

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**



TITULO: VALIDACIÓN DE DOS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METRONIDAZOL BASE EN TABLETA E INYECTABLE POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y ESPECTROFOTOMETRÍA (UV/VIS) REALIZADO EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS (MINSa), AGOSTO 2011-JULIO 2013.

AUTORAS:

**Bra. Ana Raquel García Artola
Bra. Cándida Azucena García Cáceres**

TUTORA.

PhD.: Carla Martínez Algaba

MANAGUA, JULIO 2013



ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CERTIFICACIÓN

RESUMEN

APARTADO I: ASPECTOS GENERALES

1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 ANTECEDENTES	3
1.3 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
1.4 OBJETIVOS.....	7

APARTADO II: MARCO DE REFERENCIA

2.1 Generalidades de validación	8
2.1.1 Definición de validación.....	8
2.1.2 Características analíticas para validación de métodos	8
2.1.2.1 Especificidad.....	9
2.1.2.2 Linealidad e intervalo	9
2.1.2.3 Precisión	9
2.1.2.3.1 Repetibilidad.....	10
2.1.2.3.1.1 Determinación de la repetibilidad.....	10
2.1.2.3.1.2 Criterios de aceptación de la repetibilidad.....	10
2.1.2.3.2 Precisión Intermedia.....	11
2.1.2.3.2.1 Determinación de la precisión intermedia.....	11
2.1.2.3.2.2 Criterio de aceptación de la precisión intermedia.....	11
2.1.2.4 Exactitud	11
2.1.2.4.1 Determinación de la exactitud	11
2.1.2.4.2 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado en la determinación de exactitud	12
2.1.2.4.3 Criterio de aceptación de la exactitud.....	12



2.1.2.5 Límite de detección (LOD)	12
2.1.2.6 Límite de cuantificación (LOQ).....	13
2.1.3 Clases de ensayos analíticos.....	13
2.1.4 Datos requeridos para la validación de procedimientos farmacopeicos.....	14
2.2 Fundamentos de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	15
2.2.1 Componentes del aparato cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)...	15
2.2.1.1 Sistemas de bombeo.....	16
2.2.1.2 Inyectores	17
2.2.1.3 Columnas.....	17
2.2.1.4 Detectores	17
2.2.1.5 Dispositivos de recolección de datos	18
2.2.1.6 Aptitud del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	18
2.2.1.6.1 Resolución (R).....	18
2.2.1.6.2 Eficiencia de la columna	19
2.2.1.6.3 Factor de asimetría (T).....	19
2.3 Fundamento de la Espectrofotometría (UV visible)	20
2.3.1 Definición de Espectrofotometría (UV visible)	20
2.3.2 Características del sistema espectrofotométrico.....	21
2.3.3 Aplicaciones del sistema espectrofotométrico.....	21
2.3.4 Aspectos cuantitativos de las mediciones de absorción Ley de Beer.	22
2.4 Generalidades Farmacológicas de la molécula de metronidazol.....	23
2.4.1 Propiedades físico química del metronidazol	23
2.4.2 Mecanismo de acción.....	24
2.4.3 Propiedades farmacológicas farmacocinética	24
2.4.4 Indicaciones terapéuticas	24
2.4.5 Reacciones secundarias y adversas	25
2.4.6 Interacciones medicamentosas y de otro género	25



APARTADO III: HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS.....	26
-------------------	----

APARTADO IV: DISEÑO METODOLÓGICO

4. DISEÑO METODOLOGICO.....	27
4.1. Tipo de estudio.....	27
4.1.1 Tipo de diseño.....	27
4.2 Descripción del ámbito de estudio.....	27
4.3 Población y muestra.....	27
4.3.1 Población de estudio.....	27
4.3.2 Muestra.....	27
4.3.3 Criterio de inclusión.....	28
4.3.4 Criterio de exclusión.....	28
4.4 Variables.....	29
4.4.1 Variable independiente.....	29
4.4.2 Variables dependientes.....	29
4.4.3 Operacionalización de variables.....	29
4.4.4 Material y método.....	31
4.4.4.1 Materiales para recolectar la información.....	31
4.4.4.2 Materiales para procesar la información.....	31
4.4.4.3 Tipos de fuentes de información primaria.....	31

APARTADO V: DISEÑO EXPERIMENTAL

5. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA ANALÍTICA GENERAL).....	32
5.1 Método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta de Resolución (CLAR) y Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis).....	32
5.1.1 Condiciones Cromatográficas.....	32
5.1.2 Condiciones Espectrofotométricas.....	32
5.2 Preparación de las soluciones de trabajo (CLAR).....	33



5.2.1 Preparación de la fase móvil	33
5.2.2 Preparación del estándar primario USP metronidazol base	33
5.2.3 Preparación de las muestras.....	34
5.2.3.1 Preparación de metronidazol tableta 500 mg	34
5.2.3.2 Preparación de metronidazol inyectable 500 mg/100 mL	36
5.2.3.3 Preparación del placebo	39
5.2.4 Preparación de las soluciones de trabajo (Espectrofotometría UV-Vis)	39
5.2.4.1 Preparación del estándar y muestras	39
5.3 Validación del método de cuantificación del principio activo	39
5.3.1 Especificidad del método	40
5.3.1.1 Criterio de aceptación de la especificidad del método	40
5.3.2 Linealidad del sistema	40
5.3.2.1 Criterio de aceptación de la linealidad del sistema	41
5.3.3 Precisión del sistema.....	41
5.3.3.1 Repetibilidad del sistema (mismo día/analista/equipo)	41
5.3.3.1.1 Criterio de aceptación de repetibilidad del sistema	41
5.3.3.2 Precisión intermedia del sistema (interdía e inter- analista).....	41
5.3.3.2.1 Criterio de aceptación de la precisión intermedia del sistema	42
5.3.4 Exactitud	42
5.3.4.1 Criterio de aceptación de Exactitud	43
5.4 REACTIVOS, EQUIPO y MATERIALES	44

APARTADO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
6.1 Técnica Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con una bomba binaria.	46
6.1.1 Especificidad del método	46
6.1.2 Calibrado del sistema por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ...	46
6.1.2.1 Evaluación del desempeño del sistema CLAR.....	48



6.1.3 Linealidad del sistema por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).	49
6.1.3.1 Ecuación de la recta de la linealidad del sistema CLAR	50
6.1.3.2 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en CLAR	55
6.1.3.3 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en CLAR	57
6.1.3.4 Test G de Cochran	59
6.1.3.5 Coeficientes de variación de los factores respuestas	61
6.1.3.6 Análisis de varianza en CLAR.....	62
6.1.4 Precisión del sistema en CLAR.....	65
6.1.4.1 Repetibilidad del sistema en CLAR	65
6.1.4.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema en CLAR	67
6.1.4.2 Precisión Intermedia del sistema en CLAR	68
6.1.4.2.1 Evaluación estadística para la precisión intermedia en CLAR.....	70
6.1.5 Exactitud del sistema en CLAR.....	71
6.1.5.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en CLAR	72
6.1.5.2 Exactitud del método en CLAR	73
6.1.5.2.1 Exactitud del método de metronidazol 500 mg tableta en CLAR	75
6.1.5.2.2 Exactitud del método de metronidazol 500 mg/100 mL inyectable en CLAR ..	78
6.2 Técnica de Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)	80
6.2.1 Especificidad del método (UV VIS)	80
6.2.2 Calibrado del sistema por espectrofotometría UV-Vis.....	80
6.2.3 Linealidad del sistema por espectrofotometría UV VIS.	83
6.2.3.1 Ecuación de la recta de la linealidad del sistema UV-Vis.	84
6.2.3.2 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en UV-Vis.	87
6.2.3.3 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en UV-Vis.....	89
6.2.3.4 Test G de Cochran	91
6.2.3.5 Coeficientes de variación de los factores respuestas	92
6.2.3.6 Análisis de varianza en Espectrofotometría UV-Vis	93
6.2.4. Precisión del sistema en espectrofotometría UV-VIS.....	95
6.2.4.1 Repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-VIS	95



6.2.4.1.1 Evaluación estadística de repetibilidad en espectrofotometría UV-Vis.....	95
6.2.4.2 Precisión intermedia en espectrofotometría UV-VIS.....	96
6.2.4.2.1 Evaluación estadística de precisión intermedia en UV-Vis.....	97
6.2.5 Exactitud del sistema por espectrofotometría Uv/Vis	98
6.2.5.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en UV-Vis.....	99
6.2.5.2 Exactitud del método en UV-Vis.	100
6.2.5.2.1 Exactitud del método metronidazol 500 mg tableta por UV-VIS	102
6.2.5.2.2 Exactitud del método de metronidazol 500 mg/ 100 mL inyectable por UV-Vis.	105
6.3 Consolidado de las técnicas en CLAR y espectrofotometría UV-VIS.....	107
6.3.1 Evaluación de la linealidad del sistema en las técnicas de CLAR y UV-Vis.....	107
6.3.2 Evaluación de la precisión del sistema en CLAR y UV-Vis.....	112
6.3.2.1 Repetibilidad del sistema en CLAR y UV-VIS	112
6.3.2.2 Precisión intermedia del sistema en CLAR y UV-Vis.....	113
6.3.2.3 Exactitud del sistema CLAR vs UV-Vis.....	114
6.3.2.4 Exactitud del método por CLAR y UV-Vis.	115

APARTADO VII: CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES	121
-----------------------	-----

APARTADO VIII: RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES	123
--------------------------	-----

APARTADO IX: BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFIA.....	124
----------------------	-----

GLOSARIO
ABREVIATURAS
ANEXOS



LISTA DE DIAGRAMAS

Nº	Especificaciones	Página
Diagrama 5.2.2.1	Representación esquemática de la preparación de la curva del calibrado de ER-metronidazol base.	34
Diagrama 5.2.3.1.1	Representación esquemática de la preparación de la muestra (tableta), concentración de 30.96 µg/mL.	36
Diagrama 5.2.3.2.1	Representación esquemática de la preparación de la muestra (inyectable), concentración de 30.00 µg/mL.	38
Diagrama 5.3.4.1	Representación esquemática de la preparación del sistema ER-metronidazol base.	42
Diagrama 5.3.4.2	Representación esquemática de la preparación de la exactitud del método tableta 500 mg metronidazol base, concentración de 30.96 µg/mL.	43
Diagrama 5.3.4.3	Representación esquemática de la preparación de la exactitud del método inyectable 500mg/100mL metronidazol base, concentración de 30.96 µg/mL.	43



LISTA DE ECUACIONES

Nº	Ecuación	Página
Ecuación 1	$LOD = \frac{3.3 \sigma}{m}$	13
Ecuación 2	$LOQ = \frac{10 \sigma}{m}$	13
Ecuación 3	$A = -\log T = \log \frac{10 A}{I}$	22
Ecuación 4	$C_{mx} = \frac{A_{mx} * C_{st}}{A_{st}} x_{FD}$	22
Ecuación 5	$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$	47
Ecuación 6	r^2	48
Ecuación 7	$\hat{y} = b * x + a$	53
Ecuación 8	$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	53
Ecuación 9	$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$	54
Ecuación 10	$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$	54
Ecuación 11	$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$	54
Ecuación 12	$a = \bar{y} - b\bar{x}$	55
Ecuación 13	$t_{exp(b)} = \frac{ b }{S_b}$	56



Nº	Ecuación	Página
Ecuación 14	$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}}$	56
Ecuación 15	$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}}$	56
Ecuación 16	$t_{exp(a)} = \frac{ a }{S_a}$	58
Ecuación 17	$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}}$	58
Ecuación 18	$G_{exp} = \frac{S^2 \text{máxima}}{\sum S_i^2}$	59
Ecuación 19	$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$	61
Ecuación 20	$S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}$	63
Ecuación 21	$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$	63
Ecuación 22	$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$	63
Ecuación 23	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$	67
Ecuación 24	$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$	67



LISTA DE GRÁFICOS

Nº	Especificaciones	Página
Gráfico 6.1.2.1.1	Curva de calibración en área de ER-metronidazol base en CLAR.	49
Gráfico 6.1.3.1.1	Calibrado de la linealidad del sistema de ER-metronidazol base en CLAR.	55
Gráfico 6.2.2.1	Curva de calibración de estándar metronidazol base en UV-Vis.	82
Gráfico 6.2.3.1.1	Calibrado de la linealidad del sistema de ER-metronidazol base en UV/Vis.	87
Gráfico 6.3.1.3.1	Comparación de gráficas de los residuales	111



LISTA DE TABLAS

Nº	Especificaciones	Página
Tabla 2.1.4.1	Parámetros requeridos para la validación de procedimientos farmacopéicos.	15
Tabla 6.1.2.1	Evaluación de la curva de calibración en CLAR	47
Tabla 6.1.2.1.1	Funcionamiento del sistema en CLAR	48
Tabla 6.1.3.1	Evaluación de la linealidad del sistema de metronidazol base en CLAR	50
Tabla 6.1.3.1.1	Análisis de los mínimos cuadrados en los datos de CLAR	52
Tabla 6.1.3.4.1	Test de G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR	60
Tabla 6.1.3.6.1	Análisis de varianza en CLAR	62
Tabla 6.1.4.1.1	Evaluación de la repetibilidad del sistema en CLAR	66
Tabla 6.1.4.2.1	Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR	69
Tabla 6.1.4.2.1.1	Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo en CLAR	70
Tabla 6.1.4.2.1.2	Precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR con el t estadígrafo de Student	70
Tabla 6.1.5.1	Evaluación de la exactitud del sistema en CLAR	71
Tabla 6.1.5.2.1.1	Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg tableta en CLAR	75



Nº	Especificaciones	Página
Tabla 6.1.5.2.1.1.1	Test G de Cochran en CLAR Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta	76
Tabla 6.1.5.2.2.1	Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg/100 mL inyectable en CLAR	78
Tabla 6.1.5.2.2.1.1	Test G de Cochran en CLAR Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg /100 mL inyectables	79
Tabla N° 6.2.2.1	Evaluación de la curva de calibracion en UV/Vis	81
Tabla N° 6.2.3.1	Evaluación de la linealidad del sistema de metronidazol base en UV/Vis	83
Tabla N° 6.2.3.1.1	Análisis de los mínimos cuadrados en los datos de UV/Vis	84
Tabla N° 6.2.3.4.1	Test de G de Cochran varianza de los factores de respuesta en UV/Vis	91
Tabla N° 6.2.3.6.1	Análisis de varianza en UV/Vis	93
Tabla N° 6.2.4.1.1	Evaluación de la repetibilidad del sistema en UV/Vis	95
Tabla N° 6.2.4.2.1	Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en UV/Vis	97
Tabla N°6.2.4.2.1.1	Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo en UV/Vis	97
Tabla N°6.2.4.2.1.2	Precisión intermedia interdía e interanalista en UV/Vis con el t estadígrafo de Student	98



Nº	Especificaciones	Página
Tabla Nº 6.2.5.1	Evaluación de la exactitud del sistema en UV/Vis	99
Tabla Nº 6.2.5.2.1.1	Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg tableta en UV/Vis	102
Tabla Nº 6.2.5.2.1.1.1	Test G de Cochran en UV/Vis Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta	103
Tabla Nº 6.2.5.2.2.1	Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg/100 mL inyectable en UV/Vis	105
Tabla Nº 6.2.5.2.2.1.1	Test G de Cochran en UV/Vis Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg /100 mL inyectables	106
Tabla Nº 6.3.1.1	Evaluación de la linealidad del sistema en las técnicas de CLAR y UV-Vis	107
Tabla Nº 6.3.1.2	Test de Student para la pendiente en CLAR y UV-Vis	109
Tabla Nº 6.3.1.3	Test de Student para la pendiente en CLAR y UV-Vis	110
Tabla Nº 6.3.2.1.1	Repetibilidad del sistema en CLAR y UV-Vis	112
Tabla Nº 6.3.2.2.1	Estudio de la precisión intermedia en CLAR y UV-vis	113
Tabla Nº 6.3.2.2.2	Prueba de Fisher de la precisión intermedia en CLAR y UV-Vis	114



Nº	Especificaciones	Página
Tabla Nº 6.3.2.3.1	Exactitud del sistema en CLAR y UV-Vis	114
Tabla Nº 6.3.2.4.1	Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta	115
Tabla Nº 6.3.2.4.2	Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg/100mL inyectables	117
Tabla Nº 6.3.2.4.3	Porcentaje de recuperación para la cuantificación de metronidazol base	118



LISTA DE ANEXOS

Nº	Especificaciones	Página
Anexo 1	Especificidad del método en CLAR	1
Anexo 2	Calibrado del sistema en CLAR	2
Anexo 3	Linealidad del sistema en CLAR	3
Anexo 4	Gráficas de Residuales en CLAR	4
Anexo 5	Precisión del sistema en CLAR “Repetibilidad del sistema”	5
Anexo 6	Precisión del sistema en CLAR, “Precisión intermedia del primer analista”	6
Anexo 7	Precisión del sistema en CLAR Precisión intermedia del segundo analista	7
Anexo 8	Respuestas obtenidas de la precisión intermedia inter analista e inter día en CLAR.	8
Anexo 9	Continuidad de las respuestas obtenidas de la precisión intermedia inter analista e inter día en CLAR.	9
Anexo 10	Exactitud del sistema en CLAR	10
Anexo 11	Exactitud del método en CLAR “Porcentaje de recuperación de metronidazol base tableta”	11
Anexo 12	Exactitud del método en CLAR “Porcentaje de recuperación de metronidazol base inyectable”	12



LISTA DE ANEXOS

Nº	Especificaciones	Página
Anexo 13	Especificidad del método en UV/Vis	13
Anexo 14	Calibrado del sistema en UV/Vis	14
Anexo 15	Linealidad del sistema en UV/Vis	15
Anexo 16	Gráficas de Residuales en UV/Vis	16
Anexo 17	Precisión del sistema en UV/Vis “Repetibilidad del sistema”	17
Anexo 18	Precisión del sistema en UV/Vis “Precisión intermedia del primer analista”	18
Anexo 19	Precisión del sistema en UV/Vis “Precisión intermedia del segundo analista”	19
Anexo 20	Respuestas obtenidas de la precisión intermedia inter analista e inter día en UV/Vis.	20
Anexo 21	Continuidad de las respuestas obtenidas de la precisión intermedia inter analista e inter día en UV/Vis.	21
Anexo 22	Exactitud del sistema en UV/Vis	22
Anexo 23	Exactitud del método en UV/Vis “Porcentaje de recuperación de metronidazol base tableta”	23
Anexo 24	Exactitud del método en UV/Vis “Porcentaje de recuperación de metronidazol base inyectable”	24



Nº	Especificaciones	Página
Anexo 25	Monografías individuales de metronidazol tableta	25
Anexo 26	Monografías individuales de metronidazol inyectables	28
Anexo 27	Reglamento técnico centroamericano 11:03:39:06	31
Anexo 28	Tablas de distribución	44
Anexo 29	Gráfica de la curva de área en ER Metronidazol base en CLAR con intervalo de confianza	49
Anexo 30	Gráfica de la curva de absorbancia en ER Metronidazol base en UV/Vis con intervalo de confianza	50



DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo con todo amor y cariño:

A DIOS que con su infinito amor y la sabiduría nos proveyó las fuerzas para esforzarnos en momentos en que llegamos a sentir que no había más oportunidades para seguir y poder concluir nuestros estudios superiores.

A nuestros padres quienes con su amor incondicional siempre estuvieron presentes brindándonos una palabra de aliento, de esperanza, enseñándonos con su ejemplo el valor del esfuerzo y trabajo duro, lo que sin duda alguna da como resultado el fruto de la victoria y la gratificación en el alma de haber vencido sin importar que tan fuertes fueran los vientos.

A los profesores, que gracias a sus conocimientos y disposición a enseñarnos, lograron inculcarnos las bases necesarias para la culminación del presente trabajo, en especial nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por dedicarnos su generosa atención y el tiempo en la minuciosa labor de revisión y corrección de este trabajo.

A todas aquellas personas que nos apoyaron, y que algunas ya no están presentes; siempre nos ofrecieron su apoyo de una forma directa e indirecta, dedicaron su amor, su tiempo, ánimo y conocimientos para que hoy viéramos concluido una de las mayores metas que hemos tenido en la vida y por ello les dedicamos este trabajo con todo el afecto y cariño que alberga nuestro corazón.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a DIOS PADRE por darnos la vida con todos sus dones y bendiciones.

A nuestros padres, quienes con sus esfuerzos nos alentaban y apoyaban incondicionalmente para hacer realidades nuestros sueños de llegar a ser profesionales.

Agradecemos muy especialmente a nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por sus valiosas orientaciones técnicas y el apoyo en la elaboración de la presente monografía.

Al Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos MINSA; principalmente a la Lic. Nubia Blanco, Directora General, Lic. Francisco Álvarez, Jefe de Área de Físico químico, Lic. Rogelio Machado (Analista del Laboratorio), por sus invaluable colaboraciones y apoyo en la realización de este estudio. De igual forma a todo el personal que labora en dicho laboratorio, quienes colaboraron de forma directa e indirecta en la realización de esta monografía.

A los Docentes de la UNAN-MANAGUA de la Carrera de Química - Farmacéutica que nos formaron en esta profesión brindándonos las bases para desarrollar nuestras capacidades y habilidades como profesionales en la rama de Química y Farmacia.

Finalmente a nuestro estimado maestro. Lic. Ramón Cáceres, Director de la carrera de Química Farmacéutica, quien es una fuente de inspiración profesional, gracias por el apoyo brindado.

A todas las personas que nos apoyaron y que participaron en la realización del presente trabajo.



CERTIFICACIÓN

Msc. Ramón Ignacio Cáceres
Coordinador de la Carrera Química Farmacéutica
Departamento de Química
UNAN Managua
Estimado Msc. Cáceres:

Me permito presentar a usted el informe final de la monografía: “Validación de dos técnicas analíticas para la cuantificación de metronidazol base en tableta e inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Espectrofotometría (UV/Vis) realizado en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSU), agosto 2011-julio 2013.”. Realizados por las bachilleras: Ana Raquel García Artola y Cándida Azucena García Cáceres.

Así mismo, certifico haber dirigido y supervisado el arduo trabajo realizado con dedicación, empeño, por las bachilleras, esperando su pronta programación para pre defensa y defensa.

Aprovecho la ocasión para saludarle y presentarle a usted mis respetos y consideración.

Firmo la presente en Managua el 3 de julio del 2013.

PhD. Carla Martínez Algaba
Tutora



RESUMEN

Metronidazol (MTZ) con nombre químico 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etanol, es un medicamento frecuentemente usado para el tratamiento de infecciones producidas por *Trichomonas vaginalis*, además de ser útil en algunas infecciones parasitarias es un antibiótico con gran actividad bactericida frente a un gran número de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas, teniendo propiedades farmacológicas como antibacteriano, antiprotozoario y antihelmíntico.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud de Nicaragua (LNCCM-MINSA), con la finalidad de validar dos técnicas analíticas como son Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Espectrofotometría ultravioleta visible (UV/Vis) para la cuantificación de metronidazol base, en los preparados farmacéuticos tableta e inyectable, reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 34, 2011).

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent modelo 1260 con inyector automático, y un espectrofotómetro ultravioleta Agilent modelo 8453, ambos con detectores de arreglo de diodo a una longitud de onda fija de 320 nm, trabajando en el rango de concentraciones de 15.46 a 49.47 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como fase móvil y diluyente Agua:Metanol (60:40 v/v) para ambas técnicas.

Las técnicas validadas se le determinaron los parámetros de desempeño, especificidad, linealidad, exactitud y precisión. La curva de calibración para cada técnica, demostraron ser lineales $r^2 = 0.9995$ (CLAR), $r^2 = 0.9990$ (UV/Vis). Se obtuvo porcentaje de recuperación en tableta de 104.351 % (CLAR) y 103.441 % (UV/Vis), y para inyectable 102.532 % (CLAR) y 105.783 % (UV/Vis). En los estudios de la repetibilidad y precisión intermedia los coeficientes de variación fueron menores al 2%.



Ambas técnicas resultaron ser específicos, lineales, precisos y exactos, por lo tanto pueden usarse para la rutina de control de calidad en productos farmacéuticos.

Palabras claves: Metronidazol, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Espectrofotometría UV y Validación.



1.1 INTRODUCCIÓN

El tema de validación ha sido objeto de estudios desde hace años por diferentes organismos de carácter oficial; desde la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), Organización mundial de la Salud (OMS), Asociación Oficial de Químicos Analíticas (AOAC), Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), Farmacopea Europea y la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), consignan la ineludible necesidad de la validación en los procesos analíticos.

El Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica (COMIECO), aprobó un “Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39:06. Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos”, con el objetivo de establecer las directrices para la validación de métodos analíticos fisicoquímicos y microbiológicos utilizados en el control de calidad de medicamentos.

Metronidazol (MTZ) es químicamente 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etanol, el cual es un fármaco de primera elección para profilaxis y tratamiento de muchas enfermedades parasitarias. Posee un espectro extremadamente amplio de actividad antiprotozoario y antimicrobiano siendo efectivo para la mayoría de las bacterias anaerobias estrictas y protozoarios, siendo seleccionada para nuestro estudio.

Las técnicas que fueron motivo de comparación en nuestro estudio es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV/Vis), ambas con detectores de arreglo de Diodos para la cuantificación de metronidazol base en su formas farmacéuticas tableta e inyectable, reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 34.



En la validación de las técnicas analíticas se prepararon en las mismas condiciones los patrones y las muestras, evaluando los parámetros de especificidad del método, linealidad, precisión en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación del sistema.

El alcance de nuestro trabajo experimental fue la comparación de dos técnicas que generaron datos para evaluar la equivalencia entre las mismas, en toda una gama de concentraciones, con la finalidad de seleccionar una técnica rápida que garantice la seguridad y eficacia del medicamento.



1.2 ANTECEDENTES

A nivel internacional encontramos un sin número de trabajos reportados en diferentes revistas sobre validaciones de técnicas cromatográficas y espectrofotométricas en diversos preparados farmacéuticos y algunos de ellos en metronidazol en diferentes presentaciones farmacéuticas. En Nicaragua no existen estudios comparativos de dos técnicas analíticas; sin embargo, se encontraron cinco estudios sobre el tema de validación en diferentes técnicas y preparados farmacéuticos.

