

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO EN EL  
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CLOTRIMAZOL EN  
ÓVULOS SÓLIDOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCIÓN.**

**INFORME DE TESIS**

**Presentado por**

**Angela Teresa Samol Sayes**

**Para optar al título de  
Química Farmacéutica**

**Guatemala, Noviembre de 2007**

## *INDICE*

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes.....	4
3.1 Clotrimazol.....	5
3.2 Metodología Analítica.....	9
3.3 Estándarización de métodos.....	10
3.4 Características de Desempeño Analítico.....	13
4. Justificación.....	24
5. Objetivos.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Materiales y Métodos.....	27
8. Resultados.....	39
9. Discusión de Resultados.....	53
10. Conclusiones.....	58
11. Recomendaciones.....	59
12. Referencias.....	60
13. Anexos.....	64

**JUNTA DIRECTIVA**

<b><i>Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.</i></b>	<b><i>Decano</i></b>
<b><i>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto</i></b>	<b><i>Secretario</i></b>
<b><i>Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.</i></b>	<b><i>Vocal I</i></b>
<b><i>Licda. Liliana Vides de Urízar</i></b>	<b><i>Vocal II</i></b>
<b><i>Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez</i></b>	<b><i>Vocal III</i></b>
<b><i>Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso</i></b>	<b><i>Vocal IV</i></b>
<b><i>Br. José Juan Vega Pérez</i></b>	<b><i>Vocal V</i></b>

## AGRADEDIMIENTOS

- A Dios, por darme la oportunidad de realizar este sueño.
- A mis padres, Lic. José Angel Samol y América de Samol, por guiarme en el camino de la vida y brindarme el apoyo necesario para culminar mis estudios.
- A mi esposo, Juan Manuel Castañeda, por animarme siempre a seguir adelante.
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por proveerme una preparación científica de alta calidad.
- Al Lic. Julio Chinchilla, por su dedicación y orientación para el desarrollo de esta investigación.
- Al Laboratorio Nacional de Salud, por la confianza que me brindaron al darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. Especialmente al Lic. Ismael Mancilla
- A la Unidad de Físicoquímico de Medicamentos, por la oportunidad que me dieron para adquirir la experiencia necesaria para el desarrollo de esta investigación. Especialmente a la Licda. Millie Cruz.
- A la Licda. Ilda García, gracias por el apoyo en la realización de este estudio.
- A la Licda. Doris Solís, por su colaboración en la elaboración de la parte experimental del estudio.
- A la Licda Julia Amparo García, por su apoyo, amistad y consejos brindados durante este tiempo.

## DEDICATORIA

- A Dios, por darme el regalo de la vida y la inteligencia para poder desarrollar mi carrera.
- A mis padres, Lic. José Angel Samol y América de Samol, por el amor, amistad y apoyo que me han brindado durante toda mi vida. Muchas gracias por estar conmigo siempre.
- A mi esposo, Juan Manuel Castañeda, por brindarme su amor y apoyo en todo momento.
- A mis abuelitos, Agustín Samol, Teresa de Samol, Eligio Sayes y Clemencia de Sayes, por sus sabios consejos y el ejemplo que siempre me han brindado.
- A toda mi familia, gracias por su apoyo y amistad incondicional.
- A mis amigos, muchas gracias porque siempre me animaron en todo momento.
- Al área de Físicoquímico de Medicamentos, gracias por la amistad que hemos cultivado durante este tiempo.
- A la Iglesia Bautista La Verdad, por su apoyo y oraciones.

## 1. RESUMEN

En el presente estudio se realizó la estandarización del método de Identificación y Cuantificación de Clotrimazol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en Óvulos Sólidos utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), como una alternativa al análisis de este principio activo, ya que al utilizar otros métodos, se tiene que trabajar con condiciones extremas, las cuales pueden aumentar los costos o disminuir la vida útil de la columna utilizada, o pueden alterar su fase estacionaria.

Por estas razones se evaluaron las características de desempeño del mismo, incluyendo la Exactitud, Precisión (Repetibilidad y Precisión Intermedia), Especificidad, Linealidad del Sistema e Intervalo o rango.

Por estar en un proceso de acreditación bajo las Normas ISO/IEC 17025, el Laboratorio cumple con todos los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio. Se utilizaron las instalaciones del mismo y el equipo disponible en el Área de Físicoquímico de Medicamentos que se utiliza para análisis de muestras. Para llevar a cabo esta evaluación se utilizaron estándares USP y muestras que se han recibido en el LNS, para su análisis.

Los resultados obtenidos en la estandarización del método son satisfactorios, indican que el método se desempeña de manera efectiva y reproducible, cumple con los requisitos necesarios para su utilización y que los resultados obtenidos al utilizar este método son confiables.

## 2. INTRODUCCIÓN

En el Área de Físicoquímico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud (LNS) se realizan los análisis de valoración de principio activo que contienen las muestras recibidas, según lo declarado por la boleta cuali-cuantitativa presentada en el expediente de Solicitud de Registro Sanitario de Referencia. Con estos datos, se determina, conforme a normas y reglamentos que aseguran la calidad, eficacia e inocuidad de los medicamentos, si estos productos pueden ser utilizados por la población. Esta Área brinda soporte analítico a los programas de Registro Sanitario de Referencia, Contrato Abierto, Muestreo de Establecimientos Farmacéuticos, Particulares y Medicamentos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA).

Por esta razón, el Laboratorio Nacional de Salud recibe una gran cantidad y variedad de muestras, y se deben utilizar metodologías que sean confiables, seguras y estandarizadas que permitan generar resultados verídicos para asegurar la calidad y competitividad Nacional e Internacional de los servicios prestados y al mismo tiempo brindar un mejor servicio a la comunidad. Para ello, se pretende acreditar el Laboratorio Nacional de Salud bajo las Normas COGUANOR ISO/IEC 17025 en el año 2007, cumpliendo con los requisitos de las mismas.

El método de determinación de Clotrimazol utilizado en el LNS es una alternativa al análisis descrito en las farmacopeas, ya que estos procesos utilizan condiciones que pueden alterar químicamente la fase estacionaria de la columna de Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) y así disminuir su tiempo de vida útil y requieren la utilización de diferentes reactivos, los cuales aumentan el costo del análisis. El mismo puede ser utilizado cuando no se cuenta con algún reactivo de la metodología enviada por el fabricante o por la especificada en la USP; siempre contando con la autorización del cliente para su utilización. Este ensayo es utilizado para todas las formas farmacéuticas de este principio activo, pero en el presente estudio se estandarizó el método de

identificación y cuantificación de Clotrimazol presente en óvulos sólidos, debido a que es la forma farmacéutica analizada con mayor frecuencia, según revisión de expedientes realizada en el Laboratorio Nacional de Salud, y así asegurar que los resultados obtenidos en estos ensayos cumplen con las características necesarias para su utilización.

Las características del desempeño del método que se verificaron fueron: la Exactitud, Precisión (Repetibilidad y Precisión Intermedia), Especificidad, Linealidad del sistema e Intervalo o Rango. Los resultados fueron analizados con metodología estadística adecuada y con base en los criterios de aceptación que se especifican en el estudio, el método analizado cumple con los requisitos necesarios para el fin previsto y los resultados obtenidos por medio de este análisis son confiables, y al mismo tiempo, agilizan el proceso de acreditación del Laboratorio bajo las Normas ISO/IEC 17025.



### 3. ANTECEDENTES

De acuerdo a la revisión bibliográfica efectuada, y a los datos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Salud, hasta el momento no se han efectuado estudios de estandarización de métodos para la identificación y cuantificación de Clotrimazol en óvulos sólidos en esta Institución.

De la misma manera, se realizó una revisión bibliográfica en tesis llevadas a cabo tanto en la Universidad de San Carlos de Guatemala como en la Universidad del Valle de Guatemala, y se pudo encontrar algunas tesis relacionadas con Guías sobre validación de metodologías analíticas y validación de metodologías analíticas para diversos principios activos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, pero ninguna es específica para la estandarización del ensayo de Clotrimazol. Por otra parte, se encontró un estudio realizado en Managua, Nicaragua sobre Cuantificación de derivados imidazólicos (Ketoconazol y Clotrimazol) con complejos de cobalto (II) en cremas, por espectrofotometría UV/VIS, en el cual se realizó la validación de dicho método.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método analítico ampliamente utilizado, ya que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales de análisis. Entre estas están: Los ensayos se pueden realizar en un tiempo muy corto, se pueden separar sustancias de mezclas complejas, método de análisis fácil y exacto y brinda errores relativos con un porcentaje muy bajo (1).

Por todas las ventajas expuestas con anterioridad, el método analítico por medio del HPLC es un ensayo utilizado ampliamente en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) para la identificación y cuantificación de principios activos presentes en las muestras recibidas.

## 3.1 CLOTRIMAZOL

### 3.1.1 FARMACOLOGÍA

El tratamiento de las infecciones micóticas superficiales ocasionadas por dermatófitos puede efectuarse con antimicóticos tópicos y con fármacos administrados por vía oral (2, 3).

Entre los antimicóticos tópicos más comunes están los azoles. Los antimicóticos azólicos incluyen dos clases generales que son los imidazoles y triazoles. Ambos comparten el mismo espectro y mecanismo de acción contra los hongos (2, 3).

Los triazoles sistémicos se metabolizan con mayor lentitud y tienen menor efecto en la síntesis de esteroides en el ser humano, que los imidazoles. Por esta razón los agentes que se estudian en este momento pertenecen al grupo de los triazoles (2,3).

Los agentes que actualmente se encuentran disponibles son:

- Imidazoles: Clotrimazol, Miconazol, Ketoconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol, Sulconazol
- Triazoles: Terconazol, Itraconazol y Fluconazol (2,3).

### 3.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN

El principal efecto de los Azoles a las concentraciones que se alcanzan durante el uso sistémico, es la inhibición de la *esterol 14- $\alpha$ -desmetilasa* en los hongos, que es un sistema de enzimas que depende de *citocromo p 450 microsomal* (2,3).

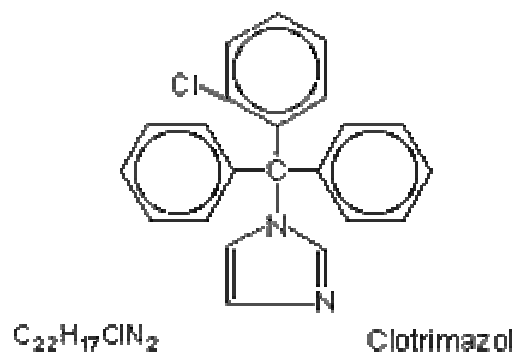
De ese modo estos fármacos entorpecen la biosíntesis de ergosterol en la membrana citoplásmica y permiten la acumulación de los 14-  $\alpha$  -metilesteroides (2,3).

Estos metilesteroles pueden alterar la disposición íntima (empacamiento) de las cadenas acilo fosfolípidos y, con ello, alterar las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana, como ATPasa y enzimas del sistema del transporte electrónico, y de este modo inhibir la proliferación de los hongos (2).

Algunos azoles como el clotrimazol, incrementan directamente la permeabilidad de la membrana citoplasmática del hongo, pero las concentraciones necesarias para este fin quizá se obtengan solo con uso local (2).

Los productos azólicos no tienen actividad antibacteriana o antiparasitaria útil, con excepción posible de los efectos antiprotozoicos contra *Leishmania major* (2).

El Clotrimazol tiene la estructura química siguiente:



El Clotrimazol es un agente antimicótico imidazólico que se utiliza para el tratamiento de infecciones causadas por varias especies patógenas de dermatófitos, levaduras y *Malassezia furfur* (2).

Este fármaco está indicado en las dermatofitosis, las candidiasis oral y vaginal y en las tiñas. Debido a que el fármaco no alcanza

concentraciones en el tejido subcutáneo, no está indicado en ese tipo de micosis (2).

El Clotrimazol se encuentra en una gran variedad de preparaciones incluyendo presentaciones para aplicación tópica a la piel como crema, loción y solución al 1%, y como crema vaginal al 1 ó 2%, o tabletas vaginales (óvulos sólidos) de 100, 200 ó 500 mg y trociscos de 10 mg. También se encuentran combinaciones fijas de antimicóticos y corticosteroides, que proporcionan una mejoría sintomática más rápida que un antimicótico solo, pero estas están disponibles para aplicación tópica (2,4,5).

Los preparados para uso cutáneo son eficaces en sujetos con tiñas del cuerpo, de los pies y la ingle, la versicolor y candidiasis cutánea. Esta presentación no es idónea para aplicar en la boca, vagina u ojos (2,3).

Los preparados más convenientes para tratar la candidiasis vaginal son cremas, óvulos y tabletas vaginales (óvulos sólidos). Se usan una vez al día, de preferencia a la hora de acostarse para facilitar la retención (2).

Los hongos han demostrado poca resistencia al Clotrimazol. La droga es activa contra una gran variedad de hongos, levaduras y dermatofitos incluyendo:

- *Aspergillus fumigatus*.
- *Candida albicans*.
- *Cephalosporium*.
- *Cryptococcus*.
- *Epidermophyton floccosum*.
- *Microsporum canis*.
- *Malassezia furfur*.
- *Sporothrix*.

