter investigativo de validación.

4. Si este método lo utilizaran otras empresas para cuantificación de cremas de Betametasona Dipropionato 0.05% se requiere tomar en cuenta que los parámetros de exactitud y linealidad del método se deben evaluar para la crema que se desea cuantificar debido a los posibles interferentes de los excipientes empleados.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. The United States Pharmacopeial USP XXXIV-NF29. Betametasona Dipropionato, Betametasona Dipropionato crema.
2. Validación y estimación de la incertidumbre en la cuantificación de Acetaminofén en solución oral por HPLC elaborado por Parajón Cristhiam, Parajón Eleazar, Peralta Jaime.
3. The United States Pharmacopeial USP XXX-NF25. Betametasona Dipropionato, Betametasona Dipropionato crema.
4. The United States Pharmacopeia Convention. 2006. The United States Pharmacopeia XXIX. 29° Edición. USA. Betametasona Dipropionato, Betametasona Dipropionato crema.



5. Validación de métodos analíticos de la A.E.F.I. (Asociación española de farmacéuticos de la industria); monografía, Barcelona marzo del 2001.
6. SLR Ellison (LGC, UK), M. Rösslein (EMPA, Suiza) y A. Williams (UK). Guía EURACHEM / CITAC. Cuantificación de la Incertidumbre en la Medición Analítica Segunda Edición.
7. Matamoros Sánchez Alicia, Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis Doctoral Tarragona 2002. Universidad de Rovira I Virgili, Facultad de Química.
8. Delgado Gustavo, Documentación del Curso de Validación de métodos Analíticos, julio del 2008.
9. Segundo Congreso Farmacéutico 2008. Facultad de Ciencias Químicas; Escuela de Farmacia; Estimación de la incertidumbre en HPLC en la cuantificación de Aflatoxinas en cereal, Dr. Gustavo Delgado.
10. Bedoya Lora Franky Esteban. Informe de práctica profesional. Homologación de métodos de análisis fisicoquímico empleado en POSTOBÓN S.A. para materias primas y producto terminado, y validación del método para la determinación de grados BRIX. Universidad de Antioquia. Facultad de ingeniería. Departamento de ingeniería química. Medellín. Agosto 2009.
11. Oleksiuk Hernández Ángela Denise. Universidad de Chile. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Laboratorio MED CELL S.A. Validación de la metodología analítica por HPLC para la cuantificación de Losartán potásico en comprimidos recubiertos. Santiago de Chile 2006.
12. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. (2001). Principios de análisis instrumental. Quinta edición. España. McGraw-Hill.
13. Rubinson K.A. y Rubinson J.F. (2001). Análisis instrumental. España. Pearson Prentice Hall.
14. López Crio Sergio José. Universidad nacional autónoma de Nicaragua. UNAN-LEÓN. Facultad de ciencias puras. Departamento de química. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR); curso introductorio. Febrero del 2008.



15. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. Química analítica. Séptima edición. McGraw-Hill.
16. Flores Jesús. Farmacología humana. Cuarta edición. Capítulo 22. Fármacos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos AINE. MASSON España.
17. Connors Kenneth A. Curso de análisis farmacéutico (Ensayo del medicamento); capítulo 17, editorial REVERTÉ S.A.
18. Ramis Ramos Guillermo y García Alvares Coque María Celia. Quimiometría. Editorial SINTESIS.
19. HPLC method development for pharmaceuticals. Edited by Satinder Ahuja Ahuja Consulting, Inc., Calabash, North Carolina Henrik Rasmussen Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, LLC Raritan, New Jersey. ELSEVIER ACADEMIC PRESS.
20. Harris Daniel C. Análisis químico cuantitativo. Tercera edición (sexta edición original). Michelson Laboratory.
21. Miller James N. y Miller Jane C. Estadística y Quimiometría para química analítica cuarta edición. Pearson Prentice Hall.
22. David Harvey. (2000). Química analítica moderna. McGraw-Hill.
23. Maturana, Y. 2004. Desarrollo y Validación de una Metodología por HPLC para Vitaminas en una Fórmula de Uso Tópico. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico y al Grado Académico de Licenciado en Química y Farmacia. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile.
24. Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Argentina. Artes Gráficas Ferro S.A. 301-327p.
25. Goodman y Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica. Onceava edición.



A N E X O S



ANEXO 1. GLOSARIO DE TERMINOS.

Numero de Siglas	Siglas	Significado
1	USP 34 NF 29	Farmacopea de los Estados Unidos de Norte América 34 y Formulario Nacional 29.
2	FB 2010	Farmacopea Británica 2010.
3	FJ 15 Ed	Farmacopea Japonesa.
4	RFE 2002	Real Farmacopea Española 2002.
5	FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos de México.
6	HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
7	CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
8	UV-VIS	Ultra Violeta Visible.
9	IR	Infra Rojo.
10	ADN	Acido Desoxirribonucleico.



Facultad de Ciencias Químicas

11	ARN	Acido Ribonucleico.
12	GLC	Cromatografía de Gas Liquido.
13	GSC	Cromatografía de Gas Solido.
14	LLC	Cromatografía Liquido-Liquido.
15	EP	Farmacopea Española.
16	ICH	International Conference of Harmonization.
17	AOAC	Official Methods of Analysis of the Association.
18	FI	Farmacopea Internacional.
19	BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio.
20	BPM	Buenas Prácticas de Manufactura.
21	ISO	Organización Internacional de Estandarización.
22	PNT	Procedimiento Normalizado de Trabajo.