Internacionales:

2013 “Validated chromatographic and spectrophotometric methods for analysis of some amoebicide drugs in their combined pharmaceutical preparation”. Abdelaleem EA, Abdelwahab NS. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* (2013) vol. 26, Issue 1, Jan; p 175-83.

2013 “Application of validated stability indicating HPLC method in stability testing of nor-metrogyl tablets” Rajyalakshmi Chavakula, Rambabu Chintala, Benjamin Tadank *Journal of Pharmacy Research* (2013), vol. 6, Issue 5, May, p 499-503.

2012 “Simultaneous Determination of Metronidazole and Diiodohydroxyquine in Bulk Powder and Paramibe Compound Tablets by TLC-Densitometry and HPLC”. Hesham, S; Safaa, M; Riad, Mamdouh, R; Rezk and Kholoud AhmedSalem et al., *Pharmaceutica Analytica Acta* (2012), vol. 3, Issue 10.



2011 “Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Estimation of Ofloxacin and Metronidazole from Pharmaceutical Formulation”. Shree S. K. Patel. International Journal of Pharmaceutical Frontier Research (IJPFR), (2011), vol. 1, Issue 2, July-Sep: p 68-74.

2008 “Validación de un método de HPLC simple y rápido para la determinación de metronidazol en formulaciones dermatológicas”. Tashtoush BM; Jacobson EL; Jacobson MK. Drug Development and Industrial Pharmacy (2008), vol. 34, Issue 8, p 840-4.

2008 “Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Metronidazol em forma farmacêutica (gel vaginal)”. Bedor, Danilo; Soares, JL; Grangeiro, S; Ramos, S, Lima, Ádley; Rolim, PJ. Latin American Journal of Pharmacy (2008) vol. 27, no. 02, p 263-265.

2007 “Validación de métodos por Espectrofotometría Ultravioleta y HPLC para la determinación cuantitativa del Atenolol en preparaciones farmacéuticas”. Weich, A, Carvalho de Oliveira, D; Melo, J; Goebel, K; Rolim, C. Latin American Journal of Pharmacy (2007); vol. 26, no. 5, agosto, p 765-770.

2007 “Desarrollo y validación de un método simple para HPLC simultánea determinación in vitro de amoxicilina y metronidazol en una sola longitud de onda”. Naser Tavakoli, Jaleh Varshosaz, Farid Dorkoosh, Mohammad R. Zargarzadeh. Revista de Análisis farmacéuticas y biomédicas (2007), vol. 43, no. 1, 04 enero, p 325-329.



2001 “Quantification of metronidazole in small-volume biological samples using narrow-bore high-performance liquid chromatography”. J.I.D Wibawa, P.N Shaw, D.A Barrett. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications (2001), vol. 761, Issue 2, 25 September, p 213-219

Nacionales:

2012 “Validación del método analítico para la cuantificación de Dexametasona 0.5 mg tableta por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) realizada en Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSA), de agosto 2011 a marzo 2012. UNAN-Managua”. Bras. Téllez María Guissell y Villanueva Martha Ibis.

2011 “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta presión para la cuantificación de Mupirocina 2% ungüento en Laboratorio CEGUEL en el período comprendido de mayo a noviembre 2009. UNAN-Managua”. Bra. Faife López Adinia.

2008 “Validación de un método Espectrofotométrico UV-Visible para la determinación de la Ciprofloxacina en formulaciones sólidas producidas por laboratorios Bengochea de Managua, UNAN-Managua”. Brs. García Taleno G. M y Gutiérrez Obando B. A.

2004 “Desarrollo y validación para la determinación de Clembuterol y Ambroxol en jarabe por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)”. UNAN-León. Bra. Quiroz Larios, Clelia Guadalupe.

2004 “Desarrollo y validación de un método de análisis de tabletas de Loratadina y Clorhidrato de pseudoefedrina por espectrofotometría UV-Vis”. UNAN-León. Bra. Román Mercado, Mercedes Elizabeth.



1.3 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado.

La molécula del metronidazol fue seleccionado por ser el fármaco de primera elección para la profilaxis y el tratamiento de muchas enfermedades parasitarias así como la disponibilidad de este principio activo en diferentes presentaciones farmacéuticas comercializadas tales como: tableta, cápsula, inyectable, gel, óvulo y suspensión.

Debido a lo anterior, la farmacopea de los Estados Unidos de América recomienda diferentes técnicas de cuantificación para cada una de los preparados farmacéuticos. Con el presente trabajo se quiere unificar una única técnica para determinar el metronidazol en diferentes preparados farmacéuticos, por ende ahorrándose tiempo en el desarrollo de la misma y a la vez garantizando la rapidez en la distribución a las unidades asistenciales para su posterior dispensación.

Se considera conveniente la realización de este trabajo de investigación en la comparación de dos técnicas analíticas; debido al aporte que proporciona, en cuanto a métodos de análisis modificados, siendo de gran importancia disponer de métodos de análisis alternativos, que proporcione rapidez, seguridad, confiabilidad, en la calidad de los resultados.



1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Determinar los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de metronidazol base tabletas de 500 mg e inyectables 500 mg/mL por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis).

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Evidenciar los parámetros del desempeño de la validación del sistema: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación para metronidazol base por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis).
2. Determinar el porcentaje de recuperación de metronidazol base en tabletas e inyectables, por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis).
3. Comprobar la especificidad del método analítico para la cuantificación de metronidazol base en tabletas e inyectables, por las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis).
4. Comparar las técnicas desarrolladas a través de los parámetros de validación para determinar la técnica más adecuada e idónea, de menor tiempo, y que garantice la seguridad y eficacia del medicamento.



2.1 Generalidades de validación

2.1.1 Definición de validación

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorios, que las características de desempeño del procedimiento cumplan los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 34 <1225>, 2011). El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado (ICH, 2002).

Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos.

Los objetivos de una validación analítica son los siguientes:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas
- Facilitar las auditorías de calidad

2.1.2 Características analíticas para validación de métodos

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método que describen la Farmacopea USP 34 (USP 34 <1225>, 2011).

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Precisión expresada en sus 2 formas: repetibilidad y precisión intermedia.
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación



2.1.2.1 Especificidad

Es la habilidad de determinar sin ninguna equivocación, al analito, en presencia de otros componentes que se espera estén presentes, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz (USP 34 <1225>, 2011).

La especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar. 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.

2.1.2.2 Linealidad e intervalo

Linealidad: es la habilidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado (USP 34 <1225>, 2011).

Intervalo: es la amplitud entre las concentraciones inferiores y superior del analito, en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito (USP 34 <1225>, 2011).

2.1.2.3 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales cuando el método es aplicado repetidamente a muestreos múltiples de una muestra homogénea. Se puede medir por el grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico.



En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). (USP 34 <1225>, 2011).

Existen tres formas diferentes de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad (USP 34 <1225>, 2011).

2.1.2.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo (USP 34 <1225>, 2011)

2.1.2.3.1.1 Determinación de la repetibilidad

La Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, se trabaja con el punto medio de la calibración, con sus nueve determinaciones repetidas de esta concentración (ICH, 2002; USP 34 <1225>, 2011).

2.1.2.3.1.2 Criterios de aceptación de la repetibilidad

Existen diferentes criterios de aceptación sin embargo, se puede generalizar que en el caso de la repetibilidad, la precisión intermedia y la desviación estándar relativa, debe ser menor o igual al 2%, y en algunos casos puede ser igual o menor del 3% (Unión Aduanera, 2004).



2.1.2.3.2 Precisión Intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra homogénea, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, días y aparatos, etc.) en un mismo laboratorio (AEFI, 2001).

2.1.2.3.2.1 Determinación de la precisión intermedia

Se determina preparando una muestra a la concentración considerada como el 100% o a la concentración de análisis rutinario, haciendo análisis por triplicado. El ensayo se realiza por dos analistas, en días diferentes (USP 34 <1225>, 2011).

2.1.2.3.2.2 Criterio de aceptación de la precisión intermedia

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del Coeficiente de Variación global (Unión Aduanera, 2004).

2.1.2.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero (ICH, 2002; USP 34 <1225>, 2011).

Según la ICH, se recomienda que la exactitud se evalúe con un mínimo de nueve determinaciones, sobre un mínimo de tres niveles de concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración (USP 34 <1225>, 2011).

2.1.2.4.1 Determinación de la exactitud

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis (Unión Aduanera, 2004; ICH, 2002).



1. Prueba de un Estándar de Referencia
2. Mezcla con excipientes (placebo con una cantidad agregada conocida)
3. Agregado de estándar (muestra con cantidad agregada conocida)
4. Se deduce a partir de los datos de la especificidad y linealidad
5. Comparación con un método reconocido como exacto (método de referencia)

2.1.2.4.2 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado en la determinación de exactitud

Verificación

El material de referencia puede ser obtenido en el mercado por algún proveedor o puede ser preparado internamente en el laboratorio (Unión Aduanera, 2004).

Se analiza por replicado el material, por el método a validar y se compara el resultado obtenido con el valor verdadero declarado, este método se encuentra limitado por la disponibilidad y la estabilidad del material de referencia, así como por el grado de certidumbre que se tenga del valor verdadero de la concentración del material de referencia.

2.1.2.4.3 Criterio de aceptación de la exactitud

En la exactitud el criterio de aceptación es 90.0 % - 110.0 % de recuperación o 2% de error relativo (USP 34, 2011)

2.1.2.5 Límite de detección (LOD)

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse por una única medición, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas, expresadas habitualmente en forma de concentración de analito (porcentajes, partes por millón ppm) en la muestra (USP 34 <1225>, 2011).



Se determina mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo que puede detectarse confiablemente.

El límite de detección se calcula mediante la fórmula: (Sierra, I. et al., 2010).

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde

σ = es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

2.1.2.6 Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas que se expresa en forma de concentración de analito (porcentajes, partes por millón ppm) en la muestra (USP 34 <1225>, 2011).

El límite de cuantificación se calcula mediante la fórmula: (Sierra, I. et al., 2010).

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde

σ es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

2.1.3 Clases de ensayos analíticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica, en cuatro clases principales con sus respectivas especificaciones para la validación de métodos analíticos, que se nombran en: (Inf.32 OMS Anexo 5, 2006)



Clase A: Para establecer identidad

Clase B: Para detectar y cuantificar impurezas

Clase C: Para determinar cuantitativamente la concentración

Clase D: Para evaluar las características, disolución, uniformidad de contenido

2.1.4 Datos requeridos para la validación de procedimientos farmacopeicos

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían dependiendo de la naturaleza de la prueba específica, considerando esta amplia variedad es lógico que diferentes procedimientos requieran diferentes esquemas de validación, que a continuación se detallan (USP 34 <1225>, 2011).

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

Categoría II: para la determinación de impurezas en fármacos a granel o producto de degradación en productos farmacéuticos.

Categoría III: para la determinación de las características de desempeño (ej. disolución, liberación de fármacos).

Categoría IV: pruebas de identificación



Tabla 2.1.4.1 Parámetros requeridos para la validación de procedimientos farmacopéicos.

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

Fuente: (USP 34 <1225>, 2011)* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

2.2 Fundamentos de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida que esta inmobilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra llamada fase móvil líquida, que se desplaza al contacto de la primera (USP 34 <621>, 2011).

2.2.1 Componentes del aparato cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como, por ejemplo, una computadora, un integrador o un registrador (USP 34 <621>, 2011).

Además de recibir y reproducir señales enviadas por el detector, las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos (USP 34 <621>, 2011).



2.2.1.1 Sistemas de bombeo

Los sistemas de bombeo de CLAR administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones (USP 34 <621>, 2011).

Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de bombear la fase móvil a una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante períodos de tiempo prolongados.

Los tipos de bombas que existen en la actualidad son: isocrática, binaria y cuaternaria (Agilent, 2009-2010).

La bomba isocrática: solo tiene un canal de disolvente; es decir, no se puede modificar la composición durante un método porque no hay una válvula de gradiente multicanal (MCGV) (Agilent, 2009-2010).

La bomba binaria: se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa, proporciona la generación de un gradiente por mezcla a alta presión (Agilent, 2009-2010).

La bomba cuaternaria: está compuesta por una cabina de disolventes, un desgasificador de vacío y una bomba de gradiente de cuatro canales. Esta última comprende una válvula de partición de alta velocidad y un dispositivo de bomba (Agilent, 2009-2010).



2.2.1.2 Inyectores

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar, se inyectan en la fase móvil, ya sea manualmente usando jeringas o automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos.

2.2.1.3 Columnas

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa (USP 34 <621>, 2011).

2.2.1.4 Detectores

Para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna estratégicamente se utiliza un detector, que es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física (USP 34 <621>, 2011)

Características de los detectores (Trejos, 2011).

a) Sensibilidad: medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.

b) Linealidad: rango de masa o concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin desviación arbitraria.

c) Rango dinámico lineal: rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.

d) Ruido: es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal



e) **Límite de detección:** está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble de nivel del ruido.

2.2.1.5 Dispositivos de recolección de datos

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen los cromatogramas completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando períodos largos de operación sin necesidad de supervisión (USP 34 <621>, 2011).

2.2.1.6 Aptitud del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y se emplean para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico, son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal (USP 34 <621>, 2011).

2.2.1.6.1 Resolución (R)

Es una función de la eficiencia de la columna, N (número de platos teóricos en una columna cromatográfica) y se especifica para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre sí se resuelvan unos de otros, para establecer el poder de resolución general del sistema y para asegurar que el estándar interno se resuelva del fármaco (USP 34 <621>, 2011).



2.2.1.6.2 Eficiencia de la columna

La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay sólo un pico de interés en el cromatograma; sin embargo, es un medio menos confiable para asegurar la resolución que la medición directa (USP 34 <621>, 2011).

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar empleada en la valoración u otra solución estándar se comparan para determinar si se cumplen con los requisitos de precisión.

A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa, (S_R ó DSR), si el requisito es 2,0% o menor; se emplean los datos de seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es más de 2,0% (USP 34 <621>, 2011).

2.2.1.6.3 Factor de asimetría (T)

Es una medida de la simetría del pico, siendo la unidad para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada (USP 34 <621>, 2011).

En algunos casos, pueden observarse valores menores a la unidad. A medida que la asimetría del pico aumenta, la integración y por tanto la precisión se tornan menos confiables (USP 34 <621>, 2011).

Estas pruebas se realizan mediante la recolección de datos de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones, según se especifique en la monografía individual. Puede ser necesario realizar ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema.



A menos que se especifique algo diferente en la monografía, los parámetros de aptitud del sistema se determinan a partir del pico del analito (USP 34 <621>, 2011).

Para determinar la eficacia del sistema operativo final, se debe someter a una prueba de aptitud. Las inyecciones repetidas de la preparación estándar requeridas para demostrar que la precisión del sistema es adecuada pueden efectuarse antes de inyectar las muestras o intercalarse entre las inyecciones de las muestras (USP 34 <621>, 2011).

2.3 Fundamento de la Espectrofotometría (UV visible)

2.3.1 Definición de Espectrofotometría (UV visible)

La espectrofotometría Ultravioleta-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (García, 2011).

Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (García, 2011).

Las ventajas de la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar y eficiente en costo.

El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro Ultravioleta-visible.



Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (García, 2011).

La espectrofotometría ultravioleta-visible usa haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango Ultravioleta de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm y en el de la luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro (García, 2011).

2.3.2 Características del sistema espectrofotométrico

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de sílice o cuarzo
- Se utilizan dos lámparas: una de Hidrógeno o Deuterio para la región Ultravioleta, y una de Tungsteno / halógeno para la región visible
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene sólo solvente
- La luz pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia
- El espectrómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia
- La radiación transmitida es detectada y el espectrómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz que pasa por las celdas (García, 2011).

2.3.3 Aplicaciones del sistema espectrofotométrico

La espectrometría Ultravioleta-Visible se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados (García, 2011).



La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría Ultravioleta-Visible puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración (García, 2011).

Absorbancia.

La absorbancia A de una solución se define mediante la ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

I es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica.

I_0 es la intensidad de la luz antes de que entre a la muestra (intensidad de la luz incidente) (García, 2011).

2.3.4 Aspectos cuantitativos de las mediciones de absorción Ley de Beer.

(García, 2011).

La Absorbancia de una especie en solución homogénea es directamente proporcional a su actividad óptica, longitud del paso óptico y su concentración.

Es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

$$C_{mx} = \frac{A_{mx} * C_{st}}{A_{st}} \times FD \quad (\text{Ecuación 4})$$



Donde:

Cst: concentración del estándar

FD: Factor de dilución de la muestra

Amx: Absorbancia de la muestra

Ast: Absorbancia del estándar

2.4 Generalidades Farmacológicas de la molécula de metronidazol

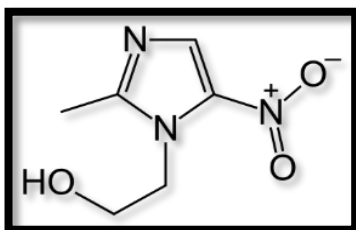
El metronidazol es un nitroimidazol activo frente a la mayoría de los protozoos del intestino, pero especialmente útil para tratar infecciones extraintestinales (absceso hepático) y frente a bacterias. Posee una gran actividad, tanto in vitro como in vivo, frente a *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. (Velásquez et al., 2008).

2.4.1 Propiedades físico química del metronidazol (Laurent, G., 2005)

Nombre Propio: Metronidazol

Nombre químico: 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etanol

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: C₆H₉N₃O₃

Peso Molecular: 171,15 g/mol

Descripción: Polvo blanco cristalino ligeramente amarillo.

Solubilidad: Muy poco soluble en agua y en alcohol, ligeramente soluble en éter y en cloroformo.

pKa: 2.6, **pH:** 5.8 (solución saturada).

Punto de fusión: 159-163 °C.



2.4.2 Mecanismo de acción

El metronidazol es amebicida, bactericida, y tricomonocida. Actúa sobre las proteínas que transportan electrones en la cadena respiratoria de las bacterias anaerobias, mientras que en otros microorganismos se introduce entre las cadenas de ADN inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Velásquez et al., 2008).

Su acción se atribuye a la generación en el parásito de compuestos intermedios reducidos, los cuales, tras su oxidación, originan aniones superóxidos y otros productos citotóxicos, como radicales hidroxilo, que provocan la destrucción de la célula. Se ha demostrado que la forma reducida del metronidazol inhibe la síntesis del ADN en *T. vaginales* (Velásquez et al., 2008).

2.4.3 Propiedades farmacológicas farmacocinética (Velásquez et al., 2008)

Biodisponibilidad: 100% (oral), 59–94% (rectal)

Unión proteica: 20%

Metabolismo: Hepática (60-80%), bilis (6–15%)

Vida media: 6-7 horas

Excreción: Renal

Vías de administración: Oral, rectal, vaginal, intravenosa o tópica

2.4.4 Indicaciones terapéuticas (Velásquez et al., 2008)

El metronidazol es un amebicida eficaz y es de elección para el tratamiento de todas las formas clínicas de la amebiasis y entre otros que a continuación se mencionan:

- Tricomoniasis, giardiasis, amebicida.
- Infecciones ginecológicas como endometritis, abscesos tubo-ováricos, salpingitis.
- Infecciones del tracto respiratorio inferior producidos por *Bacteroides sp.*
- Septicemia bacteriana,
- Endocarditis causada por *Bacteroides sp.*, entre otras.



2.4.5 Reacciones secundarias y adversas (Velásquez et al., 2008)

Las reacciones más graves reportadas con el uso de metronidazol incluyen convulsiones y neuropatía periférica. Otras reacciones reportadas son:

- Tracto gastrointestinal (TGI): Dolor epigástrico, náusea, vómito, alteraciones gastrointestinales, diarrea y sabor metálico.
- Hematopoyético: Neutropenia reversible y trombocitopenia.
- Piel: Erupciones, eritema y prurito. Fiebre, angioedema.
- SNC: Cefalea, mareo, síncope, ataxia y confusión. Estos síntomas pueden interferir con la habilidad para conducir o utilizar maquinaria peligrosa.
- Trastornos visuales: Diplopía y miopía transitorias.
- Reacciones locales: Flebitis en el sitio de infusión I.V

2.4.6 Interacciones medicamentosas y de otro género (Velásquez et al., 2008)

- Disulfiram: la combinación de disulfiram y metronidazol puede causar reacciones psicóticas.
- Alcohol: la ingestión de alcohol durante el tratamiento con metronidazol puede causar cólicos, náusea, cefalea y alteraciones vasomotoras.
- Terapia anticoagulante oral: metronidazol, potencia el efecto anticoagulante de la warfarina y otros anticoagulantes cumarínicos, causando un alargamiento del tiempo de protrombina.
- Fenitoína o Fenobarbital: la administración de medicamentos que inducen enzimas microsomales como la fenitoína y el fenobarbital pueden causar una disminución en los niveles plasmáticos de metronidazol.



3. HIPÓTESIS

La Espectrofotometría ultravioleta visible (UV/Vis) es aplicable para cuantificar metronidazol en sus formulaciones tableta e inyectable como técnica alternativa por no presentar diferencias significativas con la técnica normalizada cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).



4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal: es descriptivo por realizar análisis estadístico, es univariado porque solo describe o estima parámetros en la población de estudio a partir de una muestra y transversal ya que implica la recolección de datos en un solo corte en el tiempo.

4.1.1 Tipo de diseño

Experimental porque se realizaron los análisis de forma práctica donde obtuvimos datos en el área de físico química del laboratorio nacional de control de calidad de medicamentos. Debido que se desea comprobar los efectos de una intervención específica y requiere dos condiciones: intervención y asignación aleatoria (grupo control).

4.2 Descripción del ámbito de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio Nacional Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud de Nicaragua (LNCCM-MINSA), Texaco Xolotlán 2 cuadras y media abajo.

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población de estudio

La población de estudio proporcionada por el LNCCM-MINSA, fue de 120 tabletas de 500 mg de metronidazol base y 5 frascos inyectables de 500 mg/100 mL de metronidazol base.

4.3.2 Muestra

Debido a la cantidad de muestra facilitada por LNCCM-MINSA, se realizó muestreo aleatorio simple, seleccionándose 10 tabletas de 500 mg metronidazol base y 3 frascos inyectables de 500 mg/100 mL de metronidazol base.



4.3.3 Criterio de inclusión

Tableta de 500 mg e Inyectable de 500 mg/100 mL de metronidazol base

4.3.4 Criterio de exclusión

Cápsula, óvulos, gel y suspensión de metronidazol



4.4 Variables

4.4.1 Variable independiente

Concentración (variable no sujeta a errores indeterminados)

4.4.2 Variables dependientes

Área y absorbancias (sujeta a errores indeterminados). Especificidad, linealidad, precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, para metronidazol mediante los métodos validados por CLAR y UV/Vis.

4.4.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Linealidad	Es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de análisis que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de un analito en la muestra.	Coeficiente de variación (C.V) Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación (r^2) Test del intercepto t_{int} Test de linealidad de la pendiente t_{pen} Test de la regresión t_{reg}	C.V. de la pendiente $\leq 2\%$ $r \geq 0.9900$ $r^2 > 0.9980$ $t_{int} < t_{tab.}$ $t_{pend} > t_{tab.}$ $t_{reg} > t_{tab.}$	Categórica



Precisión	Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación a través de un corto intervalo de tiempo. También significa una precisión entre ensayos.	El coeficiente de variación (CV) de los resultados, tanto para los datos correspondientes a la repetibilidad como para la precisión intermedia; no debe ser mayor de 5%.	C.V \leq 2% (CLAR) CV \leq 3 % (UV/Vis)	Categoría
Exactitud	Es la proximidad entre los resultados de las pruebas obtenidos mediante ese método y el valor verdadero	Test de Cochran Ensayo de hipótesis de t de Student: Recuperación de muestra por concentración en el procedimiento analítico.	$G_{exp} < G_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$ % Recuperación 90.0 % a 110.0%	Categoría
Especificidad	Capacidad de evaluar e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de excipientes presentes en la matriz de la muestra.	Programa Chemstation integrado al equipo CLAR y UV/Vis	Comparación entre la señal obtenida del estándar y el placebo: Negativa	Categoría



4.4.4 Material y método

4.4.4.1 Materiales para recolectar la información

Consulta de Farmacopea de Estados Unidos Americanos USP 34 - NF-29, COMIECO “Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39.06. Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos”, Asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI 2001) “Validación de Métodos Analíticos”, Catálogo de instrumentos y accesorios de Agilent Technologies 2009-2010, ICH 2002 “Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3, informe 36”, Informe 32 OMS Anexo 5, 2006 “Validación de procedimientos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos”, Journal of Chromatography, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Unión Aduanera 2004 “Guía de validación de métodos analíticos” y sitios webs Internet.

4.4.4.2 Materiales para procesar la información

El análisis se realizó haciendo uso de hojas de cálculo del programa Microsoft Excel 2010 diseñadas específicamente para tal fin, presentando la información obtenida a través de cuadros y gráficos en Microsoft Word 2010 y Minitab 16

4.4.4.3 Tipos de fuentes de información primaria

Generada por el programa ChemStation versión B.04.02 (Programa integrado al CLAR. Agilent 1260 infinity y espectrofotómetro Agilent 8453).



5. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA ANALÍTICA GENERAL)

5.1 Método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta de Resolución (CLAR) y Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis)

5.1.1 Condiciones Cromatográficas

- Equipo : Cromatografía de líquidos de alta resolución
- Marca : Agilent Technologies
- Modelo : 1260 infinity
- Columna : Agilent C₈ (4.6 mm x 25 cm x 5 µm)
- Sistema de bombeo : Binario
- Longitud de onda : 320 nm
- Temperatura : 25° C
- Flujo : 1 mL por min.
- Volumen de inyección : 20 µL
- Tiempo de retención : 3.4 minutos

5.1.2 Condiciones Espectrofotométricas

- Equipo : Espectrofotómetro UV-Visible
- Marca : Agilent
- Modelo : 8453
- Detector : Arreglo de Diodos (DAD)
- Celda : Cuarzo (1 cm)
- Longitud de onda : 320 nm



5.2 Preparación de las soluciones de trabajo (CLAR)

Nota: Lamentablemente por la carga de trabajo que tiene el LNCCM-MINSA, el tiempo programado por la dirección no fue suficiente para cumplir con todos los procedimientos de la validación como es el no someter las muestras a condiciones drásticas como: hidrólisis ácida HCl 3 N, hidrólisis básica NaOH 3 N, oxidación H₂O₂, disolución de las tabletas y estudio de estabilidad de las muestras tabletas e inyectables, así como la carencia de los reactivos, siendo necesario la complementación del estudio en otro trabajo monográfico.