- *Trichophyton rubrum*.
- *T. mentagrophytes*.

El Clotrimazol no se administra para absorción sistémica. Los trociscos por vía oral se utilizan para las candidiasis orofaríngeas y prácticamente no se absorbe. Las concentraciones que persisten en la saliva se deben a su unión a la mucosa oral (2).

La absorción del clotrimazol es menor de 0.5% después de aplicarlo en la piel intacta; en la vagina es de 3 a 10%. Las concentraciones fungicidas en la vagina persisten por 3 días después de su aplicación (4).

Las pequeñas cantidades que se absorben por vía sistémica son metabolizadas en el hígado y excretadas en la bilis (2).

En adultos, inicialmente una dosis oral diaria de 200 mg genera cifras plasmáticas de 0.2 a 0.35 ug/ml, seguidas por una declinación progresiva (4, 5).

En una pequeña fracción de los pacientes que reciben clotrimazol en la piel, puede experimentar una sensación punzante, eritema, edema, vesículas, descamación, prurito y urticaria (4, 5).

Si se aplica el producto en la vagina, en promedio 1.6% de las mujeres que lo reciben manifestarán ardor leve y, en infrecuentes ocasiones, cólicos en la mitad inferior del vientre, incremento moderado de la frecuencia de micción o una erupción cutánea (2).

Por vía oral, el clotrimazol origina irritación gastrointestinal. En personas que consumen los trociscos, la incidencia del efecto adverso es de 5%, aproximadamente (2, 4, 5).

En piel, se hacen las aplicaciones dos veces al día. En vagina, los regímenes habituales incluyen colocación de una tableta de 100 mg una vez al día a la hora de acostarse, durante siete días; una tableta de 200 mg/día durante tres días, una tableta de 500 mg aplicada una sola vez o 5 g de crema una vez al día, durante 3 días (crema al 2%) o siete días (crema al 1%) (2,4,5).

En mujeres no embarazadas, cabe utilizar una vez al día dos tabletas de 100 mg, por tres días. Los trociscos deben disolverse lentamente en la boca cinco veces al día, durante 14 días (2, 4, 5).

Según algunos hallazgos, el clotrimazol cura las dermatofitosis en 60 a 100% de los casos. Las tasas de curación de candidiasis cutánea son de 80 a 100%. En la candidiasis vulvovaginal, dicha tasa casi siempre es mayor de 80% cuando se utiliza el régimen de siete días. Se logran efectos semejantes con un régimen de 200 mg una vez al día, durante tres días y también un régimen de una sola dosis (500 mg). Las recidivas son frecuentes después de todos los regímenes. La tasa de curación con trociscos disueltos en la boca en la candidiasis oral y faríngea puede llegar a 100% en el huésped inmunocompetente (2).

Este tipo de medicamentos es comercializado por diferentes casas farmacéuticas, las cuales para poder obtener un registro sanitario, llevan sus medicamentos para análisis al Laboratorio Nacional de Salud, que es el laboratorio de referencia para realizar este trámite.

### **3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA**

Para el análisis de Clotrimazol se cuenta con diferentes metodologías descritas en las diferentes Farmacopeas utilizadas como referencia para ensayos analíticos, entre estas La Farmacopea de Estados Unidos y la Farmacopea Británica (6, 7). Por otra parte, en el Laboratorio Nacional de

Salud se recibe información adicional sobre otras metodologías de análisis que se han investigado. Entre estas se encuentra la metodología utilizada actualmente en esta institución.

Esta se basa en la identificación y cuantificación de Clotrimazol por solubilidad y extracción del principio activo utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector ultravioleta visible. Utilizando como fase móvil una mezcla de Buffer de fosfato de Amonio: Metanol y como solvente metanol (8).

### **3.3 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS**

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, la estandarización es un requisito establecido por entidades regulatorias y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos y para el análisis de medicamentos (6, 9, 10, 11).

Para la evaluación de un medicamento es necesaria la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar la confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de estandarización, el cual comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas (6).

La estandarización de los métodos es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Es una verificación documentada que proporciona un alto grado de confianza de que el sistema integral o proceso funciona de la manera prevista en el ambiente de operación normal o producirá en forma consistente un resultado que cumpla con sus especificaciones predefinidas (10, 12).

Es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Las características de desempeño analítico habituales que deben ser evaluadas en la estandarización de métodos son los siguientes:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de Detección.
- Límite de Cuantificación
- Linealidad
- Intervalo o Rango (6)

Los procedimientos para la determinación de productos farmacéuticos varían en gran manera, por lo que diferentes métodos de prueba requieren diferentes esquemas de estandarización, los cuales se pueden agrupar en cuatro categorías:

Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

- Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

- Categoría IV: Pruebas de identificación. (6)



Para cada categoría de análisis se requiere diferente información analítica y los datos que se requieren para cada una de las categorías de análisis se indican en la siguiente tabla (6, 11):

**Tabla No. 1. Datos requeridos para la estandarización de un método analítico.**

Característica	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Prueba de límite		
Exactitud	+	+	*	*	-
Precisión					
Repetibilidad	+	+	-	+	-
Precisión intermedia	+	+	-	+	-
Especificidad	*	+	+	*	*
Límite de detección	-	-	+	*	-
Límite de cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
Rango	+	+	*	*	-

\* Puede requerirse según la naturaleza de la prueba.

En base a esta clasificación, el tipo de estandarización a realizarse en el presente trabajo se incluye en la categoría I, que requiere el análisis de los siguientes parámetros para metodologías por HPLC (6):

- Exactitud
- Precisión: Repetibilidad y Precisión intermedia.
- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Intervalo o Rango

No se debe evaluar el límite de detección y límite de cuantificación en el presente estudio, debido a la concentración de principio activo que se utiliza en el análisis. Ésta es bastante alta, por lo que no requiere la determinación de estos parámetros.

La documentación de los estudios de estandarización constituye un requisito básico para determinar si un método es adecuado para sus aplicaciones previstas (6).

### **3.4 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO**

#### **3.4.1 EXACTITUD**

*Definición:* La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método (valor experimental), y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo (6, 12).

*Determinación:* En la valoración de un fármaco, la exactitud puede ser determinada mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un Estándar de Referencia) o por comparación de los resultados del método con los resultados de un segundo método bien caracterizado cuya exactitud se haya comprobado o definido (6).

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza (6).

Los documentos ICH (International Conference Harmonization) recomiendan que la exactitud sea evaluada utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) (6).

Cuando no es posible contar con un placebo, se determina por duplicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a evaluar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

También se puede trabajar utilizando un mínimo de tres concentraciones de soluciones estándar que cubran el rango de trabajo y se evalúa el porcentaje de recuperación obtenido utilizando el método a evaluar (13).

Se preparan muestras a tres niveles de concentración diferentes, preparando las muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. Para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de la cantidad de principio activo agregado a cada muestra (13).

### **3.4.2. PRECISIÓN:**

*Definición:* La precisión de un método analítico expresa la cercanía de coincidencia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos cuando se aplica el método repetidamente a una muestra homogénea. Puede considerarse a 3 niveles: Reproducibilidad, Repetibilidad y precisión intermedia (13).

La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación.

### **3.4.2.1 REPRODUCIBILIDAD**

Expresa la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados bajo diferentes condiciones, analistas, laboratorios, reactivos, días, proveedores, equipo, etc., como por ejemplo en un estudio en colaboración (6, 12). Se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad. Esta se realiza como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología (14).

En el presente estudio no se evaluará la reproducibilidad.

### **3.4.2.2 PRECISIÓN INTERMEDIA**

La precisión intermedia expresa la variación obtenida dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente de una muestra homogénea dentro del mismo laboratorio (6, 14).

### **3.4.2.3 REPETIBILIDAD**

Precisión obtenida en la utilización de un procedimiento analítico en un laboratorio bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por

un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo (6, 14).

Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

En la mayoría de los casos, la repetibilidad es el criterio de mayor interés en los procedimientos analíticos (6).

*Determinación:* La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de la muestra hasta el resultado final de las pruebas (6).

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración), o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba (6).

### **3.4.3. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD**

*Definición:* Los documentos de la ICH definen la especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en

aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede ser compensada al utilizar otros procedimientos analíticos complementarios. Para los ensayos de prueba o valoración, la definición anterior tiene las siguientes implicaciones (6):

- Ensayos de identificación: Garantiza la identidad del analito.
- Valoraciones: Proporcionan un resultado que permita una determinación exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

*Selectividad:*

Es la capacidad que tiene un método analítico de distinguir o separar la respuesta de la sustancia de interés del resto de los componentes de una muestra. Es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja (12).

Debido a que las muestras a analizar en el presente trabajo solamente contienen un principio activo, se determinará la especificidad del método.

Es importante tomar en cuenta, que en aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, tanto en términos de su composición, como en la fuente de las materias primas que las componen (diferentes proveedores, diferentes orígenes), se recomienda que la especificidad se establezca para las diferentes composiciones o fuentes en forma independiente.

*Determinación:* Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que

contengan el analito (o mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar estrechamente relacionada a la del analito (6).

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños (6).

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo, luz, calor, humedad, hidrólisis ácida y alcalina, oxidación). En una valoración, deben compararse los resultados (6).

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. (6).

#### **3.4.4. LINEALIDAD O INTERVALO**

*Definición de Linealidad:* La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado (6).

*Definición de Intervalo:* El intervalo de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el método analítico (6).

*Determinación de Linealidad e Intervalo:*

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, puede que haya que someter los datos de la prueba a una transformación matemática. Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad.



Se deberán presentar: el coeficiente de correlación ( $r$ ), la intersección con el eje de ordenadas ( $b$ ), la pendiente de la línea de regresión ( $m$ ) y la suma de los cuadrados residuales ( $\sum r^2$ ) (6).

El intervalo del método se evalúa verificando que el método analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo (6).

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación (6):

Valoración de un Fármaco (o producto terminado): De 80% a 120% de la concentración de prueba.

El intervalo de determinación puede variar, pero debe incluir los porcentajes mencionados anteriormente. Por ejemplo, 50% a 150% de la concentración de prueba.

La evaluación de la linealidad y el cálculo del rango de aplicación son de utilidad para establecer una estrategia de calibración, es decir, para determinar:

- Con qué frecuencia se necesita preparar una nueva curva de calibración durante la aplicación rutinaria del método analítico.
- Cuántos niveles de calibración se requiere.
- El número de repeticiones necesarias en cada nivel de concentración.

Al efectuar un número grande de determinaciones a lo largo del rango de aplicación se consigue una medida de la precisión a estas

diferentes concentraciones, así como también información adicional acerca de la linealidad de la curva.

#### **3.4.6. APTITUD DEL SISTEMA**

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o incluirse en el método una declaración preventiva. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia del método sería el establecimiento de una serie de parámetros de aptitud del sistema que garantizan que se mantenga la funcionalidad del método analítico siempre que se utilice (6).

El laboratorio debe estandarizar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el uso previsto. La estandarización debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dado. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la estandarización y una declaración acerca de si el método es apto para el uso previsto (10).

Las técnicas usadas para la determinación del desempeño de un método deberían ser una, o una combinación, de las siguientes:

- La calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
- La comparación con resultados obtenidos por otros métodos;
- Las comparaciones interlaboratorios;
- La evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;

- La evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica (10).

Cuando se introduzca algún cambio en los métodos no normalizados estandarizados, la influencia de tales cambios debería ser documentada y, cuando sea apropiado, se debe realizar una nueva estandarización (10).

El rango y la exactitud de los valores que se pueden obtener empleando métodos estandarizados (por ejemplo, la incertidumbre de los resultados, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto a ensayar) tal como fueron determinados para el uso previsto, deben ser pertinentes a las necesidades de los clientes (10).

La estandarización incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características (los parámetros de desempeño) de los métodos y una verificación de que los requisitos pueden ser cumplidos al utilizar el método (10).

A medida que se desarrolla el método, se deberían realizar revisiones periódicas para verificar que las necesidades del cliente siguen siendo cumplidas. Cualquier cambio en los requisitos que requiera modificaciones en el plan de desarrollo debería ser aprobado y autorizado (10).

La estandarización es siempre un equilibrio entre los costos, los riesgos y las posibilidades técnicas. Existen muchos casos en los que el rango y la incertidumbre de los valores (por ejemplo, la exactitud, el límite de detección, la selectividad, la linealidad, la repetibilidad, la reproducibilidad, la robustez y la sensibilidad cruzada) sólo pueden ser dados en forma simplificada debido a la falta de información (10).