5.2.1 Preparación de la fase móvil

En la preparación de la fase móvil se empleó agua y metanol grado CLAR; individualmente fueron filtradas con filtro de membranas de nylon y desgasificadas con una bomba al vacío para evitar complicaciones durante el procedimiento analítico, posteriormente el agua fue depositada en el reservorio A (fase acuosa) y el metanol en el reservorio B (fase orgánica), una vez ubicado en sus respectivos reservorios, se programó el sistema en la proporción de Agua: Metanol (60:40).

5.2.2 Preparación del estándar primario USP metronidazol base

En la preparación de la solución madre; se utilizó estándar primario de referencia (ER) metronidazol base USP, con un grado de pureza de 100.42 % según certificado de análisis facilitado por el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos.

Según recomendaciones de la USP 34, se pesó en una balanza analítica con exactitud 15.4 mg de estándar primario, multiplicándose ese valor por la potencia declarada en la etiqueta del estándar para obtener el valor verdadero de 15.46 mg de metronidazol base, transfiriéndose inmediatamente a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió en 10 mL de metanol sonificándolo por 5 minutos y una vez homogenizado se aforó con fase móvil.

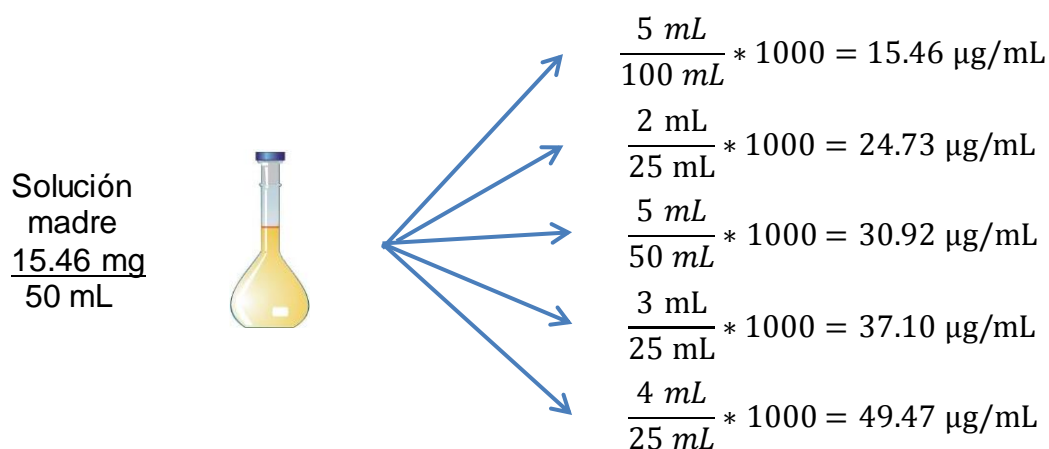


Se preparó a partir de la solución madre las cinco concentraciones para la curva de calibrado: 15.46, 24.73, 30.92, 37.10 y 49.47 $\mu\text{g/ml}$ (50%, 80%, 100%, 120% y 161%) respectivamente, todas con fase móvil.

Los cálculos para llegar a las concentraciones finales son los siguientes:

Diagrama 5.2.2.1

Representación esquemática de la preparación de la curva del calibrado de ER-metronidazol base.



Posteriormente fueron filtradas con filtro de nylon 0.45 μm , descartando las cinco primeras gotas para curar el filtro y la jeringa, consecutivamente se adicionó en los viales correspondientes para ser inyectados automáticamente en el equipo.

5.2.3 Preparación de las muestras

5.2.3.1 Preparación de metronidazol tableta 500 mg

La cantidad de metronidazol por tableta de acuerdo a su composición es de 500 mg. La USP 34 recomendó pesar 10 tabletas de metronidazol, siendo pesada individualmente cada tableta, se obtuvo un peso total de 6803.300 mg y de este se calculó el peso promedio que fue de 680.330 mg por tableta, conteniendo 500 mg de metronidazol y 180.33 mg de placebo analítico.



Posteriormente se pulverizó hasta obtener un polvo fino y homogéneo con ayuda de un motero y pilón, para facilitar su disolución.

Primera disolución:

De la muestra pulverizada se pesó en papel parafinado exactamente 3 muestras individuales con la cantidad de 17.6 mg equivalente a 12.90 mg de principio activo, luego se transfirieron a 3 matraces volumétricos de 25 mL respectivamente rotuladas, enseguida se disolvieron con 15 mL de fase móvil, posterior a esto se sonificó por 5 minutos, una vez homogenizada, se aforó con fase móvil.

$$\text{Cantidad a pesar de polvo} = \frac{12.9 \text{ mg (p.a)} \times 680.330 \text{ mg } (\bar{x} \text{ de tab})}{500 \text{ mg (declara x tab)}} \cong 17.6 \text{ mg}$$

Segunda dilución:

Se midieron de manera independiente 3 alícuotas de 3 mL de la primera disolución y se transfirieron a 3 matraces volumétricos de 50 mL, enseguida se aforaron con fase móvil, se agitó para tener homogeneidad en la muestra, obteniéndose una concentración final de 30.96 µg/mL de metronidazol, que corresponde aproximadamente al punto medio de la curva de calibración (30.92 µg/mL). Luego fueron filtradas con filtro de nylon 0.45 µm y descartando las cinco primeras gotas con el propósito de curar la jeringa y el filtro utilizado, una vez filtradas las muestras se transfirieron a los viales rotulados (con una capacidad de 1.5 mL) debidamente rotulados, para su posterior inyección.

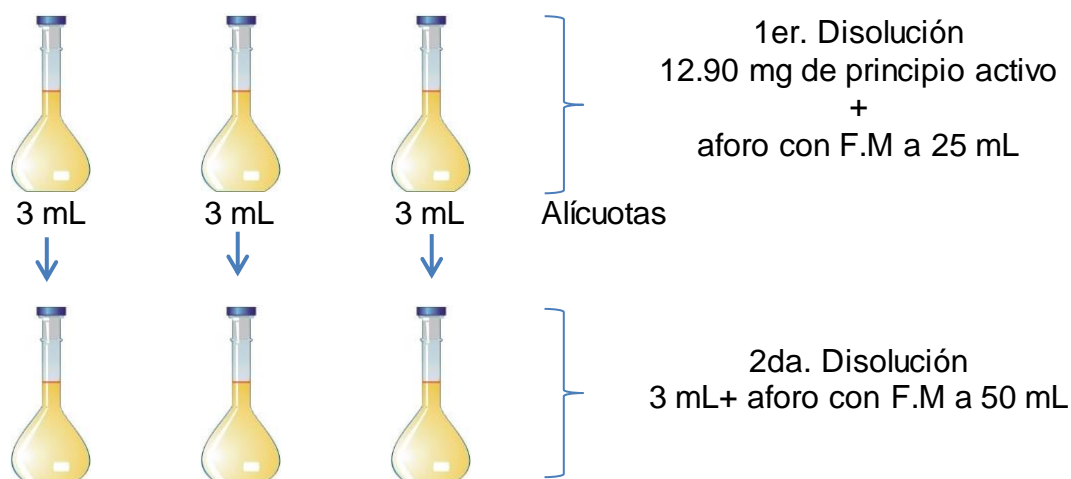
El cálculo fue el siguiente:

$$\frac{12.9 \text{ mg}}{25.0 \text{ mL}} \times \frac{3 \text{ mL}}{50.0 \text{ mL}} = 30.96 \text{ µg/mL}$$



Diagrama 5.2.3.1.1

Representación esquemática de la preparación de la muestra (tableta), concentración de 30.9 µg/mL.



Una vez terminado las preparaciones de las muestras tabletas, se programó la secuencia de lectura en el CLAR, inyectándose cada muestra por triplicado; siendo intercalados entre ellas un estándar de control de metronidazol base con la concentración correspondiente al punto medio del calibrado (30.92 µg/mL).

5.2.3.2 Preparación de metronidazol inyectable 500 mg/100 mL

El proceso de la preparación de la valoración de metronidazol inyectable fue el siguiente:

Solución madre:

La cantidad de metronidazol en inyectable de acuerdo a su composición es de 500 mg/100mL. En un matraz volumétrico 500 mL, se mezclaron tres frascos de solución inyectable de metronidazol, según la norma de muestreo para soluciones inyectables masivas parenterales, con la finalidad de tener una muestra homogénea.



Primera disolución:

Se tomaron tres muestras independientes de la solución madre de 3 mL equivalente a 15 mg de principio activo, transfiriéndose cada alícuota a tres matraces volumétricos de 50 mL respectivamente rotulado, luego se diluyó estas muestras con 15 mL de metanol, las cuales fueron llevadas a ultrasonido por 5 minutos, una vez terminado el tiempo se aforaron con fase móvil.

$$\text{mg de principio activo} = \frac{500.0 \text{ mg (declara p.a)} \times 3.0 \text{ mL (alícuota)}}{100.0 \text{ mL (vehículo del p.a)}} = 15.0 \text{ mg}$$

Segunda disolución:

Se midieron de manera independiente 3 alícuotas de 5 mL de la primera disolución y se transfirieron a 3 matraces volumétricos de 50 mL, enseguida se aforaron con fase móvil, se agitó para tener homogeneidad en la muestra, obteniéndose una concentración final de 30.00 µg/mL de metronidazol, aproximado al punto medio de la curva de calibración (30.92 µg/mL).

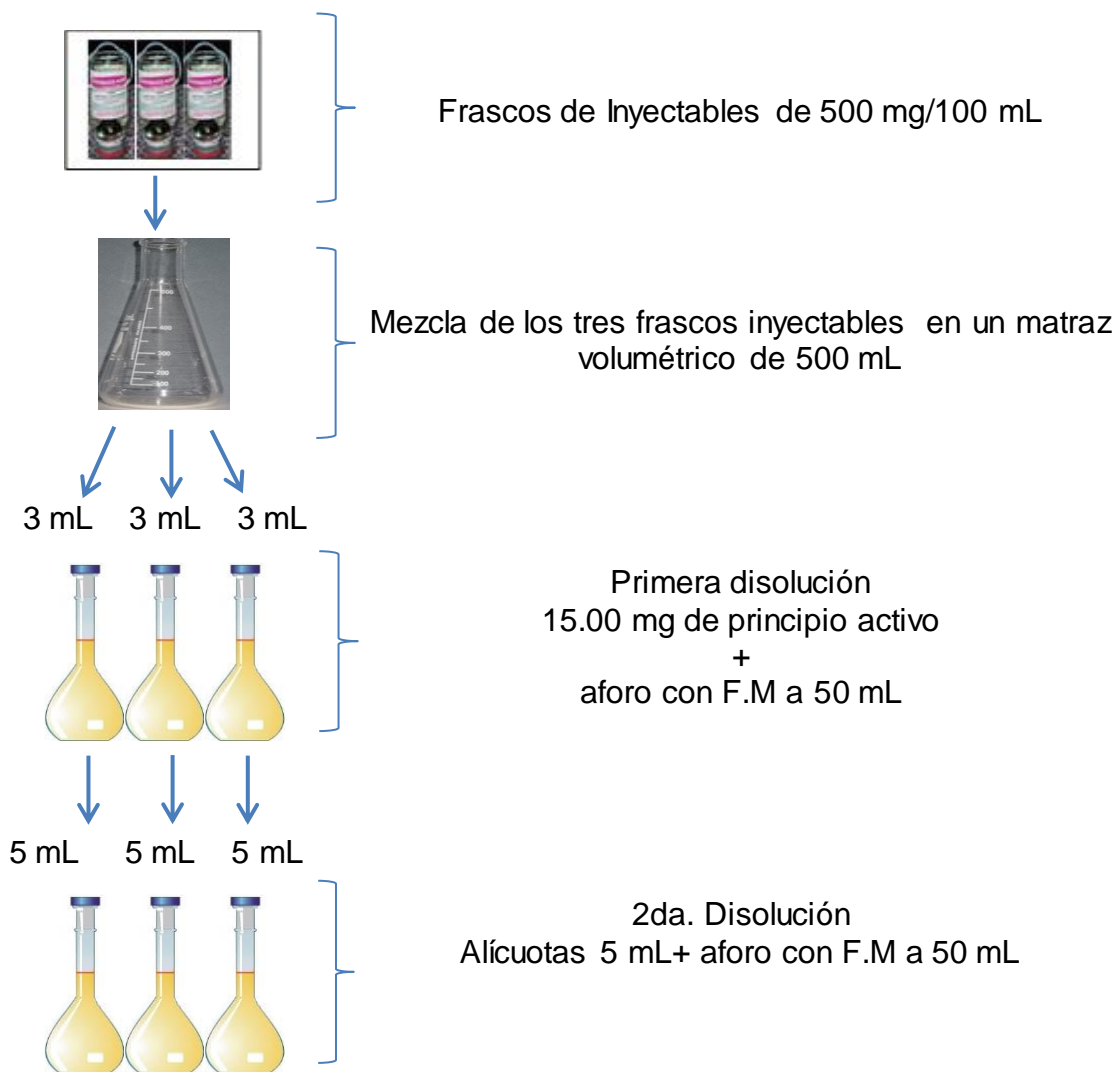
$$\text{Concentración final de metronidazol} = \frac{15.0 \text{ mg}}{50.0 \text{ mL}} \times \frac{5.0 \text{ mL}}{50.0 \text{ mL}} = 30.0 \text{ µg/mL}$$

Luego fueron filtradas con filtro de nylon 0.45 µm y descartando las cinco primeras gotas con el propósito de curar la jeringa y el filtro utilizado, transfiriéndose a viales (con una capacidad de 1.5 mL) debidamente rotulados.

Una vez terminado las preparaciones de las muestras inyectables, se programó la secuencia de lectura en el CLAR, inyectándose cada muestra por triplicado; siendo intercalados entre ellas un estándar de control con la concentración correspondiente al punto medio del calibrado (30.92 µg/mL).



Diagrama 5.2.3.2.1
Representación esquemática de la preparación de la muestra (inyectable),
concentración de 30.00 µg/mL





5.2.3.3 Preparación del placebo

Se prepararon soluciones placebo para ambas formas farmacéuticas, facilitada por el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos. Previamente haciendo los cálculos adecuados, se procedió a pesar cada componente de las formulaciones sin el principio activo con las mismas concentraciones de las muestras inyectadas. Lamentablemente por ser una información confidencial del LNCCM no se puede presentar las fórmulas cualitativa- cuantitativa de las preparaciones de los placebos.

5.2.4 Preparación de las soluciones de trabajo (Espectrofotometría UV-Vis).

5.2.4.1 Preparación del estándar y muestras.

Las soluciones de trabajo del estándar y muestras utilizadas en CLAR, se emplearon en UV-Vis, con la finalidad de comparar el comportamiento de las mismas en las diferentes técnicas; con la única diferencia que las soluciones utilizadas en espectrofotometría fueron filtradas por papel filtro marca Whatman.

Según la recomendación de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), se realizó un barrido con el blanco (diluyente con la misma composición de la fase móvil utilizado en CLAR), posteriormente leyendo las muestras por triplicado entre cada muestra un estándar control con la concentración del punto medio del calibrado (30.92 µg/mL).

5.3 Validación del método de cuantificación del principio activo

Según la USP 34, nuestro trabajo corresponde a la categoría I, en el cual se evaluaron las características de desempeño analítico: especificidad, linealidad e intervalo, precisión; en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, y exactitud. Por ser un estudio de carácter comparativo se incluyeron los parámetros de límite de detección y límite de cuantificación.



5.3.1 Especificidad del método

Se verificó la especificidad del método analítico observando la capacidad de éste, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias químicas diferentes que pueden estar presentes en una misma muestra.

Se prepararon diluciones independientes de tabletas, inyectables y placebo, reflejado en los incisos: 5.2.3.1, 5.2.3.2 y 5.2.3.3

El análisis se realizó por triplicado para cada una de las muestras, realizándose de manera intercalada: muestra, estándar control y placebo.

5.3.1.1 Criterio de aceptación de la especificidad del método

Según la USP 34 el parámetro que nos permitió valorar la especificidad del método es la comparación de la señal obtenida entre el estándar, la muestra y el placebo.

- El criterio de aceptación: la muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

5.3.2 Linealidad del sistema

Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración con 5 niveles de concentraciones diferentes desde 15.46 µg/mL hasta 49.47 µg/mL. Inyectándose automáticamente en CLAR con volumen 20 µL, cada punto por triplicado, hasta obtener 15 determinaciones.



5.3.2.1 Criterio de aceptación de la linealidad del sistema

Los parámetros que nos permitieron valorar la linealidad del sistema son los siguientes:

Parámetro	Criterio de aceptación
➤ Coeficiente de correlación lineal (r)	$r \geq 0.9900$
➤ Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
➤ Intercepto a	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$
➤ Pendiente b	$t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$

5.3.3 Precisión del sistema

En la evaluación de la precisión del sistema se evaluó en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

5.3.3.1 Repetibilidad del sistema (mismo día/analista/equipo)

En el caso de la repetibilidad se prepararon 10 diluciones determinando 10 lecturas de la concentración del punto medio del calibrado del estándar de 30.92 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.3.1.1 Criterio de aceptación de repetibilidad del sistema

- Coeficiente de variación $\leq 2\%$ (CLAR) y $\leq 3\%$ (UV/Vis)

5.3.3.2 Precisión intermedia del sistema (interdía e inter-analista)

La precisión intermedia fue realizada por dos analistas en dos días diferentes. Se prepararon 3 soluciones de trabajo a una concentración única que representó el 100,0 % de la cantidad teórica declarada con una concentración de 30.92 $\mu\text{g/mL}$.



En ambas técnicas cada muestra fue analizada por triplicado, inter día e inter analista. Para su evaluación se realizó un análisis de varianza.

5.3.3.2.1 Criterio de aceptación de la precisión intermedia del sistema

- Coeficiente de variación $\leq 2\%$ (CLAR)
- Coeficiente de variación $\leq 3\%$ (UV/Vis)
- Coeficiente de Variación global $\leq 2\%$ (CLAR y UV/Vis)
- Análisis de varianza con el test de Fisher, donde $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$.
- Factor de cola < 2 (CLAR)
- Número de platos teóricos > 2000 (CLAR)

5.3.4 Exactitud

La Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH) 24, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajan tres niveles diferentes de concentración (50 %, 100 %, 161%) con tres muestras independientes de cada nivel.

Para establecer la exactitud del sistema analítico se prepararon 3 tres muestras independientes con las concentraciones de 15.46, 30.92, 49.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estándar de trabajo con el mismo porcentaje de pureza de 100.42 %.

Diagrama 5.3.4.1

Representación esquemática de la preparación de la exactitud del sistema ER-metronidazol base.

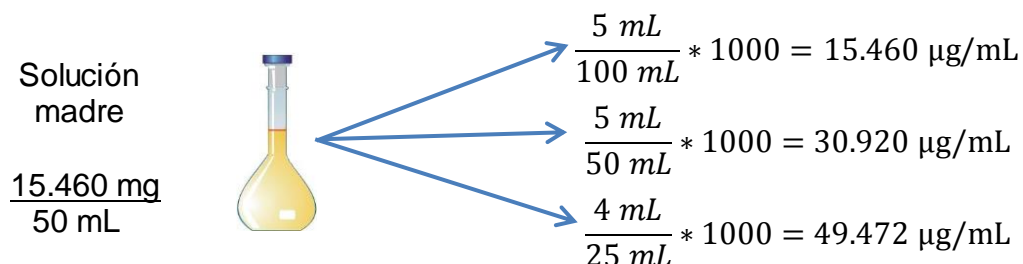




Diagrama 5.3.4.2

Representación esquemática de la preparación de la exactitud del método tableta 500 mg metronidazol base.

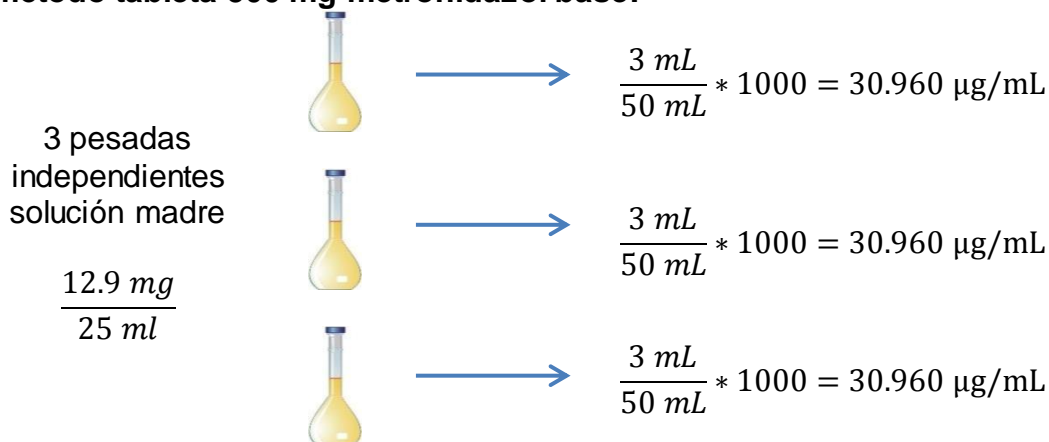
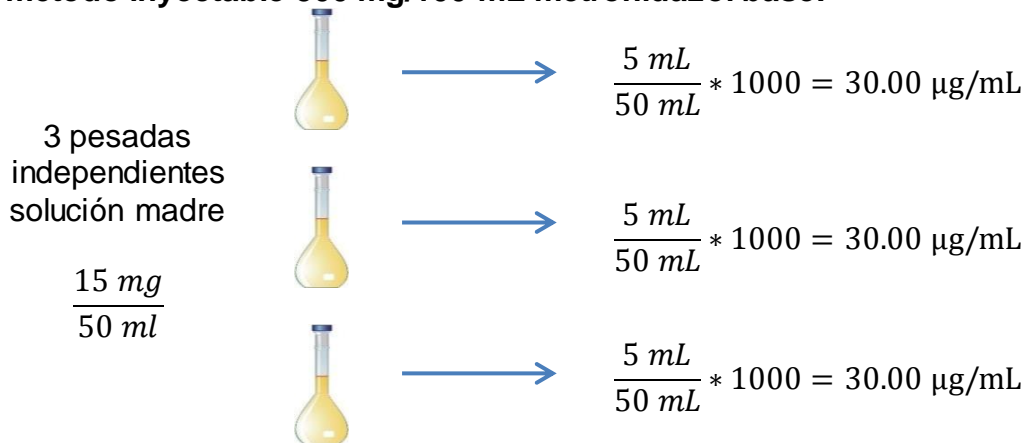


Diagrama 5.3.4.3

Representación esquemática de la preparación de la exactitud del método inyectable 500 mg/100 mL metronidazol base.



5.3.4.1 Criterio de aceptación de Exactitud

- Porcentaje de recuperación: tableta 90.0 % - 110.0 %
- Porcentaje de recuperación: inyectable 90.0 % -110.0 %
- Homogeneidad de variancias (Test Cochran): $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
- Test de t Student: $T_{\text{exp}} < T_{\text{tab}}$
- Test de t Fisher: $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$



5.4 REACTIVOS, EQUIPO y MATERIALES

Reactivos

Nº	Nombres	Marca	Grado	Lote	Procedencia	Fecha de vencimiento
1	Agua bidestilada	-	HPLC	-	RARPE	-
2	Metanol	Merck	HPLC	144270 7-830	MERCK	7-2012
3	Estándar Metronidazol Base Pureza: 100.42%	USP	HPLC	81245	OPS/USP	08-2012

Equipos

Nº	Nombres	Marca	Modelo	Nº Serie	Muestra de verificación de calibración
1	Balanza Analítica	Metler Toledo	AG204	1115140717	Validada: 20-05-2011
2	Bomba al vacío				
3	Ultrasonificador	Acuasonic	P250T	0802-10-10	10-2011
4	Espectrofotómetro UV-Vis Detector de arreglo de Diodo (DAD) Celda: cuarzo (1 cm)	Agilent 8453	PE1164T	CNN4251GXT	30-06-2011
5	Agitador	Agimatic-E			
6	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) Equipado con los siguientes módulos: <ul style="list-style-type: none"> • Detector de Arreglos de Diodos (DAD) • Horno • Inyector automático • Bomba Binaria • Interface • Desgasificador de solventes 	Agilent Technologies 1260 infinity	G1315C G1316A	DEAA200277 DEAAKO1497	30-06-2011



Nota: Por motivo de ser documentos confidenciales, que soporta que los equipos instrumentales estaba recientemente verificado y calibrado por la empresa ORGOMA, que brinda mantenimiento a los equipos del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos, solamente fueron mostrados sin permitir copiar absolutamente ninguna información para soportarlo en este trabajo.

MATERIALES

Descripción	Marca	Capacidad	Clase/Tolerancia
Pipeta Volumétrica	Pyrex	2 mL	Clase A/± 0.010 mL
Pipeta Volumétrica	Pyrex	3 mL	Clase A/± 0.015 mL
Pipeta Volumétrica	Pyrex	4 mL	Clase A/± 0.015 mL
Pipeta Volumétrica	Pyrex	5 mL	Clase A/± 0.015 mL
Pipeta Volumétrica	Pyrex	7 mL	Clase A/± 0.015 mL
Probeta	Pyrex	250 mL	Clase A/± 1.0 mL
Vaso de precipitado forma baja (beaker)	Pyrex	250 mL	Clase A
Vaso de precipitado forma baja (beaker)	Pyrex	500 mL	Clase A
Matraz Volumétrico aforado	Pyrex	25 mL	Clase A/ ± 0.040 mL
Matraz Volumétrico aforado	Pyrex	50 mL	Clase A/ ± 0.060 mL
Matraz Volumétrico aforado	Pyrex	100 mL	Clase A/ ± 0.1 mL
Matraz Volumétrico aforado	Pyrex	1000 mL	Clase A/ ± 0.400 mL
Papel Filtro de Membranas de nylon REF: 7404-004 LOTE: D117526		0.45 µm	
Filtros para jeringas de nylon	Millipore	0.45 µm X 33 mm	
Viales para el carrusel del inyector automático	Agilent		
Columna cromatográfica	Agilent	C ₈ 4.6mm x 25 cm x 5 µm	
Espátula de acero inoxidable			
Celda de cuarzo		1 cm	



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Técnica Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con una bomba binaria.

Todos los parámetros se evaluaron con un nivel de confianza de 95%.

6.1.1 Especificidad del método

Se verificó la especificidad del método analítico observando la capacidad de éste, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias químicas diferentes que pueden estar presentes en una misma muestra.

Para comprobar la especificidad del método, se inyectaron soluciones: fase móvil, placebo, tableta, inyectable y solución estándar de metronidazol base. El tiempo de retención obtenido fue de 3.4 minutos para el estándar y para las muestras anteriormente mencionadas. Los estudios de especificidad demostraron que ni la fase móvil, ni el placebo presentan ningún pico en el tiempo de retención de metronidazol. Esto confirma que los excipientes utilizados en la fabricación de la tableta e inyección no interfirieron con el pico de metronidazol. Los cromatogramas están reflejados en el Anexo No. 1.

6.1.2 Calibrado del sistema por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Se preparó una curva de calibración con soluciones de estándar primario de metronidazol base, en un intervalo de concentraciones de 15.46, 24.73, 30.92, 37.10 y 49.47 $\mu\text{g/mL}$. El análisis se realizó por triplicado en cada concentración, obteniendo 15 determinaciones en un sistema CLAR, los datos se reflejan en la tabla N° 6.1.2.1



TABLA N°6.1.2.1. Evaluación de la curva de calibración en CLAR

N° Muestras	Concentración (µg/ml) Variable x	Área (mAU) Variable y	Platos teóricos (N)	Tiempo muerto (t _m)	Tiempo retención (t _r)	Factor de capacidad k'	Factor de Cola
1	15.460	456.000	2999.807	0.128	3.420	1.742	0.41
	15.460	456.100	2896.791	0.130	3.410	1.740	0.41
	15.460	456.400	2964.448	0.124	3.410	1.723	0.41
2	24.730	774.400	2964.448	0.129	3.410	1.723	0.41
	24.730	774.800	2881.064	0.125	3.410	1.726	0.41
	24.730	774.900	2946.706	0.129	3.410	1.722	0.41
3	30.920	950.000	2954.692	0.127	3.410	1.722	0.41
	30.920	948.100	2967.278	0.129	3.410	1.732	0.41
	30.920	949.600	2945.507	0.126	3.410	1.729	0.40
4	37.100	1131.400	2942.726	0.128	3.410	1.720	0.41
	37.100	1130.700	2963.253	0.130	3.410	1.721	0.40
	37.100	1131.200	2877.211	0.125	3.410	1.719	0.40
5	49.470	1512.100	2949.497	0.127	3.410	1.713	0.40
	49.470	1511.500	2873.365	0.127	3.410	1.717	0.40
	49.470	1512.900	2947.096	0.127	3.400	1.722	0.40
Pendiente (b)				30.7453			
Intercepto (a)				-4.9106			
Coeficiente de correlación(r)				0.9995			
Coeficiente de determinación (r ²)				0.9990			

Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y Programa Microsoft Excel 2010

En la tabla 6.1.2.1 reflejan los datos proporcionado por el software ChemStation de Agilent 1260, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r²).

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} = 0.9995 \quad (\text{Ecuación 5})$$



Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = 0.9995^2 = 0.9990$$

(Ecuación 6)

6.1.2.1 Evaluación del desempeño del sistema CLAR.

Este proceso se realizó por medio de la curva de calibración del sistema, con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos:

Tabla N° 6.1.2.1.1 Funcionamiento del sistema en CLAR

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumplimiento
Tiempo de retención	RSD < 1.0 %	0.003	Cumple
Factor de capacidad	Superiores a 1	1.730	Cumple
Simetría del pico	Máximo 2	0.406	Cumple
Platos teóricos	Mínimo 2000	2938.259	Cumple

Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

Todos los valores que se obtuvieron de los platos teóricos son superiores a 2000 por tanto se cumple con el criterio de aceptación del funcionamiento del sistema. Al obtener valores superiores a 2000 se comprueba la eficacia de la columna.

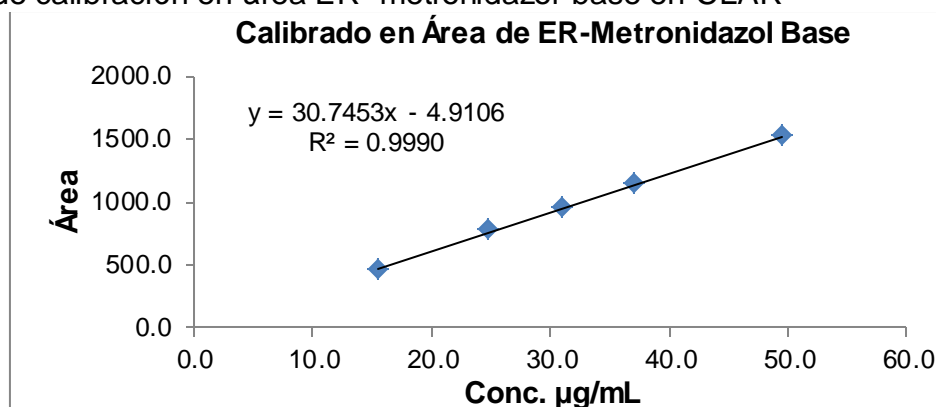
El factor de capacidad (k') promedio es de 1.730 lo que indica que el pico de metronidazol no eluye próximo al del solvente, por lo que la selectividad no se ve comprometida en el procedimiento analítico.

A continuación se presenta el calibrado y la ecuación de la recta, en ella se observa una proporcionalidad entre concentración y respuesta cromatográfica.



GRAFICON°6.1.2.1.1

Curva de calibración en área ER- metronidazol base en CLAR



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y programa Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según $y = 30.7453x - 4.9106$ con $r = 0.9995$ y $r^2 = 0.9990$

6.1.3 Linealidad del sistema por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 15.46, 24.73, 30.92, 37.10 y 49.47 µg/mL de metronidazol base; estándar primario de referencia USP, con un porcentaje de grado de pureza de 100.42 %.

El análisis se realizó por triplicado en cada concentración, obteniendo 15 determinaciones en un sistema CLAR, los datos se reflejan en la tabla N° 6.1.3.1

Nota aclaratoria: debido al tiempo transcurrido desde el desarrollo de la parte experimental hasta la redacción de este trabajo, dicho estándar con su certificado ha sido eliminado de los archivos del LNCCM, por política internas que una vez vencido el estándar de referencia, con la finalidad de mantener disponible el espacio para el estándar de remplazo.



TABLA N° 6.1.3.1.

Evaluación de la linealidad del sistema de metronidazol base en CLAR

N° Muestra	N° Replica	Concentración (µg/mL) Variable x	Área (mAU) Variable y	Area Promedio (mAU) Variable y	Tiempo de Retención
1	1	15.46	458.600	458.100	3.410
	2	15.46	457.800		3.410
	3	15.46	457.900		3.409
2	4	24.73	776.200	776.233	3.410
	5	24.73	775.800		3.403
	6	24.73	776.700		3.403
3	7	30.92	948.100	948.867	3.406
	8	30.92	949.800		3.404
	9	30.92	948.700		3.406
4	10	37.10	1135.800	1136.233	3.409
	11	37.10	1137.900		3.405
	12	37.10	1135.000		3.404
5	13	49.47	1511.300	1512.533	3.407
	14	49.47	1512.600		3.405
	15	49.47	1513.700		3.402
Variabilidad o Parámetros Estadísticos					
Pendiente (b)					30.736
Intercepto (a)					-2.896
Coeficiente de Correlación (r)					0.9995
Coeficiente de Determinación (r ²)					0.9990

Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y programa Microsoft Excel 2010

6.1.3.1 Ecuación de la recta de la linealidad del sistema CLAR

La mayoría de los métodos analíticos se basan en una curva de calibración en la que una cantidad medida “y” se representa en función de la concentración conocida “x” de una serie de patrones (Skoog, 2009).

La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = bx + a$, donde “b” es la pendiente y “a” la ordenada en el origen, obtenida por un método de ajuste (AEFI, 2001).



Se utilizó el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Skoog, 2009)

**TABLA N°6.1.3.1.1****Análisis de mínimos cuadrados en los datos de CLAR**

CONC µg/mL (x)	AREA (y)	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	\hat{y}	$(\hat{y} - y_i)$ promedio	$(\hat{y} - y_i)^2$ promedio
15.460	458.600	-16.076	258.438	-507.793	257854.069	8163.286	472.282	-14.182	201.134
15.460	457.800	-16.076	258.438	-508.593	258667.179	8176.146	472.282		
15.460	457.900	-16.076	258.438	-508.493	258565.470	8174.539	472.282		
24.730	776.200	-6.806	46.322	-190.193	36173.504	1294.456	757.204	19.029	362.098
24.730	775.800	-6.806	46.322	-190.593	36325.819	1297.178	757.204		
24.730	776.700	-6.806	46.322	-189.693	35983.561	1291.053	757.204		
30.920	948.100	-0.616	0.379	-18.293	334.646	11.269	947.460	1.407	1.979
30.920	949.800	-0.616	0.379	-16.593	275.339	10.221	947.460		
30.920	948.700	-0.616	0.379	-17.693	313.054	10.899	947.460		
37.100	1135.800	5.564	30.958	169.407	28698.619	942.579	1137.408	-1.175	1.380
37.100	1137.900	5.564	30.958	171.507	29414.537	954.263	1137.408		
37.100	1135.000	5.564	30.958	168.607	28428.208	938.127	1137.408		
49.470	1511.300	17.934	321.628	544.907	296923.275	9772.356	1517.612	-5.079	25.792
49.470	1512.600	17.934	321.628	546.207	298341.723	9795.670	1517.612		
49.470	1513.700	17.934	321.628	547.307	299544.587	9815.398	1517.612		
$\Sigma = 473.040$	14495.900		1973.176		1865843.589	60647.441	14495.900		592.383
$\bar{X} = 31.536$	966.393		131.545		124389.573	4043.163	966.393		118.477

Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y programa Microsoft Excel 2010



La ecuación utilizada para \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 7})$$

Según, Skoog (2009), la línea generada por el método de mínimos cuadrados es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuos de todos los puntos. Además de aportar el mejor ajuste entre los puntos experimentales y la línea recta, el método proporciona la desviación estándar de la pendiente (b) y el intercepto (a).

Conviene calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las variables de S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} y de forma siguiente encontrar la pendiente y el intercepto:

1. S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

x_i = pares de datos individuales de x

\bar{x} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 1973.176$$



2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 1865843.589$$

3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} = 60647.441$$

Para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$b = \frac{60647.441}{1973.176} = 30.736$$

Donde:

S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x



Ecuación del intercepto (a):

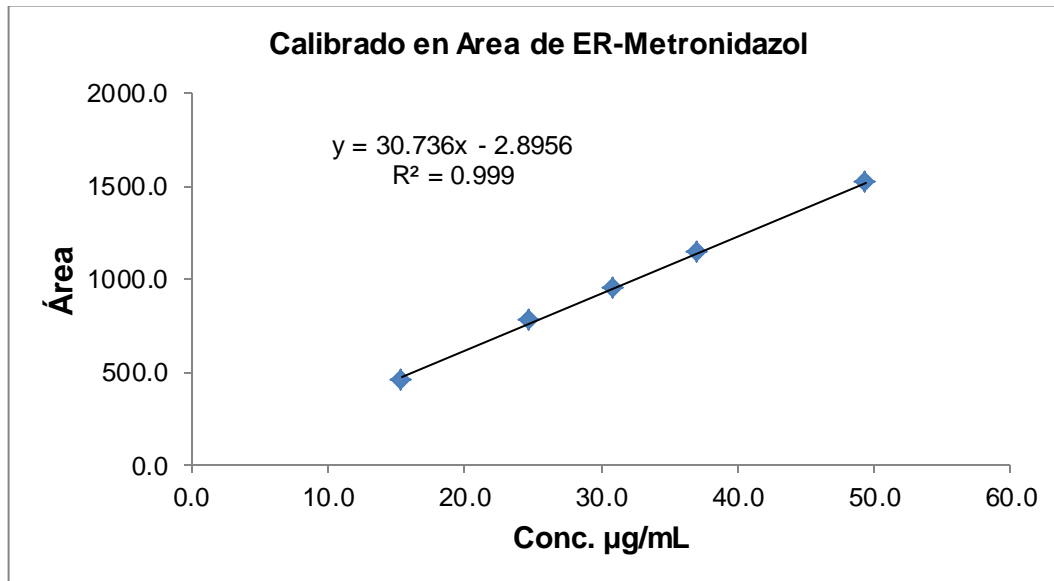
$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

(Ecuación 12)

$$a = 966.393 - (30.736 * 31.536) = -2.896$$

GRAFICON° 6.1.3.1.1

Calibrado de la linealidad del sistema de ER- metronidazol base en CLAR



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y programa Microsoft Excel 2010

Según, Skoog (2009), la pendiente es un factor que limitan la sensibilidad, siendo el valor de la pendiente de 30.736 y el sesgo es de -2.8956 indicado por el valor del intercepto.

6.1.3.2 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en CLAR

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student. Para calcular el t_{exp} de dos cola, para $n-2$ grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.975, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.



Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp}(b) = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Para encontrar el t_{exp} es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r) para obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{1865843.589 - ((30.736)^2 * 1973.176)}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{1,865,843.589 - 1,864,056.793}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{1,786.797}{13}} = \sqrt{137.446} = \mathbf{11.724}$$

Desviación estándar de la pendiente S_b

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

$$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$$S_b = \sqrt{(11.724)^2 / 1973.176} = \sqrt{0.070} = \mathbf{0.264}$$



Se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{30.736}{0.264} = \mathbf{116.456}$$

Al comparar el valor t_{exp} con el t_{tab} , se demostró que existen diferencias significativas, siendo $t_{exp} 116.456 > t_{tab} 2,160$, comprobando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero.

Intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calculó:

$$\begin{aligned} b \pm t * S_b &= 30.736 \pm 2.16 * 0.264 \\ &30.736 \pm 0.570 \\ &[30.166 \text{ a } 31.306] \end{aligned}$$

6.1.3.3 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en CLAR

Mediante este test se evaluó que la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando que la variable independiente (x) es significativamente distinta de cero.

Cabe mencionar, en el inciso 6.1.3.2 el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$



Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$|a|$ = valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto

Para encontrar el t_{exp} para el intercepto es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r), la cual fue calculada en el inciso 6.1.3.2 con la ecuación 14, siendo éste un valor de 11.724 y por ende obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar del intercepto

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$S_a = 11.724 * \sqrt{\frac{1}{15 - (223,766.842)/16,890.965}} = 8.857$$

$$t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{2.896}{8.857} = 0.327$$

Se cumplió que $t_{exp(a)} < t_{tab}$. Para calcular el t_{tab} de dos cola, para n-2 grados de libertad =13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.95, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160, siendo $t_{exp(a)} 0.327 < t_{tab} 2.160$; se comprueba que la variable x es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calculó:

$$a \pm t * S_a = -2.896 \pm 2.160 * 8.857$$

$$-2.896 \pm 19.131$$

$$[-22.027 \text{ a } 16.235]$$



6.1.3.4 Test G de Cochran

La prueba de Cochran nos indica para determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas.

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{máxima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde:

s^2 máxima: varianza máxima de los grupos

$\sum s_i^2$: sumatoria de la varianza de cada grupo

El valor crítico de Cochran se determina $C = (K, \nu, \alpha)$

Donde

K es el número de grupo de datos o números de réplicas

ν es el número de grado de libertad definido como $n_{\max} - 1$, donde n_{\max} es el mayor de los tamaños de la muestra y α el nivel de significancia usualmente 0.05.

El criterio de aceptación: si el $G_{exp} < G_{tab}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influyen estadísticamente en la variabilidad de los resultados.



Prueba de homogeneidad de varianzas

TABLA N° 6.1.3.4.1

Test de G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR

N°	Concentración (µg/mL) Variable x	Área (mAU) Variable y	Factor respuesta f(y/x)	Promedio de f(y/x)	Desviación estándar (s) de f(y/x)	Varianza (s ²) de f(y/x)
1	15.460	458.600	29.664	29.631	0.028	0.00079
	15.460	457.800	29.612			
	15.460	457.900	29.618			
2	24.730	776.200	31.387	31.388	0.018	0.00033
	24.730	775.800	31.371			
	24.730	776.700	31.407			
3	30.920	948.100	30.663	30.688	0.028	0.00078
	30.920	949.800	30.718			
	30.920	948.700	30.682			
4	37.100	1135.800	30.615	30.626	0.040	0.00163
	37.100	1137.900	30.671			
	37.100	1135.000	30.593			
5	49.470	1511.300	30.550	30.575	0.024	0.00059
	49.470	1512.600	30.576			
	49.470	1513.700	30.598			
Promedio (\bar{x})			30.582	$\Sigma S_i^2 = 0.00412$		
Desviación Estándar (S)			0.580			

Fuente: Software ChemStation Agilent 1260 y programa Microsoft Excel 2010

La hipótesis es:

$$H_o = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

$$G_{exp} = \frac{0.00163}{0.00412} = \mathbf{0.395}$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis nula donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de $f(y/x)$
 $G_{exp} 0.395 < G_{tab} (\alpha = 0.05, K = 5, n = 3) = 0.683.$



6.1.3.5 Coeficientes de variación de los factores respuestas

Esta prueba nos permitió relacionar la lectura o respuesta en área y la concentración. Se recomienda obtener valores menores al 2% para ello se aplica la siguiente ecuación: (AEFI, 2001).

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Donde:

s= desviación estándar

\bar{X} = media de los resultados

Según en la tabla N° 6.1.3.4.1 test G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR, la desviación estándar global del factor respuesta es de: 0.580 y el promedio global es de 30.582 por tanto:

$$CV = \frac{0.580}{30.582} * 100 = \mathbf{1.896 \%}$$

Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta (C.V._f) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV_f = 1.896 \% < 2\%$ demostrándose la adecuada linealidad del sistema.



6.1.3.6 Análisis de varianza en CLAR

El análisis de la varianza de la regresión (ANOVA) es un método que se emplea para comparar resultados obtenidos por distintos métodos, laboratorios, analistas, etc., cuando el número de medias obtenidas es superior a dos. También permite separar las contribuciones de uno o más factores a la varianza global del sistema (AEFI, 2001).

Tabla Nº 6.1.3.6.1
ANÁLISIS DE VARIANZA EN CLAR

Nº	Concentración (µg/mL) Variable x	Área (mAU) Variable y	Análisis de residual			Análisis de la regresión	
			\hat{y}	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
1	15.460	458.600	472.282	-13.682	187.202	-494.111	244145.8347
	15.460	457.800	472.282	-14.482	209.733	-494.111	244145.8347
	15.460	457.900	472.282	-14.382	206.847	-494.111	244145.8347
2	24.730	776.200	757.204	18.996	360.831	-209.189	43759.98998
	24.730	775.800	757.204	18.596	345.795	-209.189	43759.98998
	24.730	776.700	757.204	19.496	380.077	-209.189	43759.98998
3	30.920	948.100	947.460	0.640	0.410	-18.933	358.4715954
	30.920	949.800	947.460	2.340	5.476	-18.933	358.4715954
	30.920	948.700	947.460	1.240	1.538	-18.933	358.4715954
4	37.100	1135.800	1137.408	-1.608	2.586	171.015	29246.07349
	37.100	1137.900	1137.408	0.492	0.242	171.015	29246.07349
	37.100	1135.000	1137.408	-2.408	5.799	171.015	29246.07349
5	49.470	1511.300	1517.612	-6.312	39.840	551.219	303841.8944
	49.470	1512.600	1517.612	-5.012	25.119	551.219	303841.8944
	49.470	1513.700	1517.612	-3.912	15.303	551.219	303841.8944
	Promedio	966.393	966.393		SC _{RES} = 1786.797		SC _{REG} = 1864056.793

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a \quad \text{(Ecuación 7)}$$



Según AEFI (2009), el análisis de la varianza se fundamentó en la suma de cuadrados totales la cual se descompone en dos componentes, la suma de cuadrados de los residuales y la regresión: $SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$

Según la ecuación reflejada en AEFI (2001), se calculó la varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

$$\text{Varianza Residual} = S^2_{y,x} = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{1786.797}{13} = 137.446$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \mathbf{137.446}$$

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SC_T = 1786.797 + 1864056.793 = 1865843.589$$

$$\mathbf{SC_T = 1865843.589}$$

Una vez realizada los cálculos de las varianzas y de los residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), el cual es una prueba estadística que sirve para comparar varianzas, donde se cumple el criterio que $F_{exp} > F_{tab}$.

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde:

SC_{REG} : suma de cuadrados de la regresión

V_{RES} : 137.4746

V_{REG} : 1864056.793, para un grado de libertad

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} = \frac{1,864,056.793}{137.446} = \mathbf{13562.113}$$



Por lo tanto Fisher será: $13562.113 > F_{\text{tab}}(0.05, 1, n-2) = 4.667$ cumpliendo el criterio de aceptación, demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.

Se validó la linealidad de la metodología del sistema, para lo cual se partió de una solución concentrada de estándar metronidazol base, se prepararon una curva de calibración, con 5 niveles de concentración del analito en el rango de trabajo de 15.26 a 47.49 $\mu\text{g/mL}$.

La evaluación de los coeficientes de determinación r^2 y de correlación r , en el sistema demostraron correlación entre la concentración ($\mu\text{g/mL}$) y la respuesta (área) y que los cambios en la respuesta (variable dependiente) son debidos a variación en la concentración (variable independiente) (AEFI, 2001).

Se aplicaron diferentes test estadísticos para demostrar la linealidad del sistema, como: el ajuste de la curva de calibración por mínimos cuadrados, obteniéndose los valores de la pendiente y el intercepto con sus respectivas desviaciones estándares, aplicándose el t de Student para demostrar que existe diferencia significativas.

Con la aplicación del test de Cochran se demostró la homogeneidad de varianza. Se realizó el análisis de varianza de la regresión ANOVA, se evaluaron los residuos y se determinó que estos son independientes y tienen distribución normal, presentado homocedasticidad y que la relación entre concentración y área es lineal. Ver anexo 4 (gráfica de residuales y normalidad para la linealidad), también se aplicó el test estadístico F de Fisher para verificar la linealidad. Bajo la evidencia muestral y con un nivel de confianza del 95%, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de los niveles estudiados, obteniendo un valor f de Fisher experimental mayor que el valor de f tabulado, indicando regresión.



6.1.4 Precisión del sistema en CLAR

Para evaluar la precisión se trabajó con muestras de estándar primario de referencia de metronidazol base USP con un grado de pureza de 100.42 %. El estudio de la precisión se realizó mediante la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia del sistema.

6.1.4.1 Repetibilidad del sistema en CLAR

La repetibilidad se analizó mediante la evaluación de 10 determinaciones, se trabajó con la concentración media de trabajo de 30.92 $\mu\text{g/ml}$; se determinaron los valores medios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación en función al factor de respuesta.



TABLA N°6.1.4.1.1

Evaluación de repetibilidad del sistema en CLAR

Número de lecturas	Concentración (µg/mL) Variable x	Área (mAU) Variable y	Factor Respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)		T _r	N
				Media	Desviación estándar (s)		
1	30.920	945.800	30.589	30.585	0.018	3.403	2955.754
2	30.920	946.700	30.618			3.403	2954.692
3	30.920	945.000	30.563			3.400	2954.448
4	30.920	945.700	30.585			3.402	2954.448
5	30.920	944.700	30.553			3.400	2946.706
6	30.920	945.600	30.582			3.400	2957.278
7	30.920	946.000	30.595			3.402	2949.497
8	30.920	945.900	30.592			3.403	2947.726
9	30.920	945.400	30.576			3.403	2945.507
10	30.920	946.100	30.598			3.402	2947.096
Coefficiente de Variación CV, %			0.059 %	Cumple			
Criterio de aceptación CV (%) ≤ 2%			Conclusión				

Fuente: Software ChemStation y Programa Microsoft Excel 2010.



6.1.4.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema en CLAR

Los datos obtenidos se evaluaron con un tratamiento estadísticos con las siguientes especificaciones:

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$\bar{x} = 30.585$$

➤ **Desviación estándar (s)**

En la precisión en condiciones de repetibilidad en función del factor de respuesta se obtuvo una desviación estándar pequeña con un valor de 0.018 indicando la buena precisión del sistema donde demuestra que no se observó una diferencia significativa.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$s = 0.018$$

➤ **Coefficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación (CV), nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media. Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor de unidad de medida (Skoog, 2003).

El coeficiente de variación entre los datos se calcula utilizando la siguiente ecuación 19.

$$CV = \frac{0.018}{30.585} * 100 = 0.059 \equiv 0.06\%$$



Se aprecia en la tabla 6.1.4.1.1, que el CV % está por debajo de 2 % obteniéndose un valor de 0.059 %, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la vez aceptable.

6.1.4.2 Precisión Intermedia del sistema en CLAR

El estudio de precisión intermedia se realizó para evaluar las fuentes de variación en el análisis inter analistas e inter día, se trabajó con concentraciones similares (30.92 $\mu\text{g/mL}$ y 30.52 $\mu\text{g/mL}$) los dos días.

Se aplicó el estadístico de t de Student y la prueba de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados analíticos obtenidos por ambos analistas.

Los datos obtenidos están representados en función del factor de respuesta para determinar si el factor de concentración influye en la variabilidad de los resultados. Las respuestas obtenidas de la precisión intermedia de cada analista y en días diferentes están reflejadas en el anexo 8 y 9.