Algunas de las ventajas de un estudio de estandarización son las siguientes:

- Tiene menor costo prevenir que corregir.
- Se cumplen con los requerimientos legales, ISO 17025
- Evaluación y optimización de las características de desempeño del método y del sistema.
- Obtención de datos que sirvan como base para la comparación a largo plazo de la calidad analítica de los resultados
- Identificación de la experiencia y necesidades de capacitación del personal.
- Identificación de reactivos químicos e instrumentos requeridos.
- Eficiente operación del método cuando es adoptado.
- Evita perjudicar el prestigio, imagen y pérdida de credibilidad del laboratorio por una mala aplicación del método.
- Diseño de una estrategia de control de calidad.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos, es necesario estandarizar los procedimientos de análisis, ya que de ellos depende la aprobación o rechazo de un producto. Especialmente en el caso del Laboratorio Nacional de Salud que recibe las muestras de medicamentos para su comercialización en el país y de los resultados que se obtienen en estos análisis depende la autorización del Registro Sanitario respectivo.

Debido a esto, el Laboratorio Nacional de Salud debe contar con métodos de análisis que sean confiables, por lo que se debe utilizar el método enviado por la casa fabricante, el especificado por la USP o un método de análisis estandarizado en el Laboratorio Nacional de Salud, el cual debe cumplir con las características de desempeño necesarias para su aplicación.

Entre estos procesos se encuentra el método de determinación y cuantificación de Clotrimazol en sus diferentes formas farmacéuticas utilizado en el Área de Físicoquímico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud. Dicho método es una alternativa a los ensayos propuestos en la Farmacopea Británica y en la Farmacopea de Estados Unidos, ya que al utilizar este procedimiento, se deben utilizar condiciones extremas, que puede alterar químicamente la fase estacionaria de la columna de Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) y así disminuir su tiempo de vida útil; o requieren de otro tipo de preparaciones, las cuales aumentan el costo del análisis. Este ensayo es utilizado para todas las formas farmacéuticas de este principio activo, pero en el presente estudio se estandarizó el método de identificación y cuantificación de Clotrimazol en Óvulos sólidos, debido a que es la forma farmacéutica más analizada de este principio activo en el Laboratorio Nacional de Salud, según revisión de registros en esta Institución, para así asegurar que los resultados obtenidos en estos procedimientos son confiables y seguros.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo General:*

Demostrar a través de la estandarización, que el Método Analítico de Identificación y Cuantificación de Clotrimazol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en Óvulos Sólidos, utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud se desempeña de manera efectiva y reproducible, cumpliendo con los requerimientos y especificaciones establecidas en el estudio.

### 5.2 *Objetivos Específicos:*

- 5.2.1. Determinar la Exactitud, Precisión, Especificidad, Linealidad e Intervalo del método de identificación y cuantificación de Clotrimazol en Óvulos Sólidos, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud.
- 5.2.2. Determinar si los resultados obtenidos por este método son confiables para su utilización en el Laboratorio Nacional de Salud.
- 5.2.3. Determinar la variación de la respuesta del método dentro del mismo laboratorio, evaluando las muestras en diferentes días, equipos y analistas durante el ensayo.

## **6. HIPÓTESIS**

El método de Identificación y Cuantificación de Clotrimazol en óvulos sólidos por cromatografía líquida de alta resolución, utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud, brinda resultados confiables para su uso en el análisis de Muestras de medicamentos que contienen este principio activo.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. *Universo o población y Muestra:*

- Muestras de Clotrimazol en óvulos sólidos.
- Muestras que se reciben en el Laboratorio Nacional de Salud para su análisis.

### 7.2. *Medios:*

#### 7.2.1 Recursos Humanos:

- Autora: Angela Teresa Samol Sayes
- Asesor: Licda. Julia Amparo García Bolaños
- Co-Asesor: Licda Millie Cruz
- Revisor: Lic. Julio Chinchilla
- Personal profesional y técnico del Laboratorio Nacional de Salud

#### 7.2.2 Recursos Materiales:

##### 7.2.2.1 Aparatos:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Merck Hitachi Lachrom Clásico
- Baño Ultrasónico (desgasificador)
- Sistema para filtrar tanto muestra como solventes.
- Estufa con agitador
- Potenciómetro
- Columna de 3.9 mm x 15 cm rellena con material L1 (octadecilsilano).
- Balanza analítica
- Computadora
- Magnetos
- Filtro de 0.5 micrómetros



#### 7.2.2.2 Reactivos

- Estándar de Clotrimazol USP
- Metanol grado HPLC
- Fosfato de amonio dibásico
- Ácido fosfórico
- Agua desmineralizada purificada para uso HPLC

#### 7.2.2.3 Cristalería

- Balones aforados de 1000 mL
- Balones aforados de 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, y 5 mL, 6 mL.
- Varilla de vidrio
- Embudos
- Probeta de 50 mL
- Probeta de 100 mL
- Beaker de 250 mL
- Viales
- Micropipeta
- Mortero y pistilo

**Limpieza de cristalería:** Lavar con detergente para cristalería sin fosfatos y enjuagar al menos 10 veces con agua del tubo y una vez con agua destilada.

### 7.3 Métodos:

#### ***Método de Determinación de Clotrimazol***

##### ***7.3.1 Fase Móvil:***

Buffer de fosfatos de amonio: metanol (30:70), pH = 7.0 con ácido fosfórico.

Buffer de fosfatos: Pesar 6.60 gramos de fosfato de amonio dibásico y disolverlo en 1000 mL de agua.

### **7.3.2 Preparación del estándar:**

Pesar exactamente cerca de 20.0 mg de estándar de Clotrimazol USP a un balón de 25 mL.

Añadir 25 mL de metanol y disolver con ayuda de un baño ultrasónico.

Llevar a volumen con el mismo solvente.

### **7.3.3 Preparación de la muestra:**

Pesar 10 óvulos sólidos y determinar el peso promedio de cada óvulo.

Determinar el peso promedio. Luego triturar los óvulos y pesar el polvo equivalente a 20 mg de clotrimazol de la muestra en un balón de 25 mL.

Agregar aproximadamente 10 mL de metanol y disolver con calor y agitación constante.

Enfriar y llevar a volumen con el mismo solvente.

Leer las muestras y el estándar en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución.

### **7.3.4 Sistema Cromatográfico**

Columna: C18 corta.

Longitud de onda: 254 nm

Flujo: 2.0 mL/min

Loop: 100 µL

Inyección: 50 µL

Fase Móvil: Buffer de fosfatos de amonio: metanol (30:70).

### **7.3.5 Criterios de Aceptación:**

Los óvulos sólidos de Clotrimazol contienen no menos de 90.0 por ciento y no más de 110.0 por ciento de la cantidad de Clotrimazol declarada en la etiqueta.

### **7.4. PARÁMETROS EVALUADOS:**

- Exactitud
- Precisión
  - Repetibilidad
  - Precisión intermedia.
- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Intervalo o Rango

### **7.5 PROCEDIMIENTO, DISEÑO Y ANÁLISIS**

#### **7.5.1. ADECUACIÓN DEL SISTEMA:**

Primero se realizó la adecuación del sistema (system suitability), que está diseñado para determinar la efectividad de la operación del sistema analítico y del equipo con el método, antes de ser utilizado (12).

Dejar estabilizando el equipo con todas las funciones y parámetros indicados del método, luego que ya se tiene una línea base bien estable, se procede con las inyecciones del estándar de referencia del método (12).

Se inicia con las 6 inyecciones del estándar al 100%, ya inyectados los estándares, se analizan los resultados con los siguientes cálculos (12):

*Media aritmética:* Es el valor calculado de la suma de los datos dividida entre el número de datos analizados (15).

$$\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$$

*Desviación estándar:* Describe matemáticamente el esparcimiento de la medición, en un conjunto determinado de datos (15).

$$S = \sqrt{\frac{\sum r^2}{n}}$$

*Coefficiente de variación:* Es el cociente entre la desviación estándar y la media de la distribución. Es lo mismo que desviación estándar relativa (15).

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Con estos valores se determina si tanto el equipo como la metodología están respondiendo bajo los rangos que se especifican a continuación.

**Criterio de Aceptación:**

El Coeficiente de Variación tiene que ser menor del 3 % (12).

**7.5.2. ESPECIFICIDAD:**

Debido a que en el Laboratorio Nacional de Salud se analizan muestras de diferentes casas farmacéuticas que utilizan diversos excipientes, se evaluó la especificidad para alguna de estas muestras, para determinar si los excipientes no interfieren en la determinación del principio activo.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo y una solución de las diferentes muestras a analizar a la misma concentración del estándar. Midiendo cada una de las soluciones por duplicado. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de las soluciones.

También se debe realizar una solución blanco, la cual se prepara con el solvente utilizado para las muestras, se debe agitar la solución, dejar enfriar a temperatura ambiente y filtrar de la misma forma en que se filtran las muestras. Se debe realizar la lectura del blanco para demostrar que no se presenta ningún pico que interfiera la lectura del principio activo.

Para la preparación de la muestra se debe pesar y pulverizar homogéneamente no menos de 10 óvulos sólidos de Clotrimazol. Transferir a 1 balón volumétrico de 25 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 20 mg de clotrimazol, agregar 10 mL de metanol y disolver la muestra con agitación constante. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente y aforar con el solvente utilizado para la preparación de la muestra. Filtrar las muestras y realizar lecturas de la solución por duplicado.

Repetir el procedimiento para las diferentes muestras de Clotrimazol que se evaluarán.

**Criterios de Aceptación:**

Para la identificación del analito se debe obtener un Tiempo de Retención (TR) en HPLC entre +/- 5% del Tiempo de Retención del estándar en la misma secuencia.

La muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar (13).

El cromatograma debe incluir un listado de sustancias con sus correspondientes tiempos de retención.

### **7.5.3. LINEALIDAD DEL SISTEMA:**

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vrs. área) utilizando 5 puntos (concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%) con diluciones preparadas a partir de una solución madre y haciendo un análisis por triplicado para cada dilución para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema (12, 14).

Pesar una cantidad exacta cercana a 50.0 mg de clotrimazol estándar USP. Transferir a un balón aforado de 25 mL, agregar aproximadamente unos 10 mL de metanol y colocar en ultrasonido durante unos 5 minutos, esperar a que el balón llegue a temperatura ambiente luego aforar con el mismo solvente, tapar y agitar. Esta será la solución madre. De esta solución madre se toman alícuotas correspondientes para preparar una gama de 5 soluciones. Medir alícuotas de los siguientes valores: (2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0mL) y colocarlas en sus respectivos balones aforados de 10 mL y llevar a volumen con el solvente.

Determinar el área de las 5 soluciones, previa adecuación del sistema, inyectando las muestras correspondientes a cada concentración por triplicado.

Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito, colocando la concentración en el eje horizontal (x) y la respuesta del instrumento en el eje vertical (y).

Esto soporta el grado de confiabilidad de acuerdo a los intervalos de confianza de la recta. Realizar la gráfica correspondiente con los resultados obtenidos y comparar los resultados con las especificaciones (16).

Determinar por medio de regresión lineal, la ecuación de la recta  $Y = mX + b$  y para su evaluación se calcula el coeficiente de determinación que es el porcentaje de desviación de los resultados explicado en la recta, y el intercepto "b" que no debe ser mayor del 3% del valor máximo de concentración. Calcular el coeficiente de regresión utilizando una sola curva con las tres lecturas realizadas para cada concentración.

Realizar un diagrama de residuales, que es la gráfica que representa la diferencia entre los resultados observados y los predichos por la regresión lineal. (Valor real de la concentración menos el cálculo por la ecuación de regresión para cada valor de X). Además evaluar la ecuación por medio de análisis de varianza para la regresión.

#### **Criterios de Aceptación (14):**

**Tabla No. 2: Criterios de Aceptación para la Linealidad del Sistema**

r = Coeficiente de correlación (Es la raíz cuadrada del coeficiente de determinación). Es una medida del grado de asociación entre las mediciones y la concentración del analito.	Valores mayores de 0.98 son lineales
$r^2$ = Coeficiente de determinación (Mide la exactitud con la que se ajusta la curva de regresión a los valores experimentales de y).	Mayor o igual a 0.998
b = Intercepto de la línea	Menor o igual a 0.03 ó +/- 3%
m = Pendiente	Igual a la sensibilidad del sistema

Luego de realizado ésto, se evalúa la precisión la cual se divide en repetibilidad y reproducibilidad, que se describe a continuación (12).

#### **7.5.4. PRECISIÓN DEL SISTEMA:**

Se calcula con los resultados de la adecuación del sistema, preparando una solución con estándar de clotrimazol al 100% de la concentración de trabajo, e inyectándola 6 veces, previa verificación de línea base estable.

Evaluar los resultados según la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos.

##### **Criterios de Aceptación:**

Coeficiente de Variación:  $\leq 3.0\%$

#### **7.5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO**

##### **7.5.5.1. REPETIBILIDAD:**

Se determina realizando el análisis de 6 replicados al 100% de la concentración de trabajo, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo, el mismo día. Los análisis son independientes y se llevan a cabo mediante el procedimiento analítico completo. Se evalúa un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba (14).

Preparar 6 muestras al 100% de la concentración de trabajo (pesadas por separado), del mismo lote, según el procedimiento descrito para la preparación de la muestra, cada una de ellas se prepara de forma individual. Luego se lee cada una de las muestras.