Se obtiene los siguientes resultados:

TABLA N°6.1.4.2.1

Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR

Conc. µg/ml	ANALISTA: A		ANALISTA: B		Fórmula
	1er Día	2do Día	1er Día	2do Día	
	Factor de Respuesta		Factor de Respuesta		
30.920	31.801	31.691	31.429	31.671	Coeficiente de variación $CV \% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$
30.920	31.811	31.646	31.415	31.701	
30.920	31.873	31.675	31.510	31.704	
30.920	31.818	31.717	31.468	31.271	
30.920	31.814	31.666	31.474	31.383	
30.920	31.805	31.708	31.465	31.229	
30.920	30.741	31.494	31.429	31.278	
30.920	30.731	31.468	31.458	31.314	
30.920	30.747	31.394	31.471	31.317	
Media	31.460	31.607	31.458	31.430	
S	0.541	0.121	0.029	0.201	
CV (%)	1.719	0.382	0.093	0.640	
CV _{global}		0.708			
Criterio de aceptación		CV _{global} (%) ≤ 2%		Conclusión	Cumple

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

En tabla N° 6.1.4.2.1, se aprecia que los coeficientes de variación experimentales en los dos analistas y en diferentes días están por debajo del 2%, cumpliendo el criterio de aceptación para métodos Cromatográficos (CV ≤ 2 %) según lo establecido por la USP 34 y según RCTA 11:03:39:06.



6.1.4.2.1 Evaluación estadística para la precisión intermedia en CLAR

TABLA N°6.1.4.2.1.1

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo en CLAR

Análisis de varianza 30.92 µg/mL						
Resumen						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Analista 1	2	63.0667	31.5333	1.07E-02		
Analista 2	2	62.8874	31.4437	3.93E-04		
Día 1	2	62.9177	31.4589	2.75E-06		
Día 2	2	63.0363	31.5182	1.57E-02		
Origen de las variaciones	∑ SC	Grados de libertad	Promedio ∑ SC	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	0.0080	1.0	0.0080	1.0544	0.4916	161.4476
Días	0.0035	1.0	0.0035	0.4610	0.6203	161.4476
Error	0.0076	1.0	0.0076			
Total	0.0192	3.0				

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Se realizó un análisis de varianza de los datos aplicándose el test Fischer. Los valores obtenidos demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05% ya que el valor de F_{exp} es menor que F_{tab} . (Inter analista $F_{exp} 1.0544 < F_{tab} 161.4476$; inter día $F_{exp} 0.4610 < F_{tab} 161.4476$).

TABLA N°6.1.4.2.1.2

Precisión intermedia interdia e interanalista en CLAR

t estadígrafo Student

Analista: A		Analista: B	Analista: A vs. B		fórmula
			1er día	2do día	
t_{exp}	0.376	1.053	0.897	0.372	$t_{exp} = \frac{\bar{x}}{(s\sqrt{n})}$
t_{tab}	2.306	2.306	2.306	2.306	
$T_{exp} < t_{tab}$. No existe diferencias significativas					

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



Al realizar la prueba de Student para ambos analistas, el valor experimental resultó ser menor que el tabulado, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un 5%.

6.1.5 Exactitud del sistema en CLAR

La exactitud del sistema se verificó a través de la prueba de estándar de referencia, mediante el análisis de un estándar primario de referencia USP certificado, facilitado por LNCCM.

Según las recomendaciones de la ICH (2002), se evaluó la exactitud a 3 concentraciones de trabajo de 15.46, 30.92 y 49.47 ($\mu\text{g/mL}$) de estándar primario de metronidazol base, los cuales corresponde al punto mínimo, medio y máximo de los valores de la curva de calibración reflejado en la tabla N°6.1.2.1.

TABLA N° 6.1.5.1
Evaluación de la exactitud del sistema en CLAR

N° lectura	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) Variable x	Área (mAU) Variable y	Factor de repuesta $F=Y/X$	Promedio de $F(Y/X)$	Desviación estándar (s) de $F(Y/X)$	Varianza (s^2) de $F(Y/X)$
1	15.460	481.100	31.119	31.164	0.045	0.00205
2		481.800	31.164			
3		482.500	31.210			
4	30.920	1000.900	32.371	32.361	0.017	0.00028
5		1000.000	32.342			
6		1000.900	32.371			
7	49.470	1533.800	31.005	31.007	0.002	0.00001
8		1534.000	31.009			
9		1534.000	31.009			
Promedio \bar{x}			31.511	$\Sigma S_i^2 = 0.00234$		
Desviación Estándar (s)			0.642			
C.V _f %			2.036%			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



6.1.5.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en CLAR

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$\bar{x} = 31.511$$

➤ **Desviación estándar (s)**

$$S = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$S = 0.642$$

Test de proporcionalidad: G de Cochran

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde:

s^2 máxima: varianza máxima de los grupos

$\sum s_i^2$: sumatoria de la varianza de cada grupo

$$G_{exp} = \frac{0.0020}{0.0023} = \mathbf{0.870}$$



El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05\%$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966.

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple con el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.870 < 0.966$.

6.1.5.2 Exactitud del método en CLAR

Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de metronidazol base tableta.

En el inciso 5.2.3.1 se indica cómo se prepararon las muestras para determinar el porcentaje de recuperación en tabletas.

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada tableta (mg)	500.00
Peso promedio de las 10 tabletas (mg)	680.33
Cantidad pesada del polvo homogéneo (resultado de 10 tabletas) (mg)	17.533
Cantidad de principio activo (p.a) en la muestra pesada (mg)	12.90

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{\text{Cantidad pesada} * \text{Declaración de p.a en la tableta}}{\text{Peso promedio de la tableta}}$$

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{17.553 \text{ mg} * 500 \text{ mg}}{680.330} = 12.900 \text{ mg}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{\text{cantidad de p.a en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$



$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{12.900 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} * \frac{3 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} * 1000 = 30.96 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Concentración encontrada con el calibrado } \mu\text{g/mL}}{\text{Concentración a } \mu\text{g/mL inyectar}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{32.308 \mu\text{g/mL}}{30.961 \mu\text{g/mL}} * 100 = 104.351 \%$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 104.351 % el cual está dentro de los valores orientativos para formulado farmacéutico del 90.0 % - 110.0 % según la USP 34.



6.1.5.2.1 Exactitud del método de metronidazol 500 mg tableta en CLAR

TABLA N°6.1.5.2.1.1

Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg tableta

PENDIENTE 30.7453								
Declara principio activo en Tab/mg	Cantidad pesada mg de polvo	Conc. µg/mL a inyectar	Cantidad pesada de principio activo (mg)	AREA	Conc. calibrado µg/mL	mg encontrado en la muestra de principio activo	Media mg/ Tab encontrado de principio activo	Recuperación %
500	17.553	30.961	12.900	991.200	32.239	13.433	13.431	104.128
500	17.553	30.961	12.900	991.500	32.249	13.437		104.160
500	17.553	30.961	12.900	990.400	32.213	13.422		104.044
500	17.553	30.961	12.900	993.300	32.307	13.461	13.465	104.349
500	17.553	30.961	12.900	993.700	32.320	13.467		104.391
500	17.553	30.961	12.900	993.600	32.317	13.465		104.381
500	17.553	30.961	12.900	995.500	32.379	13.491	13.490	104.580
500	17.553	30.961	12.900	995.200	32.369	13.487		104.549
500	17.553	30.961	12.900	995.500	32.379	13.491		104.580
$\bar{x} = 500$	17.553	30.961	12.900	993.322	32.308	13.462	13.462	104.351



TABLA N° 6.1.5.2.1.1.1

Test G de Cochran en CLAR

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta

N° Lectura	Conc. (µg/mL)	% RECUPERACION	Promedio % Recuperación	Desviación (s) % Recuperación	Varianza (s ²) % Recuperación
1	30.961	104.128	104.111	0.060	0.0036
2		104.160			
3		104.044			
4	30.961	104.349	104.374	0.022	0.0005
5		104.391			
6		104.381			
7	30.961	104.580	104.570	0.018	0.0003
8		104.549			
9		104.580			
Promedio \bar{x}		104.351	$\Sigma s_i^2 = 0.0044$		
Desviación Estándar (s)		0.202			
C.V _f %		0.194			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad

Test de Cochran

Cabe mencionar anteriormente en el inciso 6.1.3.4, que, el test de G de Cochran se utiliza para determinar si el factor de concentración influye en la variabilidad de los resultados.

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\Sigma s_i^2} \qquad G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\Sigma s_i^2} = \frac{0.0036}{0.0044} = \mathbf{0.818}$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05\%$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966. Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple con el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.818 < 0.966$.



Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de metronidazol base, inyectable.

En el inciso 5.2.3.2 se indica cómo se prepararon las muestras para determinar el porcentaje de recuperación en inyectables.

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada inyectable (mg/100mL)	500.00
Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada inyectable (mg/mL)	5.00

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{\text{Volumen final} * \text{Declaración de principio activo}}{\text{volumen inicial}}$$

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{3 \text{ mL} * 5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = 15 \text{ mg} / 3 \text{ mL}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{\text{cantidad de principio activo en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{15 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} * \frac{5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} * 1000 = 30.00 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Concentración del calibrado en } \mu\text{g/mL}}{\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{30.760 \mu\text{g/mL}}{30.00 \mu\text{g/mL}} * 100 = 102.532\%$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 102.532 % el cual está dentro de los valores orientativos para formulado farmacéutico del 90.0 % - 110.0 % según la USP 34

6.1.5.2.2 Exactitud del método de metronidazol 500 mg/100 mL inyectable en CLAR

TABLA N° 6.1.5.2.2.1

Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg/100 mL inyectable

Pendiente 30.7453 de la curva de calibración								
Declara p.a en Fco./mg	Cantidad medida mL de principio activo	Conc. µg/mL a inyectar	Cantidad medida de principio activo mg	ÁREA	Conc. calibrado µg/mL	mg encontrado en la muestra de principio activo	Media mg encontrado de principio activo	Recuperación %
500	3.000	30.961	15.000	944.900	30.733	15.367	15.365	102.444
500	3.000	30.961	15.000	944.700	30.727	15.363		102.422
500	3.000	30.961	15.000	944.900	30.733	15.367		102.444
500	3.000	30.961	15.000	942.300	30.649	15.324	15.352	102.162
500	3.000	30.961	15.000	947.600	30.821	15.410		102.737
500	3.000	30.961	15.000	942.200	30.645	15.323		102.151
500	3.000	30.961	15.000	944.000	30.704	15.352	15.421	102.346
500	3.000	30.961	15.000	950.200	30.906	15.453		103.018
500	3.000	30.961	15.000	950.600	30.919	15.459		103.062
$\bar{x} = 500$	3.000	30.961	15.000	945.711	30.760	15.380	15.380	102.532

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



TABLA N° 6.1.5.2.2.1.1

Test G de Cochran en CLAR

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg /100 mL inyectables

N° Lectura	Conc. (µg/mL)	% Recuperación	Promedio % Recuperación	Desviación (s) % Recuperación	Varianza (s ²) % Recuperación
1	30.000	102.444	102.437	0.013	0.0002
2		102.422			
3		102.444			
4	30.000	102.162	102.350	0.335	0.1122
5		102.737			
6		102.151			
7	30.000	102.346	102.809	0.401	0.1610
8		103.018			
9		103.062			
Promedio \bar{x}		102.532	$\Sigma s_i^2 = 0.2733$		
Desviación Estándar (s)		0.336			
C.V _f %		0.328			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad

Test de Cochran

Dónde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\Sigma s_i^2} \qquad G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\Sigma s_i^2} = \frac{0.1610}{0.2733} = \mathbf{0.589}$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05 \%$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966. Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.589 < 0.966$.



6.2 Técnica de Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis)

En la evaluación de las características del desempeño analítico en espectrofotometría UV-Vis, se utilizaron las mismas muestras y soluciones de trabajo anteriormente preparadas en el análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), incisos 5.2.2, 5.2.3.1, 5.2.3.2 y 5.2.3.3 para determinar si hay variabilidad en los resultados en ambas técnicas.

6.2.1 Especificidad del método (UV VIS)

Se verificó la especificidad del método analítico observando la capacidad de éste, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias químicas diferentes que pueden estar presentes en una misma muestra.

Los espectros obtenidos están reflejados en el Anexo N° 13, indicando los resultados del análisis de la muestra placebo, la solución del estándar referencia y la muestra del producto terminado, mostrando que los excipientes no interfieren en la determinación del principio activo; con estos resultados se evidencia la especificidad del método para el control de la calidad al no observarse espectros adicionales del placebo a la longitud de onda de 320 nm del principio activo.

6.2.2 Calibrado del sistema por espectrofotometría UV-Vis

Para la realización de los parámetros en la técnica de espectrofotometría UV-Vis, se utilizaron las mismas soluciones de estándar primario de metronidazol base utilizadas anteriormente en la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR según inciso 5.2.2.



TABLA N° 6.2.2.1

Evaluación de la curva de calibración en espectrofotometría UV-Vis.

Espectrofotometría UV-Vis				
N° Muestras	Concentración (µg/mL) Variable x	Media de Conc. µg/mL	Absorbancia Abs. <320nm> Variable y	Media de Abs<320nm>
1	15.460	15.460	0.796	0.797
	15.460		0.799	
	15.460		0.797	
2	24.730	24.730	1.272	1.275
	24.730		1.276	
	24.730		1.277	
3	30.920	30.920	1.546	1.545
	30.920		1.545	
	30.920		1.543	
4	37.100	37.100	1.819	1.821
	37.100		1.820	
	37.100		1.823	
5	49.470	49.470	2.448	2.450
	49.470		2.447	
	49.470		2.456	
Pendiente (b)				0.0481
Intercepto (a)				0.0611
Coeficiente de correlación(r)				0.9995
Coeficiente de determinación (r ²)				0.9990

Fuente: Espectrofotómetro UV-Vis ChemStation Agilent 8453

En la tabla 6.2.2.1 se reflejan los datos proporcionado por el software ChemStation Agilent 8253, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r²).

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} = 0.9995 \quad (\text{Ecuación 5})$$



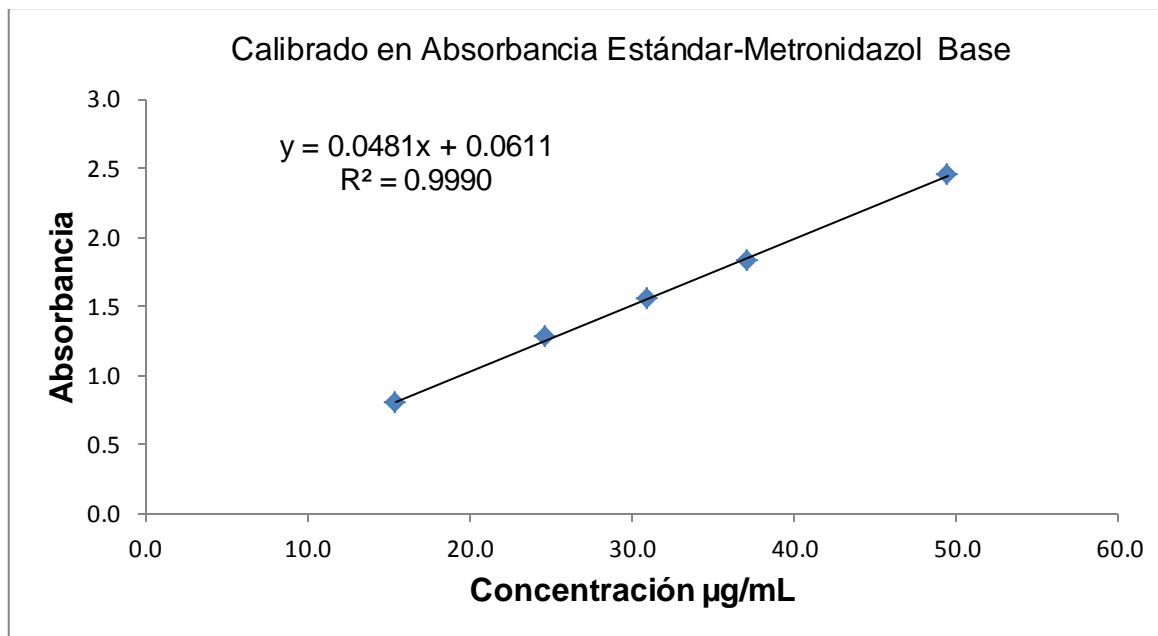
Coefficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = 0.9995^2 = 0.9990$$

(Ecuación 6)

GRÁFICO N°6.2.2.1

Curva de calibración de estándar metronidazol base en UV-Vis.



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según

$$\hat{y} = 0.0481 x + 0.0611 \text{ con } r = 0.9995 \text{ y } r^2 = 0,9990.$$



6.2.3 Linealidad del sistema por espectrofotometría UV VIS.

TABLA N° 6.2.3.1

Evaluación de la linealidad del sistema de metronidazol base en UV/Vis

Espectrofotometría UV –Vis				
N° Muestras	Concentración (µg/mL) Variable x	Media de Conc. µg/mL	Absorbancia Abs. <320nm> Variable y	Media de Abs<320nm>
1	15.460	15.460	0.782	0.773
	15.460		0.771	
	15.460		0.766	
2	24.730	24.730	1.289	1.300
	24.730		1.304	
	24.730		1.305	
3	30.920	30.920	1.539	1.571
	30.920		1.587	
	30.920		1.587	
4	37.100	37.100	1.875	1.879
	37.100		1.879	
	37.100		1.882	
5	49.470	49.470	2.444	2.458
	49.470		2.466	
	49.470		2.465	
Pendiente (b)				0.0491
Intercepto (a)				0.0475
Coeficiente de correlación(r)				0.9991
Coeficiente de determinación (r ²)				0.9981

Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

En la tabla 6.2.3.1 se reflejan los datos proporcionados por el software ChemStationAgilent 8354, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r²) a partir de los mínimos cuadrados.



6.2.3.1 Ecuación de la recta de la linealidad del sistema UV-Vis.

TABLA N°6.2.3.1.1

Análisis de mínimos cuadrados en los datos en espectrofotometría UV-Vis.

CONC µg/mL (x)	Absorbancia (y)	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	\hat{y}	$(\hat{y} - y_i)$ promedio	$(\hat{y} - y_i)^2$ promedio
15.460	0.782	-16.076	258.438	-0.814	0.663	13.092	0,807	0,807	0,651
15.460	0.771	-16.076	258.438	-0.825	0.681	13.266	0,807		
15.460	0.766	-16.076	258.438	-0.830	0.688	13.338	0,807		
24.730	1.289	-6.806	46.322	-0.307	0.094	2.088	1,262	1,262	1,592
24.730	1.304	-6.806	46.322	-0.292	0.085	1.986	1,262		
24.730	1.305	-6.806	46.322	-0.291	0.085	1.980	1,262		
30.920	1.539	-0.616	0.379	-0.057	0.003	0.035	1,566	1,566	2,452
30.920	1.587	-0.616	0.379	-0.009	0.000	0.006	1,566		
30.920	1.587	-0.616	0.379	-0.009	0.000	0.005	1,566		
37.100	1.875	5.564	30.958	0.279	0.078	1.552	1,869	1,869	3,494
37.100	1.879	5.564	30.958	0.283	0.080	1.575	1,869		
37.100	1.882	5.564	30.958	0.286	0.082	1.590	1,869		
49.470	2.444	17.934	321.628	0.848	0.719	15.202	2,477	2,477	6,134
49.470	2.466	17.934	321.628	0.870	0.757	15.604	2,477		
49.470	2.465	17.934	321.628	0.868	0.754	15.575	2,477		
$\Sigma = 473.040$	$\Sigma = 23.9406$		1973.176		4.769	96.893	23,941	7,980	14,323
$\bar{X} = 31.536$	$\bar{y} = 1.5960$						1,596	1,596	2,865

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010.



Conviene definir los valores de S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} para encontrar la pendiente y el intercepto:

1. S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

X_i = pares de datos individuales de x

\bar{X} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 1973.176$$

2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

Y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 4.769$$



3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} = 96.893$$

Para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$b = \frac{96.893}{1973.176} = 0.0491$$

Ecuación del intercepto (a):

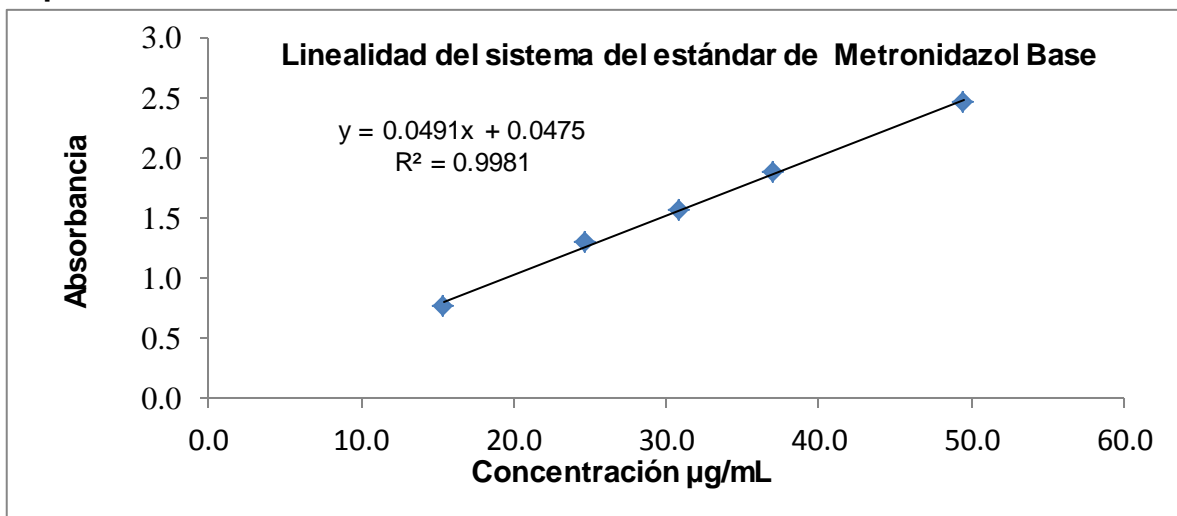
$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$a = 1.596 - (0.0491 * 31.536) = 0.0475$$



GRÁFICO N°6.2.3.1.1

Calibrado de la linealidad del sistema de ER-metronidazol base en espectrofotometría UV-Vis.



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según $y = 0.0491x + 0.0475$ con $r = 0.9991$ y $r^2 = 0,9981$.

6.2.3.2 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en UV-Vis.

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student, para calcular el t_{exp} de dos cola, para $n-2$ grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0,975, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$



Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp(b)} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde:

$|b|$ = valor absoluto de la pendiente

s_b = desviación estándar de la pendiente

Para encontrar el t_{exp} se calculó primero la desviación estándar de la regresión (s_r) para obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{4.769 - (0.0491)^2 * 1973.176}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{4.769 - 3.946}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.823}{13}} = \sqrt{0.063} = 0.251$$

Desviación estándar de la pendiente S_b

$$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$$S_b = \sqrt{(0.251)^2 / 1973.176} = \sqrt{0.063 / 1973.176} = \sqrt{0.000032} = 0.006$$



Se obtiene:

$$t_{\text{exp}(b)} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{0.0491}{0.006} = \mathbf{8.183}$$

Se comprueba estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero, obteniendo el t_{exp} mayor que al t_{tab} , siendo el t_{exp} de $8.183 > t_{\text{tab}} 2.160$, lo que demuestra que existen diferencias significativas.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero.

Intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calculó:

$$b \pm t * S_b = 0.0491 \pm 2.160 * 0.006$$
$$0.0491 \pm 0.01296$$
$$0.03614 \text{ a } 0.06206$$

6.2.3.3 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en UV-Vis.

Cabe mencionar, en el inciso 6.2.3.2 el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}(a)} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$|a|$ = valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto



Para encontrar el t_{exp} para el intercepto es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r), la cual fue calculada en el inciso 6.2.3.2 con la ecuación 14, siendo éste un valor de 0.251 y por ende obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar del intercepto

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$S_a = 0.251 * \sqrt{\frac{1}{15 - 223,766.842 / 16,890.965}}$$

$$S_a = 0.251 * \sqrt{\frac{1}{15 - 13.248}}$$

$$S_a = 0.251 * \sqrt{\frac{1}{1.752}}$$

$$S_a = 0.251 * \sqrt{0.571} = 0.251 * 0.756 = \mathbf{0.1900}$$

$$t_{\text{exp}(a)} = \frac{a}{S_a} = \frac{0.0475}{0.1900} = \mathbf{0.250}$$

Siendo $t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$ se comprueba que la variable X es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas (AEFI, 2001).

Se cumplió que $t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$. El t_{tab} para las condiciones planteadas anteriormente es de 2.160 siendo $t_{\text{exp}(a)} = 0.250 < t_{\text{tab}} = 2.160$



Intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calculó:

$$a \pm t * S_a = 0.0475 \pm 2.160 * 0.190$$

$$0.0475 \pm 0.4104$$

$$-0.36301 \text{ a } 0.45794$$

6.2.3.4 Test G de Cochran

La prueba de Cochran nos indica para determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas.

TABLA N° 6.2.3.4.1

Test G de Cochran varianza de los factores de respuesta en (UV-Vis)

N°	Concentración (µg/mL) Variable x	Abs. (320nm) Variable y	Factor respuesta f(y/x)	Promedio de f(y/x)	Desviación estándar (s) de f(y/x)	Varianza (s ²) de f(y/x)
1	15.46	0.782	0.051	0.050	0.00051	2.587E-07
	15.46	0.771	0.050			
	15.46	0.766	0.050			
2	24.73	1.289	0.052	0.053	0.00036	1.295E-07
	24.73	1.304	0.053			
	24.73	1.305	0.053			
3	30.92	1.539	0.050	0.051	0.00090	8.188E-07
	30.92	1.587	0.051			
	30.92	1.587	0.051			
4	37.10	1.875	0.051	0.051	0.00009	8.517E-09
	37.10	1.879	0.051			
	37.10	1.882	0.051			
5	49.47	2.444	0.049	0.050	0.00025	6.381E-08
	49.47	2.466	0.050			
	49.47	2.465	0.050			
Promedio \bar{x}			0.051	$\Sigma Si^2 = 1.28 \text{ E-}06$		
Desviación Estándar (S)			0.001			

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



Homogeneidad de las varianzas

La homogeneidad de varianza se comprobó aplicando el test de Cochran. Para esta prueba debe de cumplirse que $G_{exp} < G_{tab}$.

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05\%$ a 5 niveles de concentración ($k=5$) y $n-2=3$ grados de libertad, el valor crítico es de 0.683

La hipótesis es:

$$H_0 = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

$$G_{exp} = \frac{8.188 E^{-07}}{1.28 E^{-06}} = 0.640$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $0.640 < 0.683$.

6.2.3.5 Coeficientes de variación de los factores respuestas

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$CV = \frac{0.001}{0.051} * 100 = 1.96$$



Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta (C.V.f) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación CV = 1.96 % < 2% demostrándose la adecuada linealidad del sistema.

6.2.3.6 Análisis de varianza en Espectrofotometría UV-Vis

TABLA N° 6.2.3.6.1

Análisis de varianza en espectrofotometría UV-VIS

N°	Concentración (µg/mL) Variable x	Abs. Variable y	Análisis de residual			Análisis de la regresión	
			\hat{y}	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
1	15,460	0,782	0,807	-0,025	0,001	-0,789	0,623
	15,460	0,771	0,807	-0,036	0,001	-0,789	0,623
	15,460	0,766	0,807	-0,040	0,002	-0,789	0,623
2	24,730	1,289	1,262	0,027	0,001	-0,334	0,112
	24,730	1,304	1,262	0,042	0,002	-0,334	0,112
	24,730	1,305	1,262	0,043	0,002	-0,334	0,112
3	30,920	1,539	1,566	-0,027	0,001	-0,030	0,001
	30,920	1,587	1,566	0,021	0,000	-0,030	0,001
	30,920	1,587	1,566	0,021	0,000	-0,030	0,001
4	37,100	1,875	1,869	0,006	0,000	0,273	0,075
	37,100	1,879	1,869	0,010	0,000	0,273	0,075
	37,100	1,882	1,869	0,013	0,000	0,273	0,075
5	49,470	2,444	2,477	-0,033	0,001	0,881	0,776
	49,470	2,466	2,477	-0,011	0,000	0,881	0,776
	49,470	2,465	2,477	-0,012	0,000	0,881	0,776
	Promedio	1,596	1,596	SCRES = 0.001		SCREG = 0.317	

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a$$

(Ecuación 7)



Según la ecuación reflejada en AEFI (2001), se calculó la varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

$$\text{Varianza Residual} = S^2_{y,x} = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$V_{\text{RES}} = S^2_{y,x} = \frac{0.001}{13} = 0.000077$$

$$V_{\text{RES}} = S^2_{y,x} = \mathbf{0.000077}$$

$$SC_T = SC_{\text{RES}} + SC_{\text{REG}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SC_T = 0.001 + 0.317 = 0.3180$$

$$SC_T = \mathbf{0.3180}$$

Una vez realizada los cálculos de las varianzas y de los residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), el cual es una prueba estadística que sirve para comparar varianzas, donde se cumple el criterio que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$.

$$F = \frac{V_{\text{REG}}}{V_{\text{RES}}} \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde:

SC_{REG} : suma de cuadrados de la regresión.

V_{RES} : 0.000077

V_{REG} : 0.317, para un grado de libertad.

$$F = \frac{V_{\text{REG}}}{V_{\text{RES}}} = \frac{0.317}{0.000077} = \mathbf{4,446.883}$$

Por lo tanto Fisher será: $4,446.883 > F_{\text{tab}}(0.05, 1, n-2) = 4.667$ cumpliendo el criterio de aceptación, demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.



6.2.4. Precisión del sistema en espectrofotometría UV-VIS.

6.2.4.1 Repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-VIS

TABLA N° 6.2.4.1.1

Evaluación de repetibilidad del sistema en UV-VIS

Número de lecturas	Concentración (µg/mL) Variable x	ÁBS. (320nm) Variable y	Factor Respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)	
				Media	Desviación estándar (s)
1	30.920	1.594	0.052	0.051	7.9194E-05
2	30.920	1.593	0.052		
3	30.920	1.590	0.051		
4	30.920	1.588	0.051		
5	30.920	1.591	0.051		
6	30.920	1.591	0.051		
7	30.920	1.589	0.051		
8	30.920	1.594	0.052		
9	30.920	1.588	0.051		
10	30.920	1.594	0.052		
Coeficiente de Variación CV, %			0.155%		
Criterio de aceptación CV (%) ≤ 2%			Conclusión	Cumple	

Fuente: Microsoft Excel 2010

6.2.4.1.1 Evaluación estadística de repetibilidad en espectrofotometría UV-Vis.

Los datos obtenidos se evaluaron con un tratamiento estadísticos con las siguientes especificaciones:

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \tag{Ecuación 23}$$

$$\bar{X} = 0.051$$

➤ **Desviación estándar**

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \tag{Ecuación 24}$$

$$s = 7.9194E^{-05}$$



➤ **Coeficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación (CV), nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media (\bar{x}). Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor de unidad de (Skoog,2003).

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$CV = \frac{7.9194E^{-05}}{0.051} * 100 = \mathbf{0.155\%}$$

Se aprecia en la tabla 6.2.4.1.1, que el CV % está por debajo de 2 % obteniendo un valor de 0.155 %, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la vez aceptable.

6.2.4.2 Precisión intermedia en espectrofotometría UV-VIS.

Precisión intermedia según inciso 6.1.4.2 aplicado para UV/Vis.

Se aplicó el estadístico de t de Student y la prueba de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados analíticos obtenidos por ambos analistas.



TABLA N° 6.2.4.2.1

Evaluación de la precisión intermedia inter día e interanalista en UV/Vis

Conc. µg/ml	ANALISTA: A		ANALISTA: B		Fórmula
	1er Día	2do Día	1er Día	2do Día	
	Factor de Respuesta		Factor de Respuesta		
30.920	0.053	0.051	0.053	0.052	Coefficiente de Variación $CV \% = \frac{S}{\bar{x}} * 100$
30.920	0.053	0.051	0.053	0.052	
30.920	0.053	0.051	0.053	0.052	
30.920	0.053	0.051	0.052	0.052	
30.920	0.053	0.051	0.052	0.052	
30.920	0.053	0.051	0.052	0.052	
30.920	0.052	0.051	0.052	0.052	
30.920	0.052	0.051	0.052	0.053	
30.920	0.052	0.051	0.052	0.053	
Media	0.052	0.051	0.052	0.052	
S	0.0002	0.0002	0.0003	0.0004	
CV (%)	0.385	0.392	0.578	0.770	

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

6.2.4.2.1 Evaluación estadística de precisión intermedia en UV-Vis.

TABLA N° 6.2.4.2.1.1

**Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra en UV-Vis
t estadígrafo Fisher**

Análisis de varianzas,						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Analista 1	2	0.1030	0.0515	5E-07		
Analista 2	2	0.1040	0.0520	0.0E+00		
Día 1	2	0.1040	0.0520	0.0E+00		
Día 2	2	0.1030	0.0515	5E-07		
Origen de las variaciones	∑ SC	Grados de libertad	Promedio ∑ SC	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	2.5E-07	1	2.5E-07	1.000	0.5	161.4476
Días	2.5E-07	1	2.5E-07	1.000	0.5	161.4476
Error	2.5E-07	1	2.5E-07			
Total	7.5E-07	3				

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



Se realizó un análisis de varianza de los datos aplicándose el test Fischer. Los valores obtenidos demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05% ya que el valor de F_{exp} es menor que la F_{tab} . (Inter analista F_{exp} 1.000 < F_{tab} 161.4476; inter día F_{exp} 1.000 < F_{tab} 161.4476).

Tabla n° 6.2.4.2.1.2

**Precisión intermedia interdía e interanalista UV-Vis
t estadígrafo Student**

ANALISTA: A		ANALISTA: B		Analistas A vs B		Formulas $t_{calc} = \frac{\bar{X}}{(S\sqrt{n})}$
				1er Día	2do Día	
$t_{cal} =$	2.054	$t_{cal} =$	0.149	0.151	0.360	
$t_{tab} =$	2.306	$t_{tab} =$	2.306	2.306	2.306	
$T_{exp} < t_{tab}$ No existe diferencia significativas por lo cual es aceptable						

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Al realizar las prueba de Student para ambos analistas, el valor experimental resultó ser menor que el tabulado, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un 5%.

6.2.5 Exactitud del sistema por espectrofotometría Uv/Vis

Se evaluó la exactitud a 3 concentraciones de trabajo de 15.46, 30.92 y 49.470 (µg/mL), con soluciones de estándar primario de metronidazol base, realizándose por triplicado cada punto de análisis obteniendo los siguientes resultados.



TABLA N° 6.2.5.1

Evaluación de la exactitud del sistema en UV/Vis

N° lectura	Conc. (µg/mL) Variable x	Abs. (320nm) Variable y	Factor de repuesta F=Y/X	Promedio de F(Y/X)	Desviación estándar (s) de F(Y/X)	Varianza (s ²) de F(Y/X)
1	15.460	0.765	0.050	0.050	1.47E-04	2.15E-08
2		0.770	0.050			
3		0.767	0.050			
4	30.920	1.587	0.051	0.051	1.08E-04	1.16E-08
5		1.593	0.052			
6		1.588	0.051			
7	49.470	2.454	0.050	0.050	4.27E-04	1.82E-07
8		2.478	0.050			
9		2.436	0.049			
Promedio \bar{x}			0.050	$\Sigma S_i^2 = 2.16E-07$		
Desviación Estándar S			0.0009			
C.V. _i %			1.814 %			

Fuente: Programa Microsoft Excel 201

6.2.5.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en UV-Vis.

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = 0.050$$

➤ **Desviación estándar (s)**

$$S = \sqrt{\sum_i (x_i - \frac{x}{n-1})^2} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - x)^2 / (n - 1)} = 0.0009$$



Test de proporcionalidad: G de Cochran

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

$$G_{exp} = \frac{1.82 E^{-07}}{2.16 E^{-07}} = 0.843$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha=0.05\%$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966.

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple con el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.843 < 0.966$.

6.2.5.2 Exactitud del método en UV-Vis.

Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de metronidazol base tableta.

En el inciso 5.2.3.1 se indica cómo se prepararon las muestras para determinar el porcentaje de recuperación en tabletas.

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada tableta (mg)	500.00
Peso promedio de las 10 tabletas (mg)	680.33
Cantidad pesada del polvo homogéneo (resultado de 10 tabletas) (mg)	17.533



$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{\text{Cantidad pesada} * \text{Declaración de p.a en la tableta}}{\text{Peso promedio de la tableta}}$$

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{17.553 \text{ mg} * 500 \text{ mg}}{680.330} = 12.900 \text{ mg}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{\text{cantidad de p.a en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{12.900 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} * \frac{3 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} * 1000 = 30.96 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Concentración encontrada con el calibrado } \mu\text{g/mL}}{\text{Concentración a } \mu\text{g/mL inyectar}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{32.026 \mu\text{g/mL}}{30.961 \mu\text{g/mL}} * 100 = 103.441 \%$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 103.441 % el cual está dentro de los valores orientativos para formulado farmacéutico del 90.0 % - 110.0 % según la USP 34.



6.2.5.2.1 Exactitud del método metronidazol 500 mg tableta por UV-VIS

TABLA N° 6.2.5.2.1.1

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta

Pendiente 0.0481 de la curva de calibración								
Declara p.a en Tab/mg	Cantidad pesada mg de polvo	Cantidad pesada de p.a mg	Conc. µg/mL a inyectar	Abs. <320 nm>	Conc. calibrado µg/mL	mg de p.a encontrado en la muestra	Media mg/Tab encontrado de p.a	Recuperación %
500	17.553	12.900	30.961	1.522	31.649	13.187	13.214	102.221
500	17.553	12.900	30.961	1.528	31.763	13.235		102.591
500	17.553	12.900	30.961	1.526	31.728	13.220		102.477
500	17.553	12.900	30.961	1.546	32.141	13.392	13.392	103.813
500	17.553	12.900	30.961	1.547	32.168	13.403		103.900
500	17.553	12.900	30.961	1.545	32.112	13.380		103.719
500	17.553	12.900	30.961	1.554	32.308	13.462	13.427	104.350
500	17.553	12.900	30.961	1.548	32.183	13.410		103.947
500	17.553	12.900	30.961	1.548	32.183	13.410		103.947
$\bar{x} = 500$	17.553	12.900	30.961	1.540	32.026	13.344	13.344	103.441

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



TABLA N°.6.2.5.2.1.1.1

Test de Cochran por UV-Vis

Porcentaje recuperación de metronidazol 500 mg tableta

N° Lectura	Conc. (µg/mL)	% RECUPERACION	Promedio % Recuperación	Desviación (s) % Recuperación	Varianza (s ²) % Recuperación
1	30.961	102.221	102.4297	0.1891	0.0358
2		102.591			
3		102.477			
4	30.961	103.813	103.8107	0.0907	0.0082
5		103.900			
6		103.719			
7	30.961	104.350	104.0815	0.2326	0.0541
8		103.947			
9		103.947			
Promedio \bar{x}		103.441	$\sum s_i^2 = 0.0981$		
Desviación Estándar (s)		0.783			
C.V. _f %		0.757			

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad

Test de Cochran

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2} \qquad G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2} = \frac{0.0541}{0.0981} = \mathbf{0.551}$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.551 < 0.966$.



Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de metronidazol base inyectable.

En el inciso 5.2.3.2 se indica cómo se prepararon las muestras para determinar el porcentaje de recuperación en inyectables.

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada inyectable (mg/100mL)	500.00
Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada inyectable (mg/mL)	5.00

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{\text{Volumen final} * \text{Declaración de principio activo}}{\text{volumen inicial}}$$

$$\text{Cantidad de p.a en la muestra} = \frac{3 \text{ mL} * 5 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = 15 \text{ mg}/3 \text{ mL}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{\text{cantidad de principio activo en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{15 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} * \frac{5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} * 1000 = 30.00 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Concentración del calibrado en } \mu\text{g/mL}}{\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{31.735 \mu\text{g/mL}}{30.00 \mu\text{g/mL}} * 100 = 105.783\%$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 105.783 % el cual está dentro de los valores orientativos para formulado farmacéutico del 90.0 % - 110.0 % según la USP 34.



6.2.5.2.2 Exactitud del método de metronidazol 500 mg/ 100 mL inyectable por UV-Vis.

TABLA N°6.2.5.2.1

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg/ 100 mL inyectable

Pendiente 0.0481 curva de calibración								
Declara p.a en Fco./mg	Cantidad medida mL de p.a	Cantidad medida de p.a mg	Conc. µg/mL a inyectar	Abs. <320nm>	Conc. calibrado µg/mL	mg encontrado en la muestra de p.a	Media mg encontrado de p.a	Recuperación %
500	3.000	15.000	30.000	1.512	31.435	15.717	15.715	104.782
500	3.000	15.000	30.000	1.513	31.451	15.726		104.837
500	3.000	15.000	30.000	1.511	31.403	15.702		104.678
500	3.000	15.000	30.000	1.533	31.867	15.933	15.951	106.223
500	3.000	15.000	30.000	1.534	31.884	15.942		106.279
500	3.000	15.000	30.000	1.537	31.956	15.978		106.521
500	3.000	15.000	30.000	1.533	31.879	15.940	15.937	106.265
500	3.000	15.000	30.000	1.534	31.892	15.946		106.306
500	3.000	15.000	30.000	1.532	31.850	15.925		106.168
$\bar{x} = 500$	3.000	15.000	30.000	1.526	31.735	15.868	15.868	105.783

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



TABLA N° 6.2.5.2.2.1.1

Test de Cochran por UV-Vis

Porcentaje de recuperación metronidazol 500 mg /100 ml inyectables

N° Lectura	Conc. (µg/mL)	% RECUPERACION	Promedio % Recuperación	Desviación (s) % Recuperación	Varianza (s ²) % Recuperación
1	30.000	104.782	104.766	0.081	0.0065
2		104.837			
3		104.678			
4	30.000	106.223	106.341	0.158	0.0251
5		106.279			
6		106.521			
7	30.000	106.265	106.246	0.071	0.0051
8		106.306			
9		106.168			
Promedio \bar{x}		105.784	$\sum s_i^2 = 0.0367$		
Desviación Estándar (s)		0.771			
C.V _f %		0.729			

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad

Test de Cochran

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2}$$

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2} = \frac{0.0251}{0.0367} = \mathbf{0.684}$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x)

$G_{exp} 0.684 < 0.966$.



6.3 Consolidado de las técnicas en CLAR y espectrofotometría UV-VIS.

Comparación estadística

Con el objetivo de realizar una comparación estadística entre los resultados CLAR y los obtenidos por la técnica analítica alternativa desarrollada por espectrofotometría UV- Vis. La evaluación estadística se realizó mediante pruebas de significación como el t-Student para determinar si existen diferencias significativas entre las medias y el test de Fisher para determinar si sus varianzas difieren significativamente.

6.3.1 Evaluación de la linealidad del sistema en las técnicas de CLAR y UV-Vis.

TABLA N° 6.3.1.1

Estudio de linealidad del sistema en CLAR Y UV-Vis

Parámetros	CLAR	UV/Vis	Criterio de Aceptación	Conclusión
Ecuación de la recta $y = b + a * x$	$y = 30.736 x - 2.896$	$y = 0.0491 x + 0.0475$	$y = a x + b$	Cumple
Coefficiente de correlación (r)	$r = 0.9995$	$r = 0.9991$	$r \geq 0.9900$	Cumple
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 = 0.9990$	$r^2 = 0.9981$	$r^2 \geq 0.9980$	Cumple
Prueba de linealidad				
Coefficientes de variación $C.V_f$	$C.V_f = 1.896\%$	$C.V_f = 1.97\%$	$C.V_f \leq 2\%$	Cumple
Test de Cochran $G_{tab} = 0.683$	$G_{exp} = 0.395$	$G_{exp} = 0.640$	$G_{exp} < G_{tab}$	Cumple
Prueba de Proporcionalidad				
t_{exp} pendiente (b) $t_{tab} = 2.160$	$t_{exp b} = 116.456$	$t_{exp b} = 8.183$	$t_{exp b} > t_{tab}$	Cumple
t_{exp} intercepto (a) $t_{tab} = 2.160$	$t_{exp a} = -0.327$	$t_{exp a} = 0.250$	$t_{exp a} < t_{tab}$	Cumple
Intervalos de confianza	0.764	4.323E-05		

Fuente: programa Microsoft Excel 2010



Discusión de resultados:

Para todos los parámetros estadísticos para el estudio de la linealidad (intercepto, pendiente y coeficiente de correlación), se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

Se reportan los resultados de los estudios de linealidad del sistema para ambas técnicas cromatográfico y espectrofotométrico, el coeficiente de regresión lineal fue de 0.9995 y 0.9991, respectivamente, y los coeficientes de variación del factor de respuesta resultaron similares a 1.896% y 1.97 % respectivamente.

La evaluación de los coeficientes de correlación r y de determinación r^2 demostraron correlación entre la concentración ($\mu\text{g/mL}$) y la respuesta (área y absorbancias) para ambas técnicas, obteniendo valores superiores a lo establecido, los cuales éstos valores están reflejados en las tablas 6.3.1.1.

En la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta CV_f , se obtuvo un coeficiente de variación \leq del 2 %, lo que demuestra la adecuada linealidad de acuerdo con el límite establecido, por lo que se establece el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentración estudiado para ambas técnicas validadas (AEFI, 2001).

Se obtuvo la curva de calibración ajustada por mínimos cuadrados y estadísticamente fueron evaluados, resultando ser lineal. Al aplicar la prueba de la pendiente, este resultó ser no significativo ya que la t_{cal} fue mayor que la t_{tab} y para la prueba del intercepto, este resultó ser no significativo ya que la t_{calc} fue menor que la t_{tab} .



TABLA N° 6.3.1.2
Test Student para la pendiente en CLAR y UV-Vis

Parámetros	CLAR	UV/Vis	Criterio de Aceptación	Conclusión
Pendiente b	30.736	0.049	$b \neq 0$	Cumple
S_b	0.264	0.006	$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	
t_{tab}	2.160	2.160	$t_{exp} > t_{tab}$	Cumple
$t_{exp b}$	116.456	8.183		
Límites de confianza			Los límites superiores e inferiores deben incluir el cero	Existe linealidad
t^*S_b	± 0.570	± 0.01296		
Límite Superior	31.306	0.06206		
Límite Inferior	30.166	0.03614		

Fuente: programa Microsoft Excel 2010

Discusión de resultados:

Al aplicar la prueba de la pendiente para ambas técnicas, resultaron ser no significativos ya que la $t_{cal} > t_{tab}$, por lo que se acepta la hipótesis nula de que la pendiente es diferente a cero.



TABLA N° 6.3.1.3
Test Student para el intercepto en CLAR y UV-Vis

Parámetros	CLAR	UV/Vis	Criterio de Aceptación	Conclusión
Intercepto a	-2.896	0.0475	$b \neq 0$	Cumple
S_a	8.857	0.190	$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	
t_{tab}	2.160	2.160	$t_{exp} < t_{tab}$	Cumple
$t_{exp a}$	-0.327	0.250		
Límites de confianza			Los límites superiores e inferiores deben incluir el cero	Existe linealidad
t^*S_s	± 19.131	± 0.4104		
Límite Superior	16.235	0.45794		
Límite Inferior	-22.027	-0.36301		

Fuente: programa Microsoft Excel 2010

Discusión de resultados:

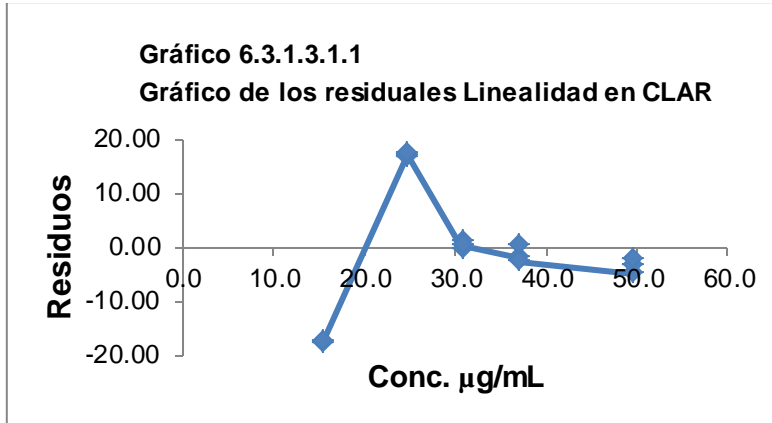
Al aplicar la prueba del intercepto a cada uno de los técnicas, ambos resultaron ser no significativos ya que la t_{cal} fue menor que la t_{tab} , por lo que se acepta la hipótesis nula de que el intercepto es diferente a cero, para ambas técnicas.



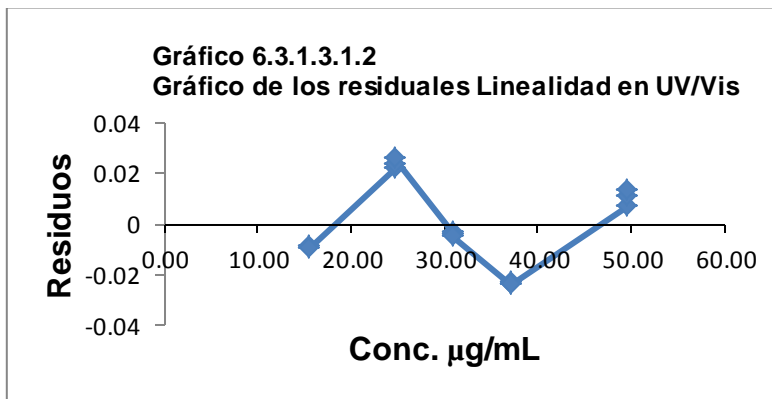
6.3.1.3.1 Gráficos de Residuales

COMPARACIÓN DE GRAFICAS DE LOS RESIDUALES

Discusión



Observando los residuales se aprecia que para CLAR y UV-Vis el modelo se ajusta bien a los datos. Los residuos se distribuyen aleatoriamente.





6.3.2 Evaluación de la precisión del sistema en CLAR y UV-Vis.

6.3.2.1 Repetibilidad del sistema en CLAR y UV-VIS

TABLA N° 6.3.2.1.1

Repetibilidad del sistema en CLAR Y UV-Vis.

Conc. (µg/mL) Variable X	Técnica CLAR			Técnica UV-VIS		
	Factor Respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)		Factor respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)	
		Media	s		Media	s
30.920	30.589	30.585	0.018	0.052	0.051	7.9194 E-05
30.920	30.618			0.052		
30.920	30.563			0.051		
30.920	30.585			0.051		
30.920	30.553			0.051		
30.920	30.582			0.051		
30.920	30.595			0.051		
30.920	30.592			0.052		
30.920	30.576			0.051		
Coeficiente de Variación CV, %				0.059 %		
Criterio de aceptación		CV ≤ 2 %.Cumple		CV ≤ 3 %.Cumple		
Límite de detección µg/mL		0.002 µg/mL		0.005 µg/mL		
Límite de cuantificación µg/mL		0.006		0.016		

Fuente: programa Microsoft Excel 2010

Discusión de resultados:

En los estudios de repetibilidad realizados, para las técnicas cromatográfico y espectrofotométrico, los coeficientes de variación fueron 0.059% y 0.155%, respectivamente, lo que nos demuestra la buena precisión de las técnicas.