Este parámetro se evaluó luego de la adecuación del sistema (14). Evaluar los resultados según la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos (14).

***Criterio de Aceptación*** (14):

Coeficiente de Variación menor o igual al 2.5 %

Calcular el coeficiente de variación, con la siguiente fórmula: Coeficiente de Variación = (desviación estándar / media) \* 100

Intervalos: 2 Desviaciones estándar (2S) Nivel de Confianza del 95%

**7.5.5.2 PRECISIÓN INTERMEDIA:**

Se determinó realizando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de trabajo, con muestras del mismo lote, según el procedimiento descrito para la preparación de la muestra, cada una de ellas se prepara de forma individual. Luego se lee cada una de las muestras.

Se evalúa en dos diferentes días, dos analistas diferentes y dos equipos diferentes, utilizando la misma columna (17)

**Criterios de Aceptación**

Coeficiente de Variación:  $\leq 3.0\%$  (6).

Realizar un análisis de Varianza de dos vías para establecer si hay diferencias significativas entre analistas y equipos (18).

#### 7.5.6. EXACTITUD:

La exactitud fue evaluada utilizando quince determinaciones, sobre cinco niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado y tres repeticiones de cada una, siendo de 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración normal de trabajo del método, utilizando para la preparación de las muestras un estándar certificado (14).

Pesar una cantidad exacta cercana a 50.0 mg de clotrimazol estándar USP. Transferir a un balón aforado de 25 mL, agregar aproximadamente 10 mL de metanol y colocar en ultrasonido por 5 minutos, esperar a que el balón llegue a temperatura ambiente, luego aforar con el mismo solvente, tapar y agitar. Esta será la solución madre. De esta solución madre se toman alícuotas de 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mL y colocarlas en sus respectivos balones aforados de 10 mL y llevar a volumen con el solvente. Estas son las soluciones estándar de prueba.

A los balones con las alícuotas, incorporar aproximadamente 2 mL de solvente, someter a ultrasonido durante 5 minutos, dejar enfriar, diluir a volumen y mezclar. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.5 micrómetros o menor descartando los primeros 2 mL del filtrado. Usar el filtrado para determinar el área de las 5 soluciones de prueba, previa adecuación del sistema (14).

El orden de las inyecciones es el siguiente: estándar al 100% de la concentración de trabajo (es el estándar que se utilizó en la adecuación del sistema), solución estándar de prueba al 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, estándar al 100%, solución estándar de prueba al 50%, 75%, 100%, 125% y 150%; estándar al 100%,

solución estándar de prueba al 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. De manera que se lean los quince estándares de prueba preparadas (14).

Calcular el % de Recuperación con la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = (\text{mg determinados} / \text{mg pesados}) * 100\%$$

Calcular la desviación estándar, la media y el coeficiente de variación.

### **Criterios de Aceptación**

Al graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada, la pendiente debe ser mayor o igual a 0.95 y el intercepto debe ser igual a la concentración inicial (14).

% de Recobro: 95 a 105 %

Coefficiente de Variación menor o igual a 3.0 %

% recuperado vs. % adicionado

Pendiente (m) = mayor o igual a 0.95

Intercepto (b) = 0.03

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.98

Además de estos parámetros, se construyó y evaluó un intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación con la distribución t de Student, a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (18)

#### **7.5.7 Intervalo:**

El intervalo del método se evalúa verificando que el método analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo (6).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Precisión del Sistema

#### 8.1.2 Precisión del Sistema 1

ST Clotrimazol USP	<b>Área del pico</b>	
20.4mg/25mL= 0.816 mg/mL	Estándar 1	1850742
	Estándar 2	1860901
	Estándar 3	1867545
Equipo: Cromatógrafo Líquido	Estándar 4	1875878
de Alta Resolución Merck	Estándar 5	1886107
Hitachi Lachrom Clásico, No 3	Estándar 6	1891890
Criterio de Aceptación: $CV \leq 3.0\%$	<b>Promedio</b>	1872177,16700
	<b>Desviación estándar</b>	15520,35757
Analista A	<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,82900</b>

#### 8.1.2 Precisión del Sistema 2

ST Clotrimazol USP	<b>Área del pico</b>	
20.0mg/25mL= 0.800 mg/mL	Estándar 1	1791033
	Estándar 2	1856050
Equipo: Cromatógrafo Líquido	Estándar 3	1881298
de Alta Resolución Merck	Estándar 4	1881305
Hitachi Lachrom Clásico, No 2	Estándar 5	1884675
	Estándar 6	1900500
* Criterio de Aceptación: $CV \leq 3.0\%$	<b>Promedio</b>	1865810,16700
	<b>Desviación estándar</b>	39309,32414
Analista B	<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>2,10682</b>

### 8.1.3 Precisión del Sistema 3

ST Clotrimazol USP	<b>Área del Pico</b>	
20.0mg/25mL= 0.800 mg/mL	Estándar 1	1802355
	Estándar 2	1813634
Equipo: Cromatógrafo Líquido	Estándar 3	1817774
de Alta Resolución Merck	Estándar 4	1810620
Hitachi Lachrom Clásico, No 2	Estándar 5	1816069
	Estándar 6	1819235
* Criterio de Aceptación: $CV \leq 3.0\%$	<b>Promedio</b>	1813281,16700
	<b>Desviación estándar</b>	6164,30231
Analista A	<b>Coefficiente de Variación</b>	0,33995

### 8.2 Linealidad

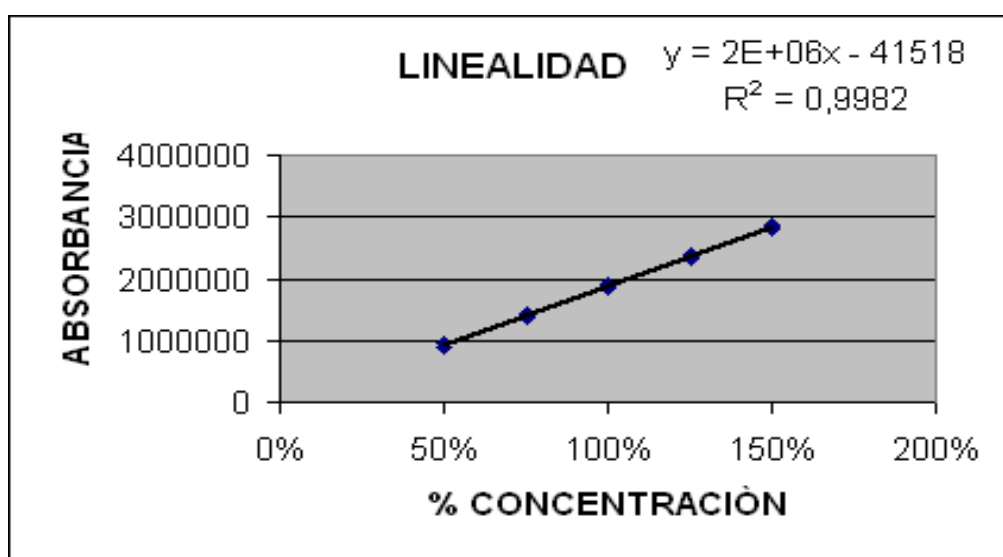
ST Clotrimazol USP	<b>Adecuación del Sistema</b>	<b>Área del pico</b>
20.4mg/25mL= 0.816 mg/mL	Estándar 1	1850742
	Estándar 2	1860901
Equipo: Cromatógrafo Líquido	Estándar 3	1867545
de Alta Resolución Merck	Estándar 4	1875878
Hitachi Lachrom Clásico, No 3	Estándar 5	1886107
	Estándar 6	1891890
Criterio de Aceptación: $CV \leq 3.0\%$	<b>Promedio</b>	1872177,16700
	<b>Desviación estándar</b>	15520,35757
Analista A	<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,82900</b>

Se trabajó con una solución madre de 50 mg de Estándar de Clotrimazol USP en 25 mL de metanol. De esta solución madre se tomaron alícuotas de 2, 3, 4, 5, y 6 mL diluidos en 10 mL de metanol, que corresponden al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de concentración.

Se obtuvieron los siguientes resultados

Concentración (%)	Área
50%	903987
50%	901173
50%	942829
75%	1369812
75%	1391462
75%	1446909
100%	1855517
100%	1884202
100%	1918645
125%	2321460
125%	2363529
125%	2400174
150%	2800351
150%	2840559
150%	2879245

La linealidad se calculó con la concentración de la solución y el área del pico obtenido.



Criterios de Aceptación:

- $r$  mayor o igual a 0,999
- $r^2$  mayor o igual a 0,998
- $b \leq 0,03$

Donde:

- $r$  = Coeficiente de correlación
- $r^2$  = Coeficiente de determinación
- $b$  = intercepto de la línea

Resultados obtenidos:

$r =$	0.9991
$r^2 =$	0.9982
$b=(41518/2879245) =$	0,01442

Se realizó una evaluación estadística de la recta para determinar la probabilidad sobre la ecuación obtenida para la linealidad, obteniéndose un valor de  $p = 3.3168E-19$ . Ver Anexo 5: Evaluación Estadística de la recta obtenida para la Linealidad

### 8.3 Exactitud

ST Clotrimazol USP

20.4mg/25mL= 0.816 mg/mL

Equipo: Cromatógrafo Líquido  
de Alta Resolución Merck

Hitachi Lachrom Clásico, No 3

Criterio de Aceptación:  $CV \leq 3.0\%$

Analista A

Adecuación del Sistema	Área del pico
Estándar 1	1850742
Estándar 2	1860901
Estándar 3	1867545
Estándar 4	1875878
Estándar 5	1886107
Estándar 6	1891890
<b>Promedio</b>	<b>1872177,16700</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>15520,35757</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,82900</b>

Los resultados fueron los siguientes:

Concentración Teórica (mg)	Concentración Determinada (mg)	% recuperación
0,4024	0,39401	97,91459
0,4024	0,39278	97,60979
0,4024	0,41094	102,12173
0,6036	0,59704	98,91335
0,6036	0,60648	100,47669
0,6036	0,63064	104,48049
0,8048	0,80874	100,48938
0,8048	0,82124	102,04288
0,8048	0,83625	103,90821
1,0060	1,01182	100,57879
1,0060	1,03016	102,40146
1,0060	1,04613	103,98913
1,2072	1,22055	101,10589
1,2072	1,23807	102,55758
1,2072	1,25494	103,95433
Promedio		<b>101,50295</b>
Desviación estándar		<b>2,19197</b>
Coeficiente de variación		<b>2,15952</b>

#### Fórmulas:

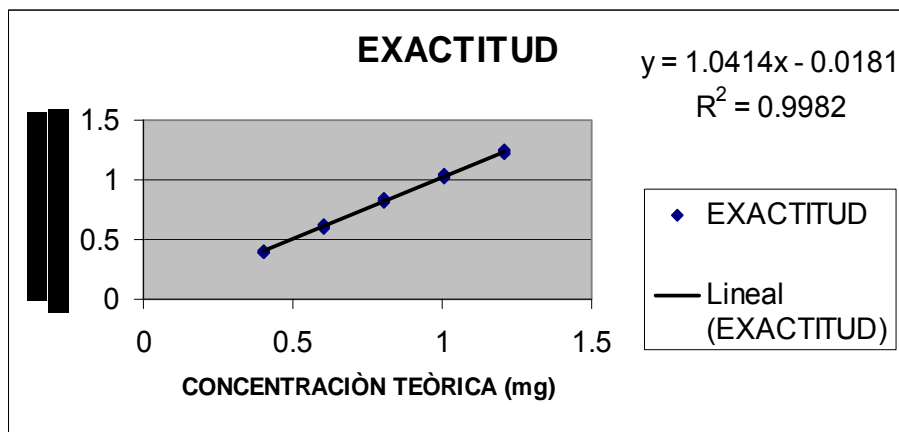
$$\text{Concentración Teórica: } \frac{\text{mg pesados}}{\text{volumen de aforo}} * \frac{\text{Alícuota}}{\text{volumen de aforo}}$$

$$\text{Concentración Determinada: } \frac{\text{Área Mx}}{\text{Área del Estándar}} * \text{Concentración del estándar}$$

$$\text{Concentración del Estándar: } \frac{\text{mg Pesados}}{\text{Volumen de aforo}}$$

$$\% \text{ Recuperación: } \frac{\text{Concentración determinada}}{\text{Concentración Teórica}} * 100$$





### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- $CV \leq 3\%$
- $b \leq 0,03$
- $m \geq 0,95$
- $r^2 \geq 0.98$
- % Recuperación: 95% -105%

Donde:

- CV es el coeficiente de Variación.
- b es el intercepto
- m es la pendiente

Resultados:

• CV =	2.1595
• b =	0.0181
• m =	1.0414
• $r^2$ =	0.9982
• % Recuperación	101.50%

Se obtuvo un Intervalo de Confianza del 95% para la media poblacional del porcentaje de recuperación con la distribución t de Student = 100.304 – 102.696%.

## 8.4 Precisión del Método <sup>1</sup>

### Adecuación del Sistema

ST Clotrimazol USP

20.4mg/25mL= 0.816 mg/mL

Equipo: Cromatógrafo Líquido  
de Alta Resolución Merck

Hitachi Lachrom Clásico, No 3

Criterio de Aceptación:  $CV \leq 3.0\%$

Analista A

Adecuación del Sistema	Área del pico
Estándar 1	1850742
Estándar 2	1860901
Estándar 3	1867545
Estándar 4	1875878
Estándar 5	1886107
Estándar 6	1891890
<b>Promedio</b>	<b>1872177,16700</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>15520,35757</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,82900</b>

### ANALISTA A

#### Muestra 1

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra A	21.29131	2010667	205.80269	102.90134
Muestra A1	21.26471	1954378	200.29141	100.14570
Muestra A2	21.15832	1925847	198.35987	99.17994
Muestra A3	21.21152	1967964	202.18954	101.09477
Muestra A4	21.19822	1965513	202.06441	101.03220
Muestra A5	21.21152	1955456	200.90446	100.45223
<b>Absorbancia del estándar</b>	1872177	<b>Promedio</b>		<b>100.80103</b>
		<b>Desviación Estándar</b>		<b>1.24339</b>
		<b>Coefficiente de Variación</b>		<b>1.23351</b>

<sup>1</sup> La Precisión del método se determina evaluando la respuesta del equipo utilizando las mismas condiciones de análisis. La precisión intermedia se determina al realizar el mismo análisis en diferente día, con diferente equipo y diferente analista.

**Muestra 2**

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra B	19.99893	1804933	99.54491	99.54491
Muestra B1	19.99893	1813200	100.00085	100.00085
Muestra B2	19.99893	1803666	99.47504	99.47504
Muestra B3	19.97229	1788942	98.79462	98.79462
Muestra B4	19.99893	1809980	99.82326	99.82326
Muestra B5	20.01226	1833080	101.02996	101.02996
<b>Absorbancia del estándar</b>	1813281.17	<b>Promedio</b>		99.77811
		<b>Desviación Estándar</b>		0.73922
		<b>Coeficiente de Variación</b>		0.74087

**Muestra 3**

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra C	21.28601	2008982	205.68142	102.84071
Muestra C1	21.31129	2009325	205.47251	102.73626
Muestra C2	21.38713	2060165	209.92432	104.96216
Muestra C3	21.28601	1998042	204.56138	102.28069
Muestra C4	21.26073	2040511	209.15780	104.57890
Muestra C5	21.26073	1982386	203.19983	101.59991
<b>Absorbancia del estándar</b>	1872177	<b>Promedio</b>		<b>103.16644</b>
		<b>Desviación Estándar</b>		<b>1.32283</b>
		<b>Coeficiente de Variación</b>		<b>1.28223</b>

**Criterio de aceptación:**

C.V.: Menor o igual al 2.5% para cada muestra

## Fórmulas

$$\text{mg pesados de Principio activo} = \frac{(\text{mg pesados} * \text{concentración Teórica})}{\text{peso promedio de las tabletas}}$$

$$\text{mg determinados} = \frac{\text{mg pesados}}{\text{absorbancia estándar}} * \frac{\text{Concentración estándar.}}{\text{Peso Muestra}} * \frac{\text{Volumen aforo}}{\text{alícuota}} * \text{Peso promedio tableta.}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración determinada}}{\text{concentración Pesada}} * 100$$

### Criterios de Aceptación:

CV :  $\leq 2.0 \%$

Intervalos de Confianza: 2 Desviaciones estándar (2S) Nivel de Confianza del 95%

## 8.4 Precisión Intermedia

### ANALISTA B

#### Adecuación del Sistema

ST Clotrimazol USP

20.0mg/25mL= 0.800 mg/mL

Equipo: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Merck

Hitachi Lachrom Clásico, No 2

\* Criterio de Aceptación: CV  $\leq 3.0\%$

Analista B

	Área del pico
Estándar 1	1791033
Estándar 2	1856050
Estándar 3	1881298
Estándar 4	1881305
Estándar 5	1884675
Estándar 6	1900500
<b>Promedio</b>	1865810,16700
<b>Desviación estándar</b>	39309,32414
<b>Coficiente de Variación</b>	<b>2,10682</b>

**Muestra 1**

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra A	19,98803	1874502	201,05201	100,52601
Muestra A1	20,00133	1897749	203,41006	101,70503
Muestra A2	20,01463	1872083	200,52573	100,26286
Muestra A3	20,01463	1869190	200,21585	100,10792
Muestra A4	19,97473	1866004	200,27380	100,13690
Muestra A5	19,97473	1913180	205,33709	102,66854
<b>Absorbancia del estándar</b>	1865810,17	<b>Promedio</b>		100,90121
		<b>Desviación estándar</b>		1,05179
		<b>Coefficiente de Variación</b>		1,04240

**Muestra 2**

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra B	20,03890	1914524	102,41165	102,41165
Muestra B1	20,05223	1904643	101,81540	101,81540
Muestra B2	20,02558	1890850	101,21258	101,21258
Muestra B3	20,03890	1879092	100,51632	100,51632
Muestra B4	20,02558	1883772	100,83371	100,83371
Muestra B5	20,03890	1937848	103,65930	103,65930
<b>Absorbancia del estándar</b>	1865810,17	<b>Promedio</b>		101,74149
		<b>Desviación estándar</b>		1,16081
		<b>Coefficiente de Variación</b>		1,14094

### Muestra 3

	mg. Pesados de Principio activo	Absorbancia	mg Determinados	% recuperación
Muestra C	20.04727	1875318	200.29256	100.27257
Muestra C1	20.07255	1870045	200.23374	99.864689
Muestra C2	20.02199	1899784	202.90564	101.70901
Muestra C3	20.07255	1880144	201.56960	100.40400
Muestra C4	19.99671	1874067	199.90717	100.45904
Muestra C5	20.09783	1875318	200.54513	100.02031
<b>Absorbancia del estándar</b>	1865810.17	<b>Promedio</b>		100.45494
		<b>Desviación estándar</b>		0.65511
		<b>Coefficiente de Variación</b>		0.65215

#### Criterio de aceptación:

C.V.: Menor o igual al 2.5% para cada muestra

Intervalos de Confianza: 2 Desviaciones estándar (2S) Nivel de Confianza del 95%

#### Fórmulas

mg pesados de Principio activo =  $\frac{(\text{mg pesados} * \text{concentración Teórica})}{\text{peso promedio de las tabletas}}$

mg determinados =  $\frac{\text{mg pesados}}{\text{absorbancia estándar}} * \frac{\text{Concentración estándar.}}{\text{Peso Muestra}} * \frac{\text{Volumen aforo}}{\text{alícuota}} * \text{Peso promedio tableta.}$

% Recuperación =  $\frac{\text{Concentración determinada} * 100}{\text{concentración Pesada}}$

#### Criterios de Aceptación:

Coefficiente de Variación:  $\leq 3.0\%$  (6) entre analistas

Realizar un análisis de Varianza de dos vías para establecer si hay diferencias significativas entre analistas y equipos (13).

## Comparación entre Analistas

### Muestra A

	<b>Analista A</b>	<b>Analista B</b>		
	<b>% Recuperación</b>	<b>% Recuperación</b>		
<b>Muestra A1</b>	102.90134	100.52601		
<b>Muestra A2</b>	100.14570	101.70503		
<b>Muestra A3</b>	99.17994	100.26286		
<b>Muestra A4</b>	101.09477	100.10792		
<b>Muestra A5</b>	101.03220	100.13690		
<b>Muestra A6</b>	100.45223	102.66854	<b>Entre Analistas</b>	
<b>Promedio</b>	100.80103	100.90121	<b>Promedio</b>	100.85112
<b>Desviación Estándar</b>	1.24340	1.05179	<b>Desviación Estándar</b>	0.070838
<b>Coficiente de Variación.</b>	1.23351	1.04240	<b>Coficiente de Variación.</b>	0.070240

### Muestra B

	<b>Analista A</b>	<b>Analista B</b>		
	<b>% recuperación</b>	<b>% recuperación</b>		
<b>Muestra B1</b>	99.54491	102.41165		
<b>Muestra B2</b>	100.00085	101.81540		
<b>Muestra B3</b>	99.47504	101.21258		
<b>Muestra B4</b>	98.79462	100.51632		
<b>Muestra B5</b>	99.82326	100.83371		
<b>Muestra B6</b>	101.02996	103.65930	<b>Entre Analistas</b>	
<b>Promedio</b>	99.77811	101.74149	<b>Promedio</b>	100.75980
<b>Desviación Estándar</b>	0.73922	1.16081	<b>Desviación Estándar</b>	1.38832
<b>Coficiente de Variación.</b>	0.74087	1.14094	<b>Coficiente de Variación.</b>	1.37785

**Muestra C**

	<b>Analista A</b>	<b>Analista B</b>		
	<b>% recuperación</b>	<b>% recuperación</b>		
<b>Muestra C1</b>	102.84071	100.27257		
<b>Muestra C2</b>	102.73626	99.86469		
<b>Muestra C3</b>	104.96216	101.70901		
<b>Muestra C4</b>	102.28069	100.40400		
<b>Muestra C5</b>	104.57890	100.45904		
<b>Muestra C6</b>	101.59991	100.02031		
<b>Promedio</b>	103.16644	100.45494	<b>Entre Analistas</b>	
<b>Desviación Estándar</b>	1.32283	0.65511	<b>Promedio</b>	100.81011
<b>Coeficiente de Variación.</b>	1.28223	0.65215	<b>Desviación Estándar</b>	1.91732
			<b>Coeficiente de Variación.</b>	1.90191

**Análisis de Varianza**

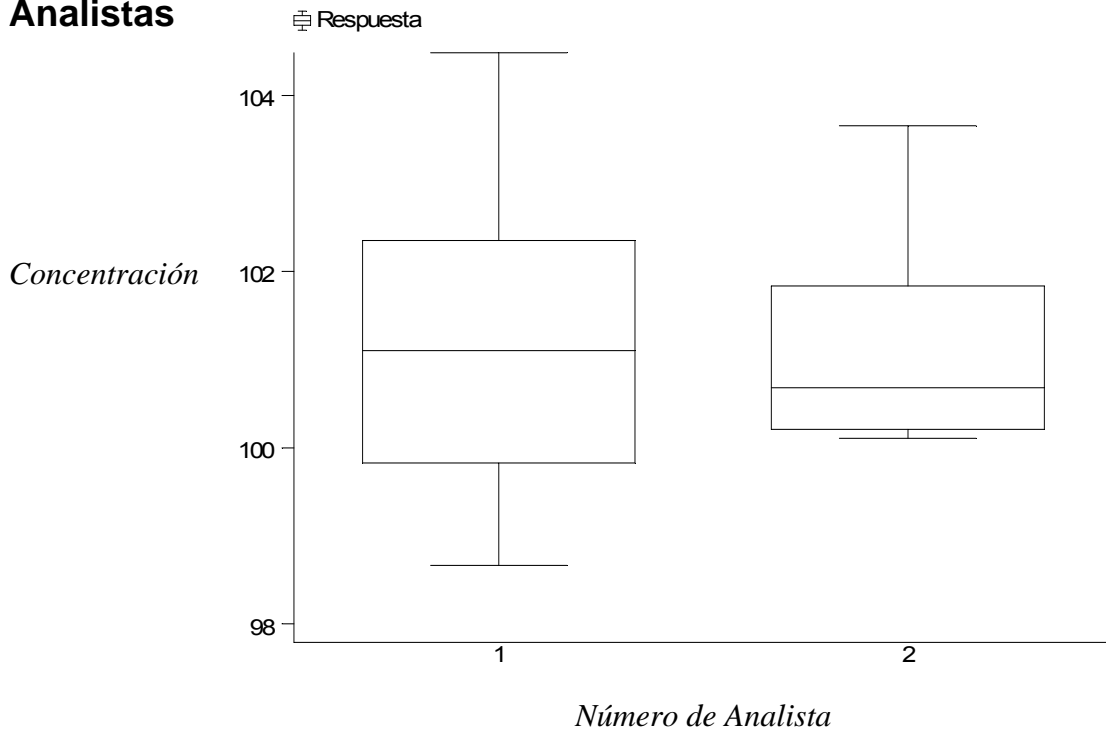
<b>Analista</b>	<b>Muestras</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Analista</b>	<b>Muestras</b>	<b>Respuesta</b>
1	1	102.90134	2	2	102.41165
1	1	100.14570	2	2	101.815399
1	1	99.17994	2	2	101.212576
1	1	101.09477	2	2	100.516322
1	1	101.03220	2	2	100.833708
1	1	100.45223	2	2	103.659296
2	1	100.526007	1	3	102.840712
2	1	101.705031	1	3	102.736256
2	1	100.262863	1	3	104.96216
2	1	100.107923	1	3	102.280688
2	1	100.1369	1	3	104.578899
2	1	102.668544	1	3	101.599915
1	2	99.5449151	2	3	100.272567
1	2	100.000853	2	3	99.8646887
1	2	99.4750381	2	3	101.709013
1	2	98.7946246	2	3	100.403998
1	2	99.8232652	2	3	100.459041
1	2	101.029958	2	3	100.020309