6.3.2.2 Precisión intermedia del sistema en CLAR y UV-Vis.

TABLA N° 6.3.2.2.1

Estudio de la precisión intermedia en CLAR y UV-Vis.(inter analista e inter día

Técnica	Analista	Factor de respuesta	
		Día 1	Día 2
CLAR	Analista A	$\bar{X} = 31.460$ $s = 0.541$ $CV\% = 1.719$	$\bar{X} = 31.607$ $s = 0.121$ $CV\% = 0.382$
	Analista B	$\bar{X} = 31.458$ $s = 0.029$ $CV\% = 0.093$	$\bar{X} = 31.430$ $s = 0.201$ $CV\% = 0.640$
UV-Vis	Analista A	$\bar{X} = 0.052$ $s = 0.0002$ $CV\% = 0.385$	$\bar{X} = 0.051$ $s = 0.002$ $CV\% = 0.392$
	Analista B	$\bar{X} = 0.052$ $s = 0.0003$ $CV\% = 0.578$	$\bar{X} = 0.052$ $s = 0.004$ $CV\% = 0.770$
Criterio de aceptación: coeficiente de variación $CV_{global} \leq 2\%$		0.620 %	

Fuente: programa Microsoft Excel 2010

Discusión de resultados:

En la evaluación de la precisión intermedia se calculó las medias, las desviaciones estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta, realizados en ambas técnicas (CLAR y UV-Vis). Los valores obtenidos descritos anteriormente en la tabla 6.3.2.2.1, se obtuvieron coeficientes de variación independientes para cada técnicas \leq al 2%.para CLAR \leq 3% para UV-Vis, obteniendo un CV. global \leq 2%indicando precisión en ambas técnicas.



TABLA N° 6.3.2.2.2

**Prueba Fisher de la precisión intermedia en CLAR y UV-Vis.
(inter analista e inter día)**

Origen de las variaciones	CLAR	UV-VIS
	F _{exp}	F _{exp}
Analista	1.0544	1.0000
Días	0.4610	1.0000
Criterio de aceptación ($\alpha = 0.05 \%$)	F _{exp} < F _{tab}	F _{tab} = 161.4476

Fuente: programa Microsoft Excel 2010

Discusión de resultados:

Los valores obtenidos para los estudios de la precisión intermedia demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05% ya que el valor de F_{exp} es menor que la F_{tab}.

6.3.2.3 Exactitud del sistema CLAR vs UV-Vis

TABLA N°6.3.2.3.1

Evaluación de la exactitud del sistema en CLAR y UV-Vis

N° Muestras	Conc.(µg/mL)	Factor de repuesta F(y/x)	Factor de repuesta F(y/x)
		CLAR	UV/Vis
1	15.460	31.119	0.050
	15.460	31.164	0.050
	15.460	31.210	0.050
2	30.920	32.371	0.051
	30.920	32.342	0.052
	30.920	32.371	0.051
3	49.470	31.005	0.050
	49.470	31.009	0.050
	49.470	31.009	0.049
Promedio		31.511	0.050
Desviación estándar (s)		0.642	0.0009
CV _f < 2 %		2.036	1.814 %
Test de proporcionalidad			
Test Cochran: G _{exp} ≤ G _{tab} 0.966		0.870	0.843



Discusión:

Los resultados reflejados en la tabla 6.3.2.3.1 indican que hay una buena exactitud del sistema en ambas técnicas, se obtuvieron desviaciones estándares aceptables, y coeficientes de variación ≤ 2 y 3% para cada uno de los niveles de concentración estudiadas.

Al aplicar la prueba de significación para conocer la influencia de la concentración sobre la variabilidad de los resultados (G de Cochran), se obtuvieron G_{exp} menores G_{tab} ; por tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes e indicando que la concentración no influye en la variabilidad de estos.

6.3.2.4 Exactitud del método por CLAR y UV-Vis.

TABLA N° 6.3.2.4.1

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg tableta

N° Muestras	Conc.($\mu\text{g/mL}$) Variable x	CLAR	UV-Vis
		% Recuperación	% Recuperación
1	30.961	104.128	102.221
	30.961	104.160	102.591
	30.961	104.044	102.477
2	30.961	104.349	103.813
	30.961	104.391	103.900
	30.961	104.381	103.719
3	30.961	104.580	104.350
	30.961	104.549	103.947
	30.961	104.580	103.947
Promedio		104.351	103.441
Desviación estándar (s)		0.202	0.783
CV < 2 %		0.194	0.757
Test de proporcionalidad			
Test Cochran: $G_{exp} \leq G_{tab}$ 0.966		0.818	0.551
Test Student $t_{exp} < t_{tab}$		0.00185 < 2.751	
Test de Fisher $F_{exp} < F_{tab}$		0.06667 < 2.589	

Fuente: programa Microsoft Excel 2010.



Discusión:

Los resultados reflejados en la tabla 6.3.2.4.1 indican una buena exactitud del método en ambas técnicas, se utilizó el método de recuperación, obteniéndose valores en porcentajes de recuperación dentro de los límites establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos USP 34-NF29 (90.0 % a 110.0 %). Los valores del coeficiente de variación en las dos técnicas resultaron ser menor que el 2% a la vez siendo aceptables.

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud se aplicó el test G de Cochran, obteniéndose G_{exp} menores G_{tab} (para $n-1= 2$ grado de libertad y $P = 0.05$, nivel de confianza, $G_{tab} = 0.966$); por tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes indicándose que la concentración no influye en la variabilidad de estos (AEFI, 2001).

No existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % de recuperación al aplicar el test de Student para medias de dos muestras emparejadas, entre ambas técnicas; (para un test de dos colas $n-2 = 7$ grado de libertad y α de 0,05 %). Se obtuvieron t_{exp} menores t_{tab} demostrando la exactitud del método.

También se aplicó el test de Fisher para varianzas de dos muestras, indicando que no existen diferencias significativas entre las varianzas alcanzadas por ambas técnicas, (para un test de dos colas $n-2= 7$ grado de libertad y $\alpha= 0.05$ %, $F_{tab} = 2.589$); el valor calculado resultó ser menor que el tabulado.



TABLA N° 6.3.2.4.2

Porcentaje de recuperación de metronidazol 500 mg /100 mL inyectables

N° Muestras	Conc.(µg/mL) Variable x	CLAR	UV-Vis
		% Recuperación	% Recuperación
1	30.000	102.444	104.782
	30.000	102.422	104.837
	30.000	102.444	104.678
2	30.000	102.162	106.223
	30.000	102.737	106.279
	30.000	102.151	106.521
3	30.000	102.346	106.265
	30.000	103.018	106.306
	30.000	103.062	106.168
Promedio		102.532	105.784
Desviación estándar (s)		0.336	0.771
CV%		0.328	0.729
Test de proporcionalidad			
Test Cochran: $G_{exp} \leq G_{tab}$ 0.966		0.589	0.684
Test Student. $T_{exp} < T_{tab}$		0.0000017 < 2.751	
Test de Fischer $F_{exp} < F_{tab}$		0.18993 < 2.589	
No existe diferencia significativa entre ambas técnicas			

Fuente: programa Microsoft Excel 2010.

Discusión:

Los resultados reflejados en la tabla 6.3.2.4.2 indican una buena exactitud del método en ambas técnicas, utilizando el método de recuperación, obteniéndose valores en porcentaje de recuperación dentro de los límites establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos USP 34-NF29 (90.0 % a 110.0 %). Los valores del coeficiente de variación para las técnicas resultaron ser menor que el 2%.

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud se aplicó el test G de Cochran, obteniéndose G_{exp} menores G_{tab} (para $n-1= 2$ grado de libertad y $P=0.05$, $G_{tab}=0.966$); por tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes indicándose que la concentración no influye en la variabilidad de estos (AEFI, 2001).



No existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % de recuperación al aplicar el test de Student para medias de dos muestras emparejadas, entre ambas técnicas (para un test de dos colas $n-2 = 7$ grado de libertad y una probabilidad de 0,05 %, obteniéndose t_{exp} menores al t_{tab} demostrando la exactitud del método.

Se aplicó el test de Fisher para varianzas de dos muestras, demostrándose que no existen diferencias significativas entre las varianzas alcanzadas por ambas técnicas, (para un test de dos colas $n-2= 7$ grado de libertad y una probabilidad de 0,05, $F_{tab}=2.589$); se obtuvieron F_{exp} menores F_{tab} .

TABLA N° 6.3.2.4.3

Porcentaje de recuperación para la cuantificación de metronidazol base

PARAMETROS ESTADÍSTICOS	Tableta		Inyectable	
	% DE RECUPERACION		% DE RECUPERACION	
	CLAR	UV	CLAR	UV
	104.128	102.221	102.444	104.782
	104.160	102.591	102.422	104.837
	104.044	102.477	102.444	104.678
	104.349	103.813	102.162	106.223
	104.391	103.900	102.737	106.279
	104.381	103.719	102.151	106.521
	104.580	104.350	102.346	106.265
	104.549	103.947	103.018	106.306
	104.580	103.947	103.062	106.168
Promedio $\bar{x} =$	104.351	103.441	102.532	105.783
Desviación estándar (s)=	0.202	0.783	0.336	0.771
CV(%)=	0.194	0.757	0.328	0.729
Test de proporcionalidad				
Test Cochran: $G_{exp} \leq G_{tab} 0.966$	0.818	0.551	0.589	0.684
Test Student. $t_{exp} < t_{tab} 2.751$	0.00185 < 2.751		0.0000017 < 2.751	
Test de Fischer $F_{exp} < F_{tab} 2.589$	0.06667 < 2.589		0.18993 < 2.589	

Fuente: programa Microsoft Excel 2010.



Discusión:

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos de los métodos analíticos por CLAR y Espectrofotometría UV/Vis, para la cuantificación de las tabletas 500 mg e inyectables 500 mg/mL de metronidazol base, se pudo comprobar a través del t calculada que no existen diferencias significativas entre los resultados, cumpliendo el criterio de la hipótesis: $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$.



Resumen de resultados

RESUMEN DE RESULTADOS DE LA VALIDACION EN CLAR Vs. UV-Vis			
Principio Activo: Metronidazol Base	Tipo de validación	Resultados	
Ensayos	Prospectiva	Técnicas	
	Especificaciones	HPLC	UV-Vis
1. Especificidad	No debe presentar interferencias de excipientes	Cumple	Cumple
- Interferencia de excipientes			
2. Linealidad de Sistema			
- Coeficientes de correlación r. - Coeficiente de determinación r^2 . - Coeficiente de variación C.V. _f - prueba de linealidad para la pendiente (b) P=0.05, y n-2 grados de libertad. - prueba de proporcionalidad para el intercepto (a) P=0.05, y n-2 grados de libertad.	$r \geq 0.9900$ $r^2 \geq 0.9980$ C.V. _f $\leq 2\%$ $t_{exp} > t_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$	Cumple	Cumple
3. Precisión del sistema			
- Coeficiente de variación C.V. _f • Repetibilidad del sistema - Coeficiente de variación C.V. _f - Test G de Cochran • Precisión Intermedia - Coeficiente de variación C.V. _f - Test G de Cochran - Test de Fisher - Test de Student	C.V. _f $\leq 2\%$ C.V. _f $\leq 2\%$ $G_{exp} \leq G_{tab}$ C.V. _f $\leq 2\%$ $G_{exp} \leq G_{tab}$ $F_{exp} \leq F_{tab}$ $t_{exp} \leq t_{tab}$	Cumple	Cumple
4. Exactitud			
- % Recuperación - Test G de Cochran - Test de Recuperación media y el 100% P=0.05, y n-1 grados de libertad. - Test de fisher P=0.05, y n-1 grados de libertad	90.0 % - 110.0 % $G_{exp} \leq G_{tab}$ $t_{exp} \leq t_{tab}$ $F_{exp} \leq F_{tab}$	Cumple	Cumple

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



7. CONCLUSIONES

Se ha mostrado la validez de la metodología para ambas técnicas, verificándose los parámetros de aceptabilidad planteados por la USP 34 – NF 29, obteniéndose resultados que corresponde a los objetivos planteados inicialmente.

1. Las técnicas analíticas validadas para la cuantificación del metronidazol base demostraron ser lineales, precisos, exactos y específicos en el rango de concentraciones estudiado, no existe diferencias significativas entre los resultados, ni por su varianza (*test* de Fisher) ni por la diferencia de medias (*test* de Student) y (*test* G de Cochran) indicando que la concentración no influye en la variabilidad de estos.

2. En los estudios de exactitud realizados para ambas técnicas analíticas demostraron ser exactos:

- a. Los valores de porcentaje de recobro estuvieron dentro de los límites establecidos 90.0% a 110.0 %, para las técnicas espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de líquidos de alta resolución.
- b. Los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron menores que el 2 %.
- c. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar Test G de Cochran, las concentraciones empleadas son equivalentes, lo que indica que la concentración no influye en la variabilidad de estos.
- d. No existieron diferencias significativas entre las recuperaciones medias y el 100 % de recuperación al aplicar la prueba de la t de Student, ya que la t_{exp} fue menor que la t_{tab} , el test Fisher F_{exp} fue menor F_{tab} demostrando que las técnicas son exactas.



3. Como se puede apreciar en los anexos 1 y 13 de las técnicas reportadas por CLAR y UV/Vis resultaron específicos al no detectarse interferencias de picos y adicionales en la zona de elusión del producto principal y en los espectros en la zona de corrida de la misma.

Al analizar muestras del placebo, la sustancia de referencia de Metronidazol y el producto terminado, indican que los excipientes no interfieren en la determinación del principio activo, lo que demuestra la especificidad de las técnicas para el control de la calidad al no observarse absorbancia del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo.

4. Al comparar las técnicas analíticas validadas para el control de calidad de metronidazol tableta e inyectable, se concluyó que son adecuados para estos fines y resultaron ser lineales, precisos, exactos y específicos en el rango de concentraciones estudiado.

La técnica por espectrometría ultravioleta puede emplearse en la cuantificación del producto terminado al igual que el método cromatográfico; resultó de elección por su sencillez y rapidez el espectrofotométrico y el método por cromatografía líquida de alta resolución para realizar los futuros estudios de estabilidad del producto por su elevada especificidad.



8. RECOMENDACIONES

Continuar con la investigación de Metronidazol tabletas de 500 mg e inyectable 500 mg/mL, evaluando el resto de los parámetros de desempeño para llevar a cabo una validación completa del método analítico así como someter las muestras a estrés, la estabilidad de los mismos, disolución en las tabletas.

Enviar una copia de la tesis a la jefatura del Laboratorio Nacional de Control de Calidad del Ministerio de Salud y a la jefatura del departamento de la dirección General de servicio de salud, para brindar información accesible de consultas sobre el tema.

Validar los métodos espectrofométrico para otros compuestos que contengan metronidazol base aplicándose a diferentes concentraciones, como parte de investigaciones posteriores que el incrementen el desarrollo experimental y minimice variaciones que existan. Presentado los resultados y conclusiones en congresos y/o seminarios dirigidos a la industria farmacéutica a igual a los que prescriben estos fármacos.

Se recomienda al Laboratorio donde se llevó a cabo esta investigación, evaluar el resto de los parámetros de desempeño que conforman una validación de método analítico, manteniendo constantes las condiciones de trabajo de temperatura y humedad relativa, y estabilizando como mínimo 40 minutos antes de realizar las lecturas de las muestras.



9. BIBLIOGRAFIA

- 1 AEFI. (2001). Validación de Metodos Analíticos. *Asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI 2001)*.
- 2 COMIECO. (2006). *Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39.06. Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos*.
- 3 ICH. (2002). *Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3, informe 36*.
- 4 Inf.32 OMS Anexo 5. (2006). *Validación de procedimientos analíticos empleados en el exámen de los materiales farmacéuticos*.
- 5 Laurent, G. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*.
- 6 Sierra, I. et al. (2010). *Análisis Instrumental*. España: Gesbilbo, S. L.
- 7 Skoog. (2003). Coeficientes de Variación. En W. D. Skoog Douglas, *Fundamentos de Química Análítica* (pág. 12). Barcelona: Reverté S.A.
- 8 Skoog. (2008). Sensibilidad. En D. A. Skoog, F. Crouch, & J. Holler, *Principios de Análisis Instrumental* (pág. 20).



- 9 Skoog. (2009). Métodos de minimos cuadrados. En D. A. Skoog, F. Crouch, & J. Holler, *Principios de analisis instrumental* (pág. 985).
- 10 Trejos, D. E. (2011). Principios básicos de cromatografía. 1-14. Managua: UNAN-Managua.
- 11 Unión Aduanera. (2004). *Guía de validación de métodos analíticos*. Guatemala.
- 12 USP 34 <1225>. (2011). Capítulos generales Validación de procedimientos farmacopeicos. En *Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional USP34 NF-29* (págs. 550-561).
- 13 USP 34 <621>. (2011). Cromatografía. En *Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional USP 34 NF -29* (págs. 268-270).
- 14 USP 34. (2011). Monografía oficial de Metronidazol. (págs. 550-561).
- 15 Valladares, S. (2010). Folleto de Análisis de Droga Espectrofotometria UV-Vis.
- 16 Velásquez et al. (2008). Farmacos antiparasitarios. En *Farmacología Básica y Clínica* (pág. 893). Madrid: Panamericana, Buenos Aires.



Online

- 1 Agilent. (2009-2010). *Catálogo de instrumentos y accesorios de Agilent Technologies*. Obtenido de <http://www.chem.agilent.com/Library/catalogs/Public/5990-3699ES.pdf>
- 2 García, E. (2011). <http://www.tesisdigitales.com>. Recuperado el 04 de 08 de 2013, de Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos: <http://.tesisdigitales.com>



GLOSARIO

Adecuabilidad del sistema: Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Analito: componente específico de una muestra, a medir en un análisis

Bacterias anaerobias: son aquellas que para crecer en la superficie de un medio de cultivo necesitan una atmósfera sin oxígeno, ya que este elemento es tóxico para ellas.

Especificaciones: Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Especificidad: capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Límite de cuantificación: Concentración mínima de analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección: Concentración mínima del analítico en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.



Linealidad: 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 analítico en muestra en un intervalo dado.

Método analítico: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.

Muestra: Porción del material a evaluar.

Matriz: Está conformado por el principio activos y los excipientes que dependerá del preparados farmacéuticos.

Microaerófila: microorganismo que para desarrollarse necesita atmósfera con baja tensión de oxígeno.

Parámetros de desempeño analítico; parámetros de mérito o elementos requeridos para el ensayo de validación: Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.

Placebo analítico: Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Precisión: Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.



Precisión Intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Procedimiento analítico: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Validación: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Validación de un procedimientos analítico: Procedimientos para establecer pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



ABREVIATURAS

?: Porcentaje o recobro

\bar{x} : Media aritmética de x

\bar{y} : Media aritmética de y

\hat{y} : y ponderada

a: Intercepto

AOAC: Asociación de Comunidades Analíticas

b: Pendiente

BPM: Buenas práctica de manufactura

CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución

CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución

COMIECO Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica

CV: Coeficiente de variación o desviación estándar relativa

$CV_{y/x}$: Coeficiente de variación de regresión

ER: Estándar de referencia

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

IC: Intervalo de confianza

ICH Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano

IV: Intravenosa

LNCCM: Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MCGV: Válvula de gradiente multicanal.



mg: Miligramos

MINSA: Ministerio de Salud

mL: Mililitro

MTZ: Metronidazol

N: Número de platos teóricos en una columna cromatográfica

nm: Nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

p.a: Principio activo

ppm: parte por millón

r: Coeficiente de correlación

R: Resolución

r^2 : Coeficiente de determinación

RTCA Reglamento técnico centroamericano

s: Desviación estándar

S^2 : Varianza

SC_T : Suma de cuadrados total

SC_{RES} : Suma de cuadrados residual

SC_{REG} : Suma de cuadrados de la regresión

SDR: Desviación estándar relativa

UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

USP: Farmacopea de los Estados Unidos de América

UV/Vis: Ultra violeta visible

UV: Ultra violeta

v/v: Volumen sobre volumen

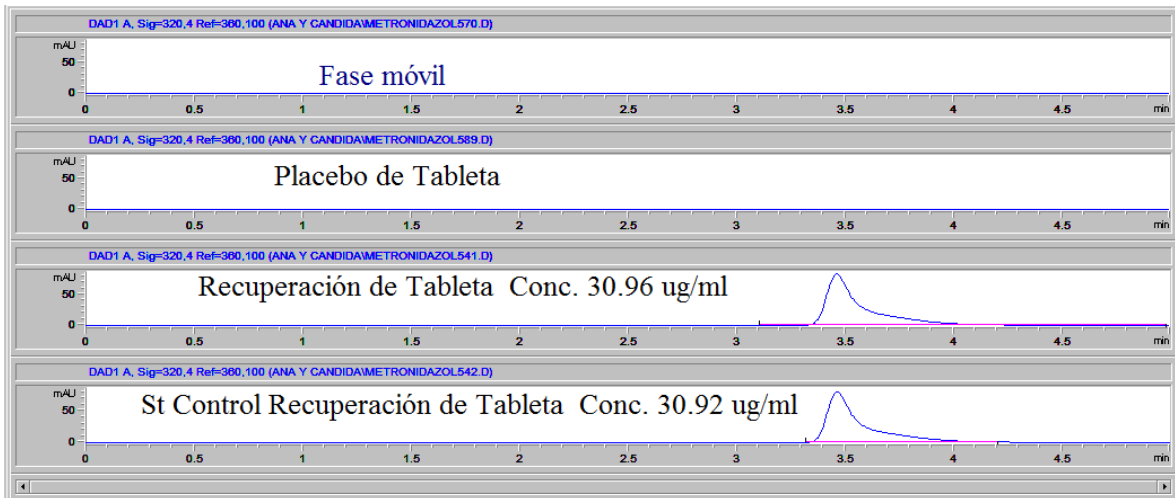


$\mu\text{g/mL}$: microgramo por mililitro

μg : microgramo

1. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO EN CLAR
FIGURA N°1.1

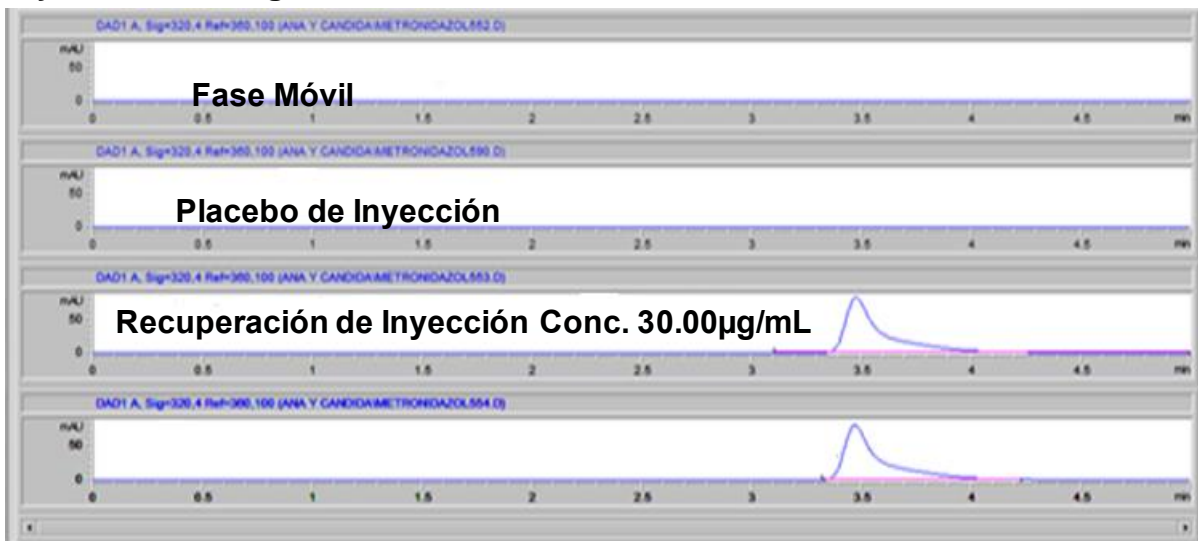
**Especificidad del método para la cuantificación de metronidazol base
Tableta 500 mg.**



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

FIGURA N°1.2

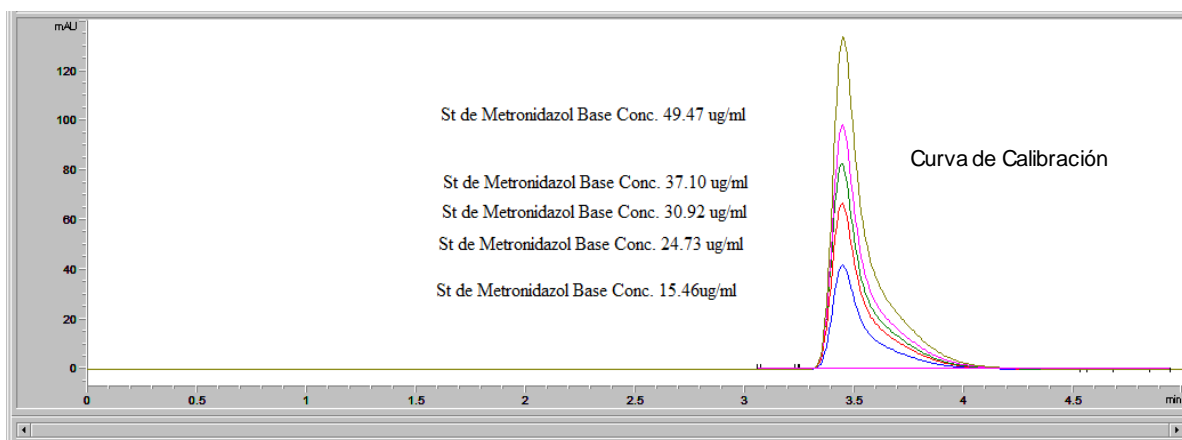
**Especificidad del método para la cuantificación de metronidazol base
Inyectable 500 mg/100mL.**



2. CALIBRADO DEL SISTEMA EN CLAR.

FIGURA N°2.1

Calibrado del sistema en área, estándar de referencia metronidazol base USP.