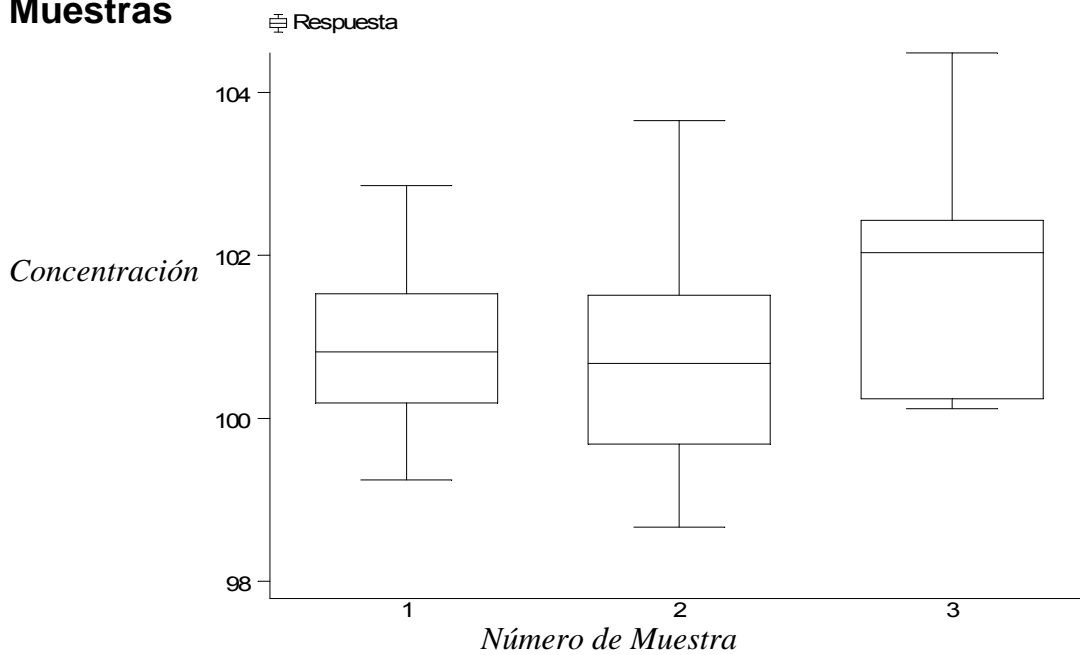
## ANÁLISIS DE VARIANZA

Se realizó un análisis de varianza para la evaluación entre analistas y muestras y se encontró que no existe diferencia significativa entre analistas ( $p=0.9173$ ), ni entre muestras ( $p=0.1522$ ) para un nivel de significancia=0.05

### Analistas



### Muestras



## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Previo a realizar la estandarización del método, se evaluó la columna a utilizar, determinando la cantidad de platos teóricos de la columna utilizada en el estudio, para ello se utilizaron estándares de uracilo y tolueno; el resultado fue satisfactorio, ya que la columna obtuvo más de 1000 platos teóricos para el primer estándar y en el segundo estándar se obtuvieron más de 2000 platos teóricos, lo que indica que la columna utilizada tiene las condiciones óptimas para su uso, el factor de simetría fue de 1.79 y 1.04, respectivamente, lo cual está dentro del rango aceptado que es menor de 2.0 (Ver anexo 1: Determinación de platos teóricos) (1). Por otra parte, el equipo utilizado en la estandarización tuvo una calibración y verificación constante por parte de personal calificado, lo cual asegura que los equipos estaban funcionando de manera adecuada, y la última verificación de la balanza se realizó 4 meses previo a realizar el análisis y se recomiendan calibraciones cada 6 meses para asegurar el buen funcionamiento de la balanza (Ver anexo 2: Calibración de la balanza). Por otra parte, a los equipos de cromatografía Líquida de Alta Resolución se les realizó la verificación de su funcionamiento 3 meses antes de la realización del estudio, esto asegura que el equipo se encontraba en óptimas condiciones para realizar la estandarización (Ver Anexo 3: Verificación de Cromatógrafos Líquidos).

En la evaluación de los parámetros se utilizó Estándar de Clotrimazol USP para determinar la especificidad, precisión del sistema, linealidad y exactitud. Para la determinación de la precisión del método y la precisión intermedia se utilizaron óvulos sólidos de tres laboratorios fabricantes diferentes, analizados por dos analistas diferentes.

Previo a analizar los parámetros antes descritos se realizó una adecuación del sistema, utilizando para ello 6 lecturas de un estándar de Clotrimazol USP al 100% de la concentración de trabajo (0.800 mg/mL). La adecuación del sistema fue satisfactoria, ya que el coeficiente de variación (CV)

fue menor que el máximo permitido (3%) en cada uno de los casos. Se evaluó la precisión del sistema en tres ocasiones debido a que el análisis de la muestra B del Analista A se realizó en diferente día, para evitar la sobresaturación de la columna utilizada y en las tres ocasiones, el coeficiente de variación obtenido fue menor del 3%, por lo cual se demuestra que el sistema utilizado tiene la precisión requerida para su utilización.

Para evaluar la especificidad se evaluó una solución blanco, la cual no contenía el Principio Activo a evaluar (Clotrimazol) y fue preparado de la misma manera que la solución estándar al 100% de la concentración de trabajo y la muestra a la misma concentración, la solución blanco no presentó ningún pico en el tiempo de retención del principio activo analizado y además se realizó una comparación entre el tiempo de retención que presenta el estándar de Clotrimazol y las muestras de Clotrimazol analizadas por duplicado. En la identificación del analito se obtuvo un Tiempo de Retención (TR) entre +/- 1% del Tiempo de Retención del estándar en la misma secuencia y los picos obtenidos en la gráfica tienen una buena resolución (Ver Anexo 4: Cromatogramas obtenidos), con lo cual se demuestra la especificidad del método. La muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar. Para realizar esta evaluación el cromatograma incluye un listado de sustancias con sus correspondientes tiempos de retención.

Para evaluar la Linealidad, se trabajó con una solución madre de Estándar de Clotrimazol USP, de la cual se prepararon soluciones al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración de trabajo, evaluando cada solución por triplicado; y con las mismas se realizó una curva de calibración, la cual dió un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9991, lo que indica que hay relación entre las mediciones y las concentraciones del analito. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido (0.9982) demuestra que la curva de regresión se ajusta a los valores experimentales de las mediciones obtenidas. El intercepto de la línea ( $b$ ) cumplió con el criterio de aceptación, ya que el resultado fue de

0.01442, y el esperado debía ser  $\leq 0.03$ ; lo que indica que no se obtiene una absorbancia significativa cuando la concentración del analito es 0 y la relación lineal fue significativa ( $p = 3.3168E-19$ ). Esto demuestra que el área obtenida en unidades de absorbancia en cada nivel de concentración es proporcional a dicha concentración, y los resultados son predecibles cuando se trabaje en el intervalo de concentración evaluado.

El parámetro de Exactitud se evaluó a través del porcentaje de recuperación obtenido para 5 niveles de concentración de trabajo (50%, 75%, 100%, 125% y 150%) a través de soluciones preparadas a partir de una solución madre de estándar y realizando tres lecturas de cada solución. Este parámetro se evaluó de esta manera debido a que el Laboratorio Nacional de Salud recibe una gran diversidad de matrices para analizar y no se puede unificar o estandarizar la matriz utilizada para este tipo de forma farmacéutica. Los porcentajes de recuperación obtenidos están dentro del rango de 97.6% a 104.5%, que está dentro del rango de aceptación, que es del 95% - 105%, por lo que hay concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero. El Coeficiente de Variación obtenido en la evaluación de este parámetro es de 2.15, que es menor al límite aceptado, que es de 3%, por lo que los resultados obtenidos cumplen con este requisito. El intercepto de la línea (b) es menor del 3%. El valor obtenido fue de 0.0181. La pendiente (m) debe ser mayor de 0.95 y en el presente estudio se obtuvo una pendiente de 1.0414. También se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) que se obtuvo un resultado de 0.9982, que es mayor del valor límite (0.98), lo que indica que hay relación entre las mediciones y la concentración del analito. De acuerdo al intervalo de confianza construido a través de la distribución t de Student a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , el parámetro evaluado está contenido dentro del intervalo, y cumple con el criterio de aceptación. Esto demuestra que el método es exacto.

En la determinación de la precisión del método, se evaluaron tres muestras de óvulos sólidos, de diferentes casas farmacéuticas y diferentes lotes, utilizando seis soluciones al 100% de la concentración de trabajo, pesadas individualmente. Al analizar estas soluciones por un mismo analista, el mismo día, se obtuvo un coeficiente de variación para las tres muestras entre 0.74 y 1.28, estos valores están dentro del criterio de aceptación, el cual debe ser menor o igual al 2.5%.

También se evaluó la Precisión Intermedia, analizando las mismas muestras, preparando 6 soluciones de forma individual de cada muestra realizadas por un analista distinto, diferente día y en un equipo diferente. Al evaluar las muestras, se obtuvo un coeficiente de variación entre 0.65 y 1.14, que está dentro del rango permitido que es menor o igual a 2.5%, que es el rango aceptado para la precisión del método. Para la Precisión Intermedia se debe obtener un coeficiente de Variación menor de 3.0 entre los análisis realizados por diferentes analistas, diferentes días y diferente equipo. En el presente estudio se logró determinar que el Coeficiente de Variación para este parámetro está dentro del rango de 0.079-1.28, que es menor al límite aceptado. Por lo que se puede indicar que el método de análisis de Clotrimazol tiene una precisión Intermedia adecuada al trabajar en diferentes días, diferentes analistas y diferentes equipos. También se realizó un análisis de varianza de dos vías para establecer si hay diferencias significativas entre analistas y equipos. El resultado obtenido al realizar la comparación entre los resultados obtenidos por diferentes analistas se obtuvo un valor de  $p = 0.9173$  y al comparar los resultados obtenidos en las muestras al analizarlas en equipos diferentes se obtuvo un valor de  $p = 0.1522$ , por lo que se demuestra que no hay diferencia significativa entre los análisis efectuados por analistas diferentes, ni por equipos diferentes.

Con los resultados anteriormente presentados se prueba que el método de Análisis de Clotrimazol en óvulos sólidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución evaluado en el presente estudio cumple con los parámetros de

Precisión del Sistema, Linealidad, Exactitud y Precisión del método, Precisión Intermedia y Especificidad, necesarios para instituirlo como un método de análisis estandarizado para su utilización en el Laboratorio Nacional de Salud, utilizando las condiciones establecidas en el presente estudio.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método de Análisis de Clotrimazol en óvulos sólidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución evaluado cumple con los parámetros de Precisión del Sistema, Linealidad, Exactitud y Precisión del método, Precisión Intermedia y Especificidad.
- 10.2 El método utilizado cuenta con una precisión del sistema aceptable, ya que los resultados no varían de una manera significativa cuando se evalúan repetidas veces muestras homogéneas.
- 10.3 El método es específico para el análisis de Clotrimazol, ya que no se presenta ningún pico en el tiempo de retención de Clotrimazol; es lineal, ya que el área obtenida en unidades de absorbancia en cada nivel de concentración es proporcional a dicha concentración y es exacto, ya que hay concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero.
- 10.4 El método de análisis de Clotrimazol tiene una precisión adecuada al evaluar una muestra homogénea repetidas veces bajo las mismas condiciones y una precisión Intermedia adecuada al trabajar en diferentes días, diferentes analistas y diferentes equipos.
- 10.5 El método de Análisis de Clotrimazol en óvulos sólidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución cumple con los parámetros necesarios para instituirlo como un método de análisis estandarizado para su utilización en el Laboratorio Nacional de Salud, utilizando las condiciones establecidas en el presente estudio, debido a la confiabilidad del mismo.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Para evaluar el parámetro de especificidad, se podrían realizar evaluaciones con matrices de diferentes laboratorios fabricantes para poder tener un dato más amplio de la especificidad.
- 11.2 En la evaluación de la exactitud, se puede evaluar también con enriquecimiento de la muestra con adición de estándar, pero esto se debe hacer con muestras que cuenten con un certificado del fabricante y que pueda facilitar la obtención de la matriz para realizar esta técnica.
- 11.3 Para poder evaluar más ampliamente el método se debería realizar una comparación de los resultados obtenidos con el presente estudio comparado con los obtenidos con el análisis realizado con un método normalizado.



## 12. REFERENCIAS

- 12.1. Bloom, Joseph Dr. 2006. Curso de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- 12.2. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª Edición. Vol I. McGraw-Hill. 2003. México.
- 12.3. Katzung, Bertram G. Farmacología Básica y Clínica. 8ª Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. 2002. México, D.F.
- 12.4. Martindale. The Complete Drug Reference. 34<sup>th</sup> Edition. Pharmaceutical Press. 2005. United States of America. Pag. 569.
- 12.5. Drug Information for the Health Care Professional USP DI. Volume 1. 26<sup>th</sup> Edition. Editorial Thomson Micromedex. 2006. Estados Unidos de América. Pag. 928
- 12.6. Farmacopea de los Estados Unidos. El Formulario Nacional. Edición XXIX Versión en Español. Convención de Farmacopeica de Estados Unidos. 2006. Estados Unidos.
- 12.7. British Pharmacopoeia CD-ROM. Volume I & II. Medicinal and Pharmaceutical Substances. 2003
- 12.8. Procedimiento Analítico de Clotrimazol. Manual de Procedimientos del Área de Físicoquímico de Medicamentos. Laboratorio Nacional de Salud. 2004. Guatemala.
- 12.9. Castillo Aguilar, Beatriz. González Hernández, Rolando. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos. Revista Cubana Farmacia 1997. Cuba. 9 p.

- 12.10. NORMA GUATEMALTECA RECOMENDADA COGUANOR NGR/ ISO/IEC 17 025 1ª. Revisión Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. 2001. Guatemala
- 12.11. Pappa, H. N. 2005. Buenas Prácticas de Control de Calidad. Costa Rica.
- 12.12. Procedimiento para la validación de métodos analíticos por HPLC. Manual de procedimiento para la Validación de métodos analíticos por HPLC. Laboratorio Nacional de Salud. Área de Contaminantes de Ambiente y Salud. 2005. Guatemala.
- 12.13. Baudritt, Olga., et. al. Guía de Validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos Ligeramente Modificados o Mejor Definidos. 2005. Costa Rica.
- 12.14. Protocolo de Verificación del Método de Análisis de Cuantificación de Acetaminofén Tabletas de 500 mg por Cromatografía Líquida de Alta Presión. Laboratorio Nacional de Salud. Área de Físicoquímico de Medicamentos. 2006. Guatemala
- 12.15. Salguero, Rómulo E. Estadística y Estadística Comparativa. 2006. Guatemala.
- 12.16. Millar, James N, Millar, Jane C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta edición (1ª edición en Español). Prentice Hall. 2002. España. 150 p.
- 12.17. Procedimiento de Validación de Métodos de Analíticos no Normalizados. Laboratorio Nacional de Salud. Área de Físicoquímico de Medicamentos. Revisión No. 1. Año 2006. Guatemala.

- 12.18. Nave Herrera, Oscar Federico. Herramientas de Estadística y Computación Aplicadas al Control de Calidad en los Análisis. Modulo 5. Diplomado de Sistemas de Gestión de la Calidad para Laboratorio con base en las Normas COGUANOR ISO 17025:2005 e ISO 15189:2003. 2006. Guatemala
- 12.19. Harris, Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª Edición. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. 1992. México.
- 12.20. Anleu Lainfiesta, Rossana. Validación del Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la Cuantificación de Ibuprofeno en Suspensión. Guatemala 2000. 52 p. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
- 12.21. Baudrit Carrillo, Olga. 2005. Validación de Procedimientos de Análisis de Medicamentos. Universidad de Costa Rica. 10 p.
- 12.22. Baudrit Carrillo, Olga. 2005 Protocolo de Validación de Procedimientos de Análisis de Medicamentos. Costa Rica. 14 p.
- 12.23. Bloom, Joseph Dr. 2005 Aspectos Generales e Importancia de la Validación de Metodología Analítica en la Práctica Farmacéutica. Universidad de Puerto Rico. Escuela de Farmacia. VII Asamblea General de la conferencia Hispanoamericana de Facultades de Farmacia. Guatemala. 9 p.
- 12.24. Alvarado, Zoila., et al 2000. Propuesta de un Reglamento para los Estudios de Validación de Métodos Analíticos Requeridos para el Registro Sanitario de Medicamentos ante el Ministerio de Salud de la República de Costa Rica. Comisión Nacional de Calidad de Medicamentos. Subcomisión de Validación y Acreditación de Métodos Analíticos. Costa Rica 2000.

- 12.25. Franco Flores, Anabelly Carolina. 2002. Guía para Validación de Métodos Analíticos Nuevos o Modificados para productos Farmacéuticos. Guatemala; 45 p. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
- 12.26. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Guideline form submitting samples and analytical data for methods validation. 1987. United States of America.

# ANEXOS

# Anexo No. 1

## Determinación de platos teóricos

D-7000 HSM: Samples      Series: 0387      Report: modified      System: Sys 2

**D-7000 HPLC System Confidence Report**

Analyzed: 28/08/06 01:59 p.m.      Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION      Series: 0387  
 System(acquisition): Sys 2      Vial Number: 3  
 Application: Samples      Vial Type: STD1  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB.      Volume: 50.0 ul  
 Injection from this vial: 1 of 6  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

**System Suitability Report (Full Width)**

RT of Non-Retained Peak: 0.01 min

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9.53	CLOTRIMAZOL	952.33	1.20	1317	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 1.400  
 No. of theoretical plates warning at less than: 1000  
 Resolution warning at less than: 0.800  
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

Page Indicator 9 / 26

D-7000 HSM: Samples      Series: 0387      Report: modified      System: Sys 2

**D-7000 HPLC System Confidence Report**

Analyzed: 28/08/06 02:13 p.m.      Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION      Series: 0387  
 System(acquisition): Sys 2      Vial Number: 3  
 Application: Samples      Vial Type: STD1  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB.      Volume: 50.0 ul  
 Injection from this vial: 2 of 6  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

**System Suitability Report (Full Width)**

RT of Non-Retained Peak: 0.01 min

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9.49	CLOTRIMAZOL	948.33	1.19	1320	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 1.400  
 No. of theoretical plates warning at less than: 1000  
 Resolution warning at less than: 0.800  
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

Page Indicator 11 / 26

D-7000 HSM: Samples      Series: 0387      Report: modified      System: Sys 2

### D-7000 HPLC System Confidence Report

Analyzed: 28/08/06 02:27 p.m.

Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
Processed: 29/08/06 09:41 a.m.

Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
System(acquisition): Sys 2  
Application: Samples  
Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB.  
Injection from this vial: 3 of 6  
Sample Description:

Series: 0387  
Vial Number: 3  
Vial Type: STD1  
Volume: 50.0 ul

Chrom Type: HPLC Channel : 1

#### System Suitability Report (Full Width)

RT of Non-Retained Peak: 0.01 min

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9.48	CLOTRIMAZOL	947.00	1.20	1317	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 1.400  
No. of theoretical plates warning at less than: 1000  
Resolution warning at less than: 0.800  
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HSM: Samples      Series: 0387      Report: modified      System: Sys 2

### D-7000 HPLC System Confidence Report

Analyzed: 28/08/06 02:27 p.m.

Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
Processed: 29/08/06 09:41 a.m.

Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
System(acquisition): Sys 2  
Application: Samples  
Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB.  
Injection from this vial: 3 of 6  
Sample Description:

Series: 0387  
Vial Number: 3  
Vial Type: STD1  
Volume: 50.0 ul

Chrom Type: HPLC Channel : 1

#### System Suitability Report (Full Width)

RT of Non-Retained Peak: 0.01 min

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9.48	CLOTRIMAZOL	947.00	1.20	1317	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 1.400  
No. of theoretical plates warning at less than: 1000  
Resolution warning at less than: 0.800  
Signal to noise ratio warning at less than: 3



# Anexo No. 2

## Calibración de la Balanza Analítica



Ingeniería de Servicios  
5 calle 20-15 z. 11 Mirador 1  
Tel 24401701 Fax 2474797  
email: ids@itelgua.com

## Certificado de Servicio Balanzas

Cliente *Laboratorio Nacional de Salud*  
Dirección *Salud*  
Marca *METTLER*  
Ubicación de la unidad *Fisicoquímica de Medicamentos*  
Modelo *AE 200*  
No. de serie *G 2189 Z*  
Código Interno: *B-01-FQM*

Fecha del servicio *12/04/2006*  
Frecuencia recomendada *7 veces al año*  
Fecha del último servicio  
Nombre del usuario  
Llamada número  
Numero de inventario:

### PRUEBAS DE ELECTRONICAS

Revisión de:	DVM	¿Se reviso?	Observaciones
Voltajes de la fuente de alimentación		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input checked="" type="checkbox"/> no <i>FUNCIONA correctamente</i>
Power Supply		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>FUNCIONA correctamente</i>
Tarjeta Microprocesadora		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>FUNCIONA correctamente</i>
Tarjeta controladora de servomotores		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>FUNCIONA correctamente</i>
Revisión del estado de la celda de carga		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>FUNCIONA correctamente</i>
Revisión del estado de la cámara		<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>se encontro en buen estado</i>

**Calibración de:**

Calibración de peso	<input type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no
	<input checked="" type="checkbox"/> si	<input type="checkbox"/> no <i>se calibro ver certificado NO. 705</i>

¿Se reviso?  si  no

Recomendaciones

Limpieza general  si  no

Comentarios (Acciones correctivas realizadas, explicación de resultados).

NINGUNA ACCION RECOMENDADA

### Parámetros

- Los métodos aquí utilizados son los recomendados por el fabricante en el manual de servicio de los instrumentos.
- Los límites de precisión y exactitud están limitados al modelo del instrumento y se encuentran especificados en el manual del usuario.

Este certificado a sido diseñado para verificar el correcto funcionamiento del instrumento según las especificaciones del fabricante, y el instrumento que arriba se señala si (✓) no ( ) cumple las pruebas realizadas.



**Certificado de Calibración**  
No. 2006:ES00105

CALLE 49-115 D, APT. 2000007 01913  
Tel: 2461781 Fax: 2461781  
e-mail: [ils@ilcuba.com](mailto:ils@ilcuba.com)

Identificación del instrumento: Balanza analítica

Fabricante: METTLER Modelo: AB 260  
Estándar Utilizado: SET DE MASAS Serie interna: B-01-FQM  
Set de masas 1mg-100g NIST Ref. 822768214-43 Serie: 06-J294312 Vencimiento: 27/02/2007

Numero de levantamiento: 128345-4.1-1-289  
G21892

Información de la certificación

Como se usará: En uso Fecha de calibración: 18/04/2006  
Como se dejó: En tolerancia Fecha de vencimiento: 18/04/2007  
Procedimiento: T0111 Técnico: 03

Condiciones ambientales promedio: Temperatura: 25 °C HR: 65 %

Características del instrumento:

Campo de medición: 1mg - 20g

Sensibilidad: 0.0001g

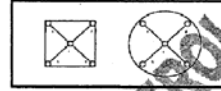
Método de calibración: El instrumento fue calibrado por comparación directa contra patrones con registro de trazabilidad a patrones del NIST.

Matriz de resultados:

REPETIBILIDAD CON MASA DE 20 gramos		
Ensayo	Real	Error
1	20.0003	-0.002
2	20.0003	0.000
3	20.0009	-0.001
4	20.0001	0.000
5	20.0002	0.000
6	20.0003	0.000
7	20.0008	-0.001
8	20.0005	0.000
9	20.0006	-0.001
10	20.0003	-0.00030
Incertidumbre Clase A 0.00013		

LINEALIDAD PARA 0.0000 gramos		
Masa patrón	Real	Error
0.00100	0.0010	0.0000
0.00200	0.0019	0.0001
0.00500	0.0048	0.0002
0.01000	0.0098	0.0002
0.02000	0.0200	0.0000
0.05000	0.0499	0.0001
0.10000	0.0999	0.0001
0.20000	0.1999	0.0001
0.50000	0.4999	0.0001
1.00000	1.0000	0.0000
Incertidumbre Clase A 0.00002		

Excentricidad masa de 200 miligramos		
POSICION	Real	Error
1	0.1968	0.0002
2	0.1999	0.0002
3	0.1967	0.0003
4	0.1997	0.0003
5	0.1997	0.0003
Incertidumbre Clase A 0.00002		



El presente certificado solo ampara las mediciones realizadas en el momento y condiciones ambientales d uso, en que se realizó esta calibración. No certifica ninguna característica del instrumento.

Es responsabilidad del cliente recalibrar el instrumento en intervalos apropiados. Estas mediciones se trazables a los patrones utilizados, los cuales son intercomparados periódicamente con patrones internacionales. La incertidumbre de este certificado incluye posibles cambios causados por la deriva largo plazo en la respuesta del instrumento. Estos deben de ser determinados individualmente por el usuario, con base en los datos históricos del instrumento. La incertidumbre es calculada en base a la gui de ISO GUM (guide to expression of uncertainty in measurement). La incertidura es incluida con un factor K=2 y una confiabilidad del 95%. El signo en solencia indica que las mediciones caen dentro de lo límites de la incertidumbre.

Este certificado tiene validez únicamente en su forma integral y original. Consta de dos páginas.

Calibrado por:

**Anexo No. 3**  
**Verificación de**  
**Cromatógrafos**  
**Líquidos**

Merck, S. A.  
 Area Química  
 Departamento Servicio Técnico  
 Teléfono: 2410-2300  
 Fax químicos: 2434-2954  
 quimicos@merck.com.gt

**REPORTE TECNICO**  
**FA No. 10**

Nº 8968

FECHA: 16/06/06 PAIS: Guat  
 CLIENTE: Lab. Alac de Salud  
 DIRECCIÓN: km 27 Carretera al Pacífico DISTANCIA RECORRIDA: \_\_\_\_\_  
 PERSONA CONTACTO: Milla TELÉFONO: 66306014  
 TRABAJO SOLICITADO: Mant Preventiva

EQUIPO: La Chem Clásico No. SERIE: 336-016

**CLASE DE SERVICIO**

1. INSTALACIÓN	<input type="checkbox"/>	Consumo/Contrato/Garantía <input type="checkbox"/> Cargar costos a: _____ Facturable <input type="checkbox"/>
2. SERVICIO / CALIBRACIÓN	<input checked="" type="checkbox"/>	
3. REPARACIÓN	<input type="checkbox"/>	
4. ASESORIA TÉCNICA	<input type="checkbox"/>	

**TRABAJO REALIZADO**

Se realizó limpieza y mant. grad. Se corrieron los  
gas de repetibilidad del autotransmisor y de los hidruca

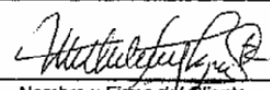
Horas de Servicio: 6 + Horas de Viaje: \_\_\_\_\_ = Horas Totales \_\_\_\_\_ (Horas Extras: \_\_\_\_\_)

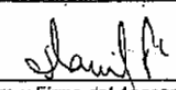
Repuestos No.	Descripción	Cantidad
1.	<u>Elemento filtro line</u>	<u>1</u>
2.	<u>Emp. int. vale</u>	<u>4</u>
3.	<u>Emp. ext. vale</u>	<u>2</u>
4.	_____	_____

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

  
 Nombre y Firma del Cliente  
Milla Cruz,

  
 Nombre y Firma del Asesor Téc

# Anexo No. 4

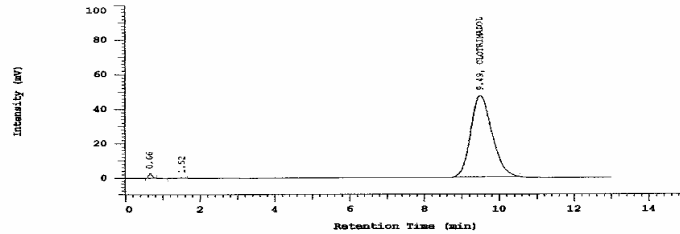
## Cromatogramas

D-7000 HSM: Samples Series: 0387 Report: modified System: Sys 2

## LABORATORIO NACIONAL DE SALUD

Analyzed: 28/08/06 02:13 p.m. Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0387\  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 System(acquisition): Sys 2 Series:0387  
 Application: Samples Vial Number: 3  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB. Vial Type: STD1  
 Injection from this vial: 2 of 6 Volume: 50.0 ul  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 Column Type: Developed by: ANGELA SAMOL  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: ACETONITRILLO Solvent B: AGUA  
 Solvent C: METANOL Solvent D: FASE MOVIL  
 Method Description: FASE MOVIL BUFFER FOSFATO DE AMONIO/ METANOL 30/70,  
 PH:7.0 CON ACIDO FOSFORICO, LONGITUD DE ONDA 254nm, FLUJO  
 2.0 mL/min COLUMNA C18 CORTA

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD  
 Scale Factor 1: 1.000

Name	RT	Area	Height
	0.66	18243	2853
	1.52	5507	253
CLOTRIMAZOL	9.49	1860901	47103
		1884651	50211

Peak rejection level: 0

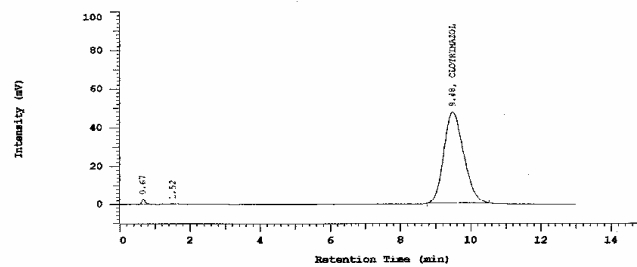
Page Indicator 10 / 26

D-7000 HSM: Samples Series: 0387 Report: modified System: Sys 2

## LABORATORIO NACIONAL DE SALUD

Analyzed: 28/08/06 02:27 p.m. Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0387\  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 System(acquisition): Sys 2 Series:0387  
 Application: Samples Vial Number: 3  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB. Vial Type: STD1  
 Injection from this vial: 3 of 6 Volume: 50.0 ul  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 Column Type: Developed by: ANGELA SAMOL  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: ACETONITRILLO Solvent B: AGUA  
 Solvent C: METANOL Solvent D: FASE MOVIL  
 Method Description: FASE MOVIL BUFFER FOSFATO DE AMONIO/ METANOL 30/70,  
 PH:7.0 CON ACIDO FOSFORICO, LONGITUD DE ONDA 254nm, FLUJO  
 2.0 mL/min COLUMNA C18 CORTA

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD  
 Scale Factor 1: 1.000

Name	RT	Area	Height
	0.67	17612	2857
	1.52	2956	198
CLOTRIMAZOL	9.48	1867545	47313
		1888113	50368

Peak rejection level: 0

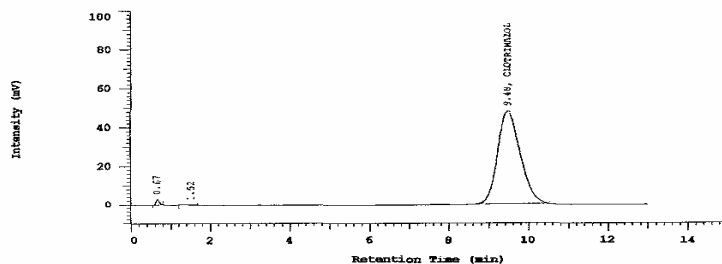
Page Indicator 12 / 26

D-7000 HSM: Samples Series: 0387 Report: modified System: Sys 2

### LABORATORIO NACIONAL DE SALUD

Analyzed: 28/08/06 02:41 p.m. Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0387\ Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 System(acquisition): Sys 2 Series:0387  
 Application: Samples Vial Number: 3  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB. Vial Type: STD1  
 Injection from this vial: 4 of 6 Volume: 50.0 ul  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 Column Type: Developed by: ANGELA SAMOL  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: ACETONITRILLO Solvent B: AGUA  
 Solvent C: METANOL Solvent D: FASE MOVIL  
 Method Description: FASE MOVIL BUFFER FOSFATO DE AMONIO/ METANOL 30/70,  
 pH:7.0 CON ACIDO FOSFORICO, LONGITUD DE ONDA 254nm, FI  
 2.0 ml/min COLUMNA C18 CORTA

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD  
 Scale Factor 1: 1.000

Name	RT	Area	Height
	0.67	17692	28
	1.52	2847	47
CLOTRIMAZOL	9.48	1875878	50
		1896417	

Peak rejection level: 0

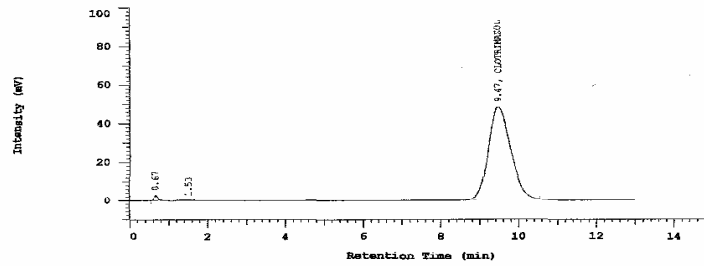


D-7000 HSM: Samples Series: 0387 Report: modified System: Sys 2

**LABORATORIO NACIONAL DE SALUD**

Analyzed: 28/08/06 02:55 p.m. Reported: 29/08/06 09:46 a.m.  
 Processed: 29/08/06 09:41 a.m.  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0387\  
 Processing Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 System(acquisition): Sys 2 Series:0387  
 Application: Samples Vial Number: 3  
 Sample Name: ST CLOTRIMAZOL 100% CON. TRAB. Vial Type: STD1  
 Injection from this vial: 5 of 6 Volume: 50.0 ul  
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: CLOTRIMAZOL VALIDACION  
 Column Type: Developed by: ANGELA SAMOL  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: ACETONITRILLO Solvent B: AGUA  
 Solvent C: METANOL Solvent D: FASE MOVIL  
 Method Description: FASE MOVIL BUFFER FOSFATO DE AMONIO/ METANOL 30/70,  
 pH:7.0 CON ACIDO FOSFORICO, LONGITUD DE ONDA 254nm, FI  
 2.0 mL/min COLUMNA C18 CORTA

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD  
 Scale Factor 1: 1.000

Name	RT	Area	Height
	0.67	18382	21
	1.53	5509	1
CLOTRIMAZOL	9.47	1886107	47
		1909998	51

Peak rejection level: 0

# Anexo No. 5

## Análisis

### Estadístico

## Evaluación Estadística de la recta obtenida para la Linealidad

## Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99909175
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.99818432
R <sup>2</sup> ajustado	0.99804465
Error típico	31144.8911
Observaciones	15

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico F</i>
Regresión	1	6.9325E+12	6.9325E+12	7146.84984	3.3168E-
Residuos	13	1.261E+10	970004242		
Total	14	6.9451E+12			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>
Intercepción	-41518	24124.7289	-1.72097271	0.10895149	-93636.30
Concentración (%)	19228.416	227.450126	84.5390433	3.3168E-19	18737.03

## Análisis de los residuales

Resultados o

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico</i>			<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>	<i>Percentil</i>
	<i>Area</i>					
1	919902.8			-15915.8	-0.53031511	3.333333
2	919902.8			-18729.8	-0.6240777	
3	919902.8			22926.2	0.76390192	16.66666
4	1400613.2			-30801.2	-1.02629724	23.33333
5	1400613.2			-9151.2	-0.30491836	
6	1400613.2			46295.8	1.54257795	36.66666
7	1881323.6			-25806.6	-0.85987697	43.33333
8	1881323.6			2878.4	0.09590841	
9	1881323.6			37321.4	1.24355057	56.66666
10	2362034			-40574	-1.35192734	63.33333
11	2362034			1495	0.04981346	
12	2362034			38140	1.27082636	76.66666
13	2842744.4			-42393.4	-1.41254982	83.33333
14	2842744.4			-2185.4	-0.07281762	
15	2842744.4			36500.6	1.21620148	96.66666

Hipótesis nula: la pendiente que de la ecuación de la recta que explica la relación entre ambas variables es en la p

Hipótesis alterna: la pendiente que de la ecuación de la recta que explica la relación entre ambas variables es en la

Conclusión: dado que el valor de probabilidad es menor al nivel de significancia, la relación entre ambas variables es diferente a cero

$\rho = 0$

$\rho \neq 0$

IC = 95%

$p < 0.05$

3.3168E-19

Análisis realizado con el módulos de análisis de datos de Excel

Anexo 6: Prueba de Student realizada para la exactitud.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	97.914594	100
Media	90.0284833	100
Varianza	1096.74373	0
Observaciones	17	17
Varianza agrupada	548.371865	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	32	
	-	
Estadístico t	1.24146105	
P(T<=t) una cola	0.1117294	
Valor crítico de t (una cola)	1.6938887	
P(T<=t) dos colas	0.22345881	
Valor crítico de t (dos colas)	2.03693333	

$$H_o : \bar{y}_{\%recuperación} = 100\%$$

$$H_o: y \%recueración = 100$$

$$H_a: y \%recuperación \neq 100$$

One-Sample T: C1

Test of mu = 100 vs not =  
100

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% CI	T	P
C1	18	90.47	32.18	7.59	(74.46, 106.47)	-1.26	0.226

Conclusión: % de recuperación poblacional es igual al parámetro (100)

No hay diferencia estadísticamente significativa entre la media poblacional del porcentaje de recuperación y el valor (100%)

Análisis realizado conb Minitab 15

## Anexo 7: Analisis de Varianza

```
. anova respuest analista
muestras
```

```
Number of obs = 36 R-squared = 0.1113
Root MSE = 1.36592 Adj R-squared = 0.0280
```

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	7.47507527	3	2.49169176	1.34	0.2801
analista	.020453446	1	.020453446	0.01	0.9173
muestras	7.45462182	2	3.72731091	2.00	0.1522
Residual	59.7037358	32	1.86574174		
Total	67.1788111	35	1.9193946		

No existe diferencia significativa entre analistas ( $p=0.9173$ ), ni entre muestras ( $p=0.1522$ )

Nivel de significancia=0.05

---

Br. Angela Teresa Samol Sayes  
Autor

---

Licda. Millie Cruz  
Co-Asesora

---

Licda. Julia Amparo García Bolaños

Asesora

---

Lic. Julio Chinchilla

Revisor

---

Lic. Estuardo Serrano

Director de Escuela

---

Dr. Oscar Cobar

Decano