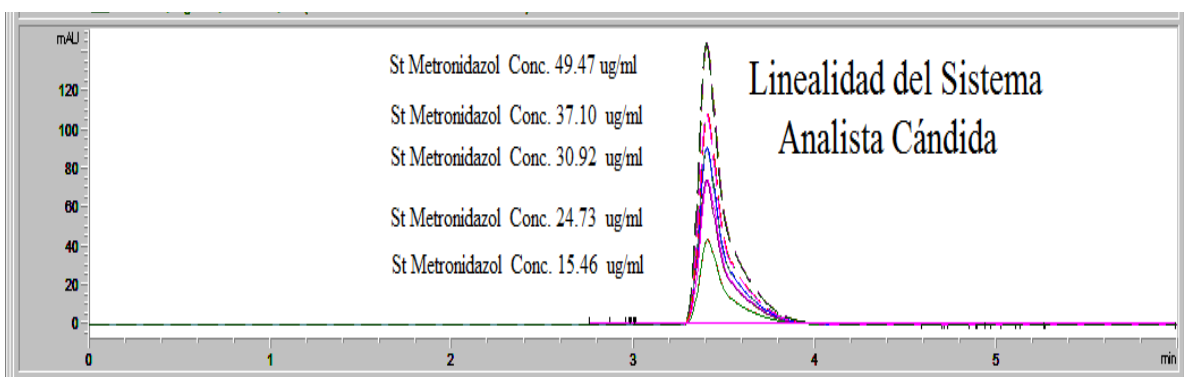
Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

3. LINEALIDAD DEL SISTEMA EN CLAR.

FIGURA N°3.1

Linealidad del sistema en área, estándar de referencia metronidazol base USP.

Analista 1

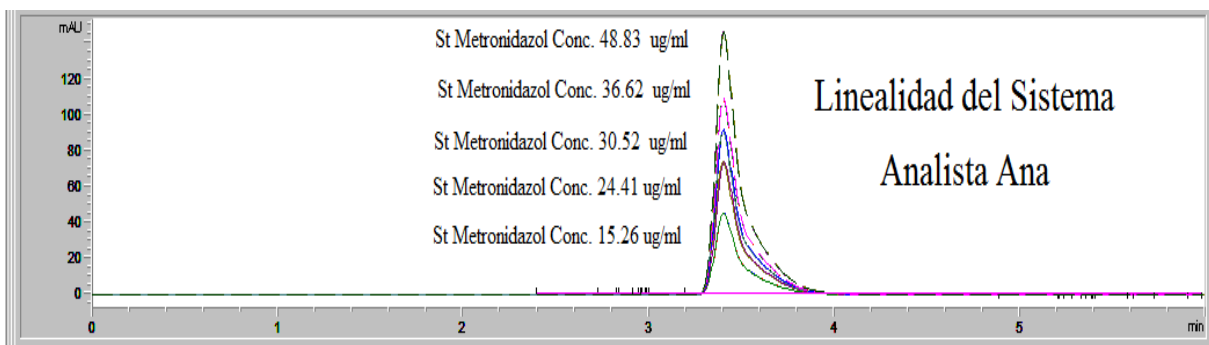


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

FIGURA N°3.2

Linealidad del sistema en área, estándar de referencia metronidazol base USP.

Analista 2

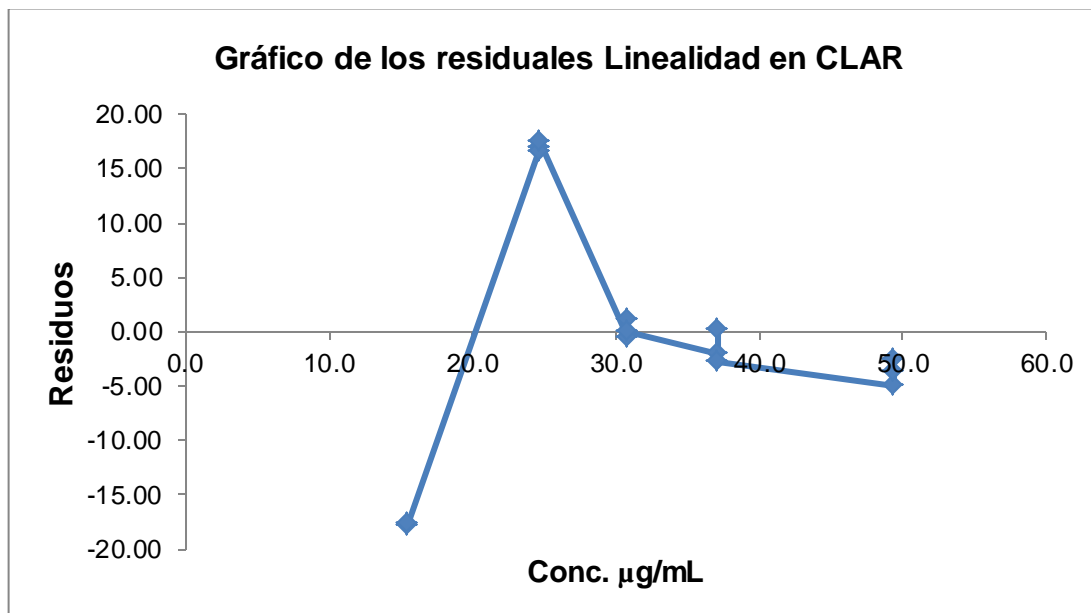


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

GRÁFICAS DE RESIDUALES EN CLAR

FIGURA N°3.3

COMPARACIÓN DE GRAFICAS DE LOS RESIDUALES

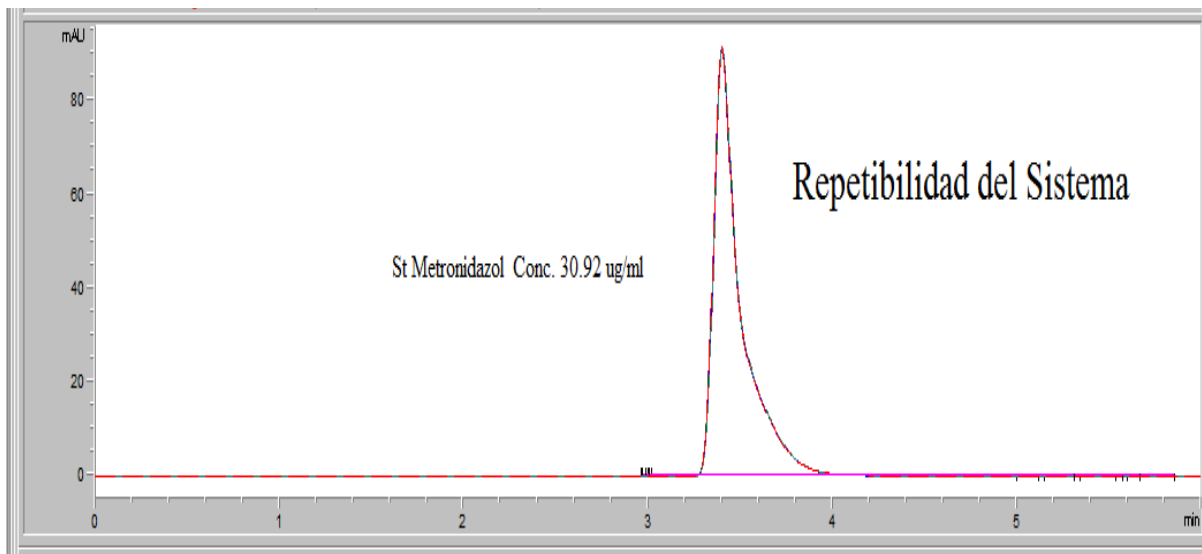


4. PRECISIÓN DEL SISTEMA EN CLAR.

4.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

FIGURA N°4.1.1

Repetibilidad del sistema en área, estándar de referencia metronidazol base USP.

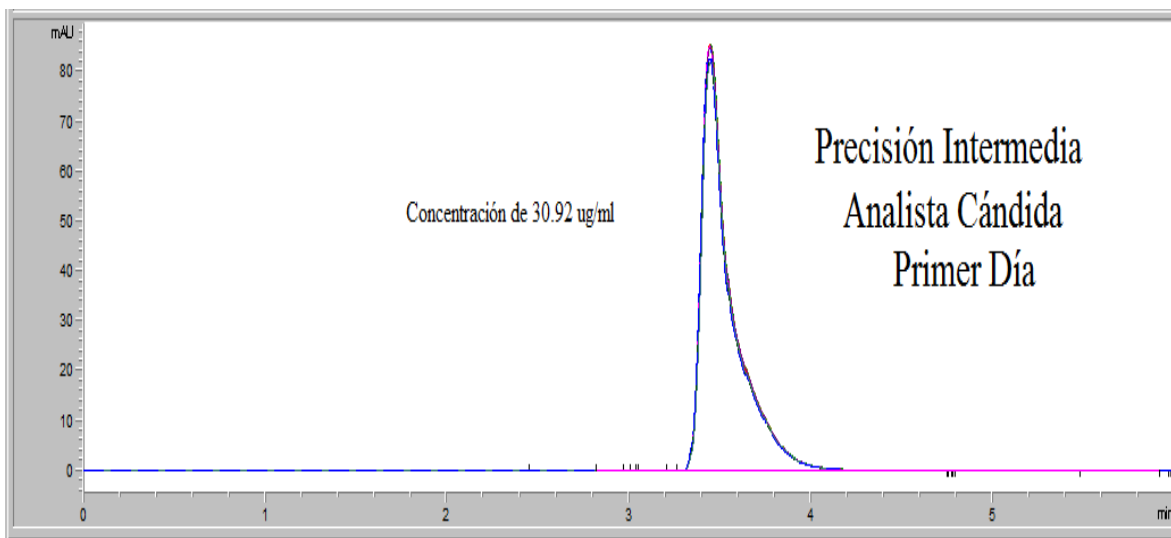


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

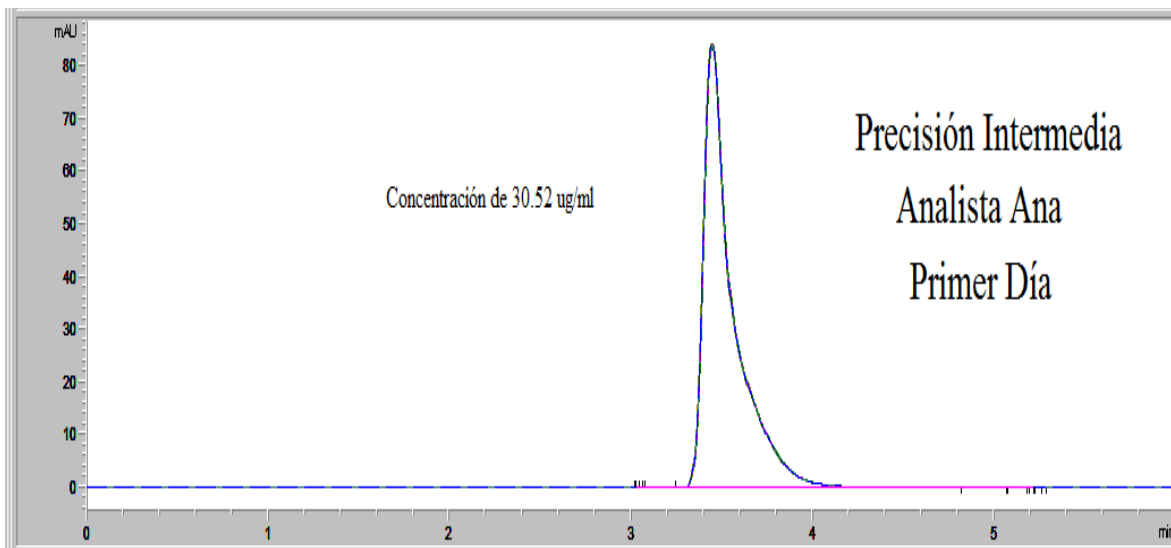
4.2. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL SISTEMA EN ÁREA DE ESTÁNDAR DE REFERENCIA METRONIDAZOL BASE DEL SISTEMA EN CLAR

FIGURA N°4.2.1

Precisión intermedia del sistema INTER-ANALISTA-1 DÍA

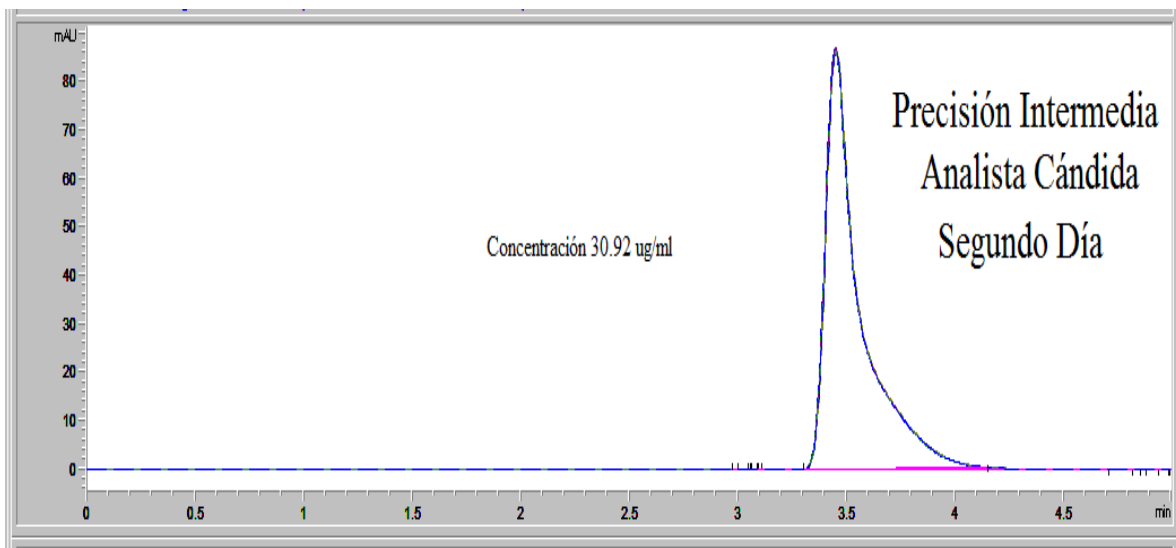


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

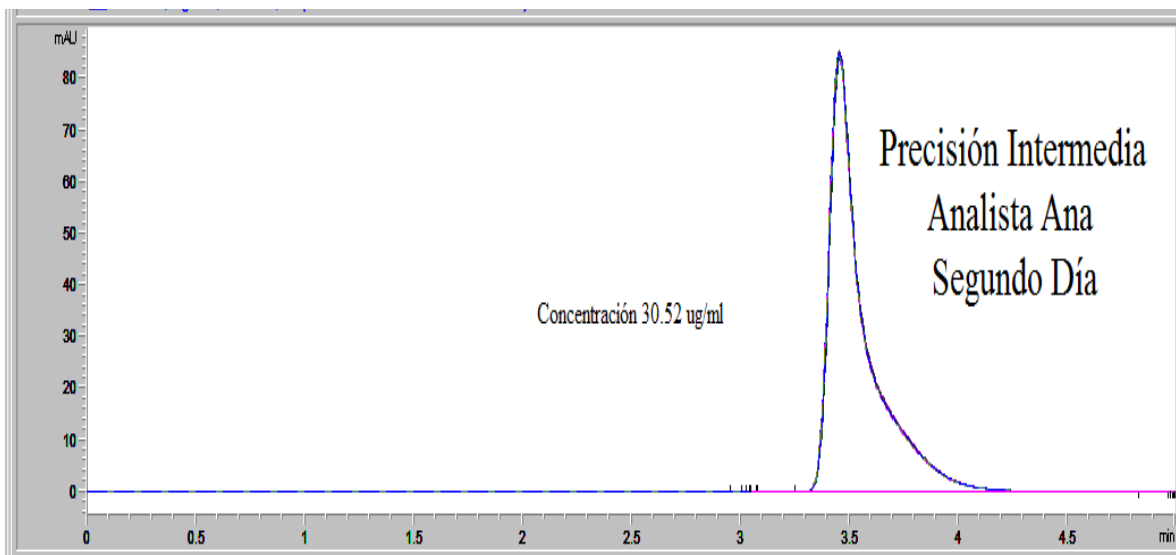


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

FIGURA N°4.2.2
Precisión intermedia del sistema INTER-ANALISTA-2 DÍA



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

**RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA INTER
ANALISTA E INTER DÍA EN CLAR.**

CLAR	PRECISIÓN INTERMEDIA EN CLAR					
	ANALISTA:1 DÍA:1			ANALISTA:1 DÍA:2		
CONC. mg/mL	ÁREA	ÁREA MEDIA	FY/X (ÁREA)	ÁREA	ÁREA MEDIA	FY/X
30.920	983.300	984.133	31.801	979.900	979.267	31.691
30.920	983.600		31.811	978.500		31.646
30.920	985.500		31.873	979.400		31.675
30.920	983.800	983.633	31.818	980.700	980.067	31.717
30.920	983.700		31.814	979.100		31.666
30.920	983.400		31.805	980.400		31.708
30.920	950.500	950.467	30.741	973.800	972.500	31.494
30.920	950.200		30.731	973.000		31.468
30.920	950.700		30.747	970.700		31.394
		Media	31.4600		Media	31.6067
		s	0.541		s	0.121
		CV %	1.719		CV %	0.382

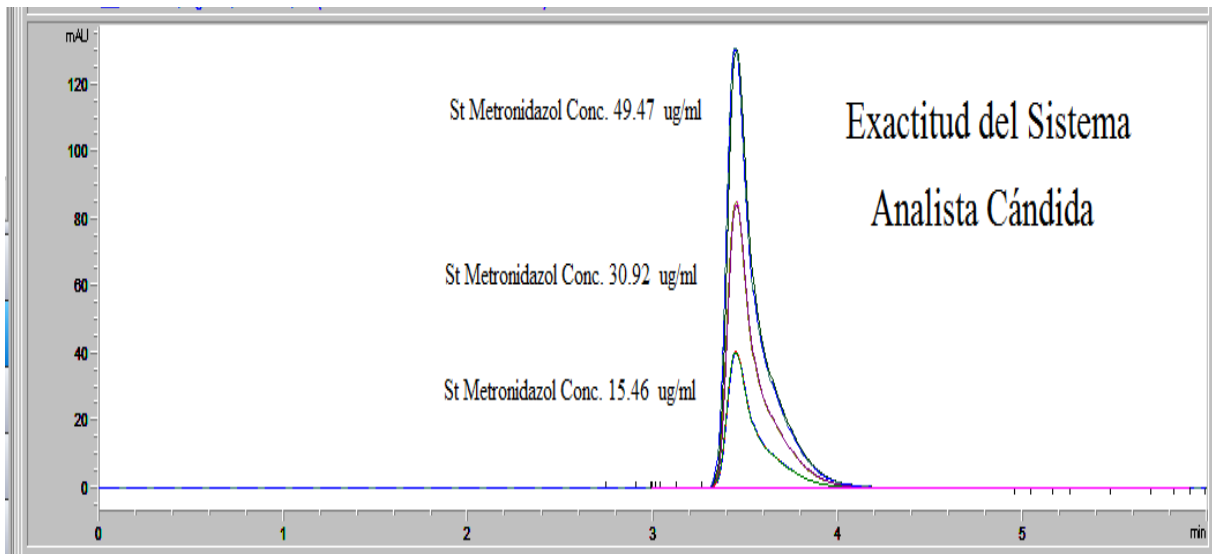
CONTINUIDAD DE LAS RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA INTER ANALISTA E INTER DÍA EN CLAR

CLAR	PRECISIÓN INTERMEDIA					
	ANALISTA: 2 DÍA:1			ANALISTA: 2 DÍA:2		
CONC. mg/mL	ÁREA	ÁREA MEDIA	FY/X	ÁREA	ÁREA MEDIA	FY/X
30.520	959.200	959.900	31.429	966.600	967.233	31.671
30.520	958.800		31.415	967.500		31.701
30.520	961.700		31.510	967.600		31.704
30.520	960.400	960.433	31.468	954.400	955.100	31.271
30.520	960.600		31.474	957.800		31.383
30.520	960.300		31.465	953.100		31.229
30.520	959.200	959.933	31.429	954.600	955.367	31.278
30.520	960.100		31.458	955.700		31.314
30.520	960.500		31.471	955.800		31.317
		Media	31.458		Media	31.430
		s	0.029		s	0.201
		CV %	0.093		CV %	0.640

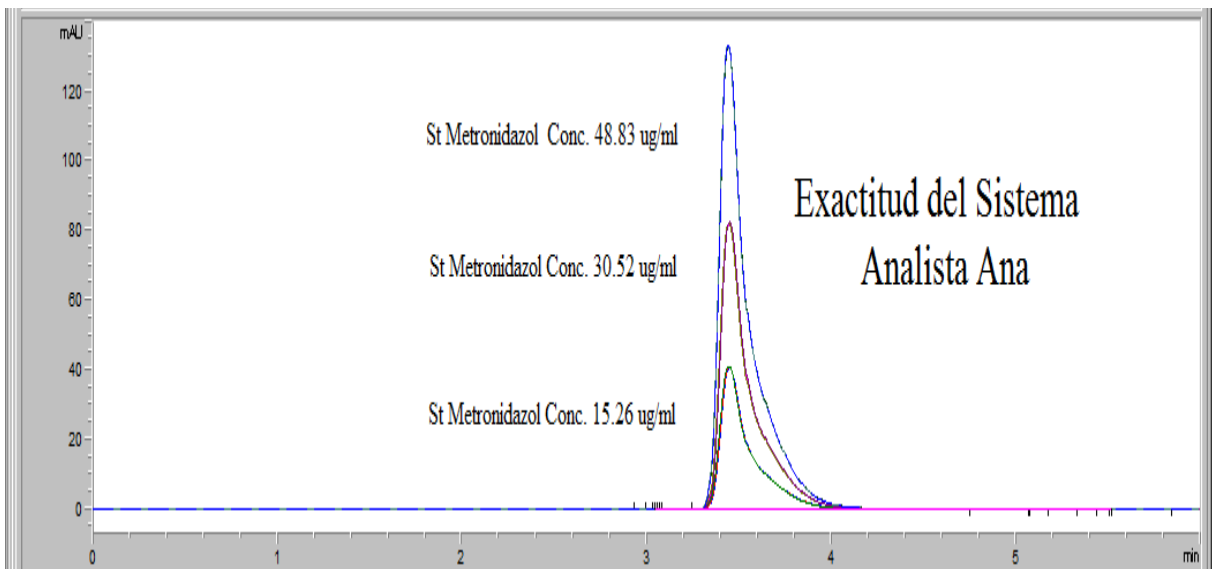
5. EXACTITUD DEL SISTEMA EN CLAR.

FIGURA N°5.1

Exactitud del sistema en área de estándar de referencia metronidazol base.



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

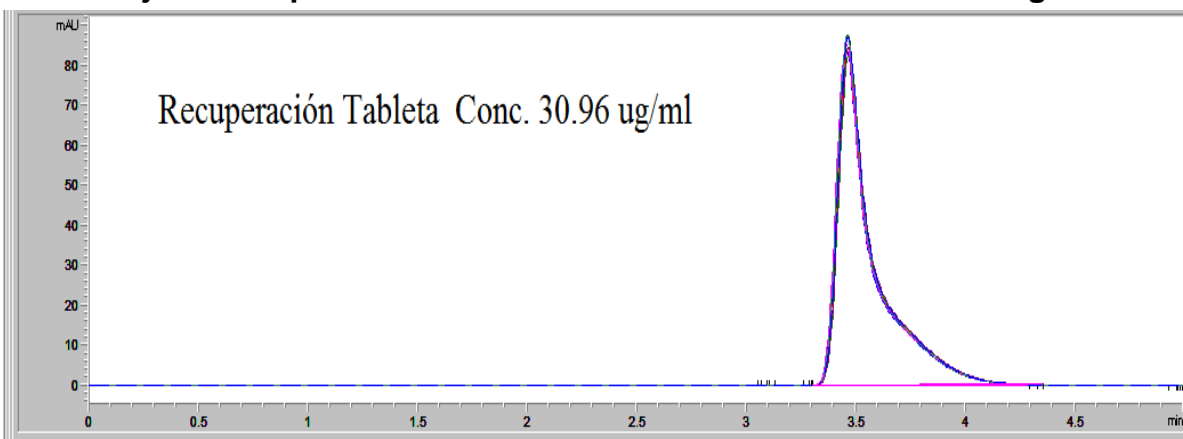


Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

6. EXACTITUD DEL MÉTODO EN CLAR

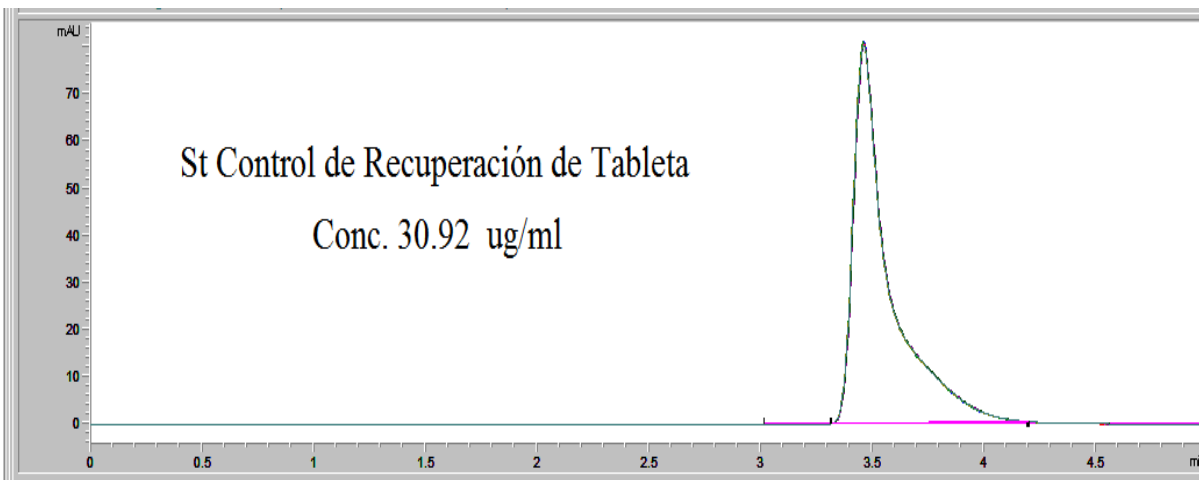
FIGURA N°6.1

Porcentaje de recuperación de metronidazol base tabletas de 500mg.



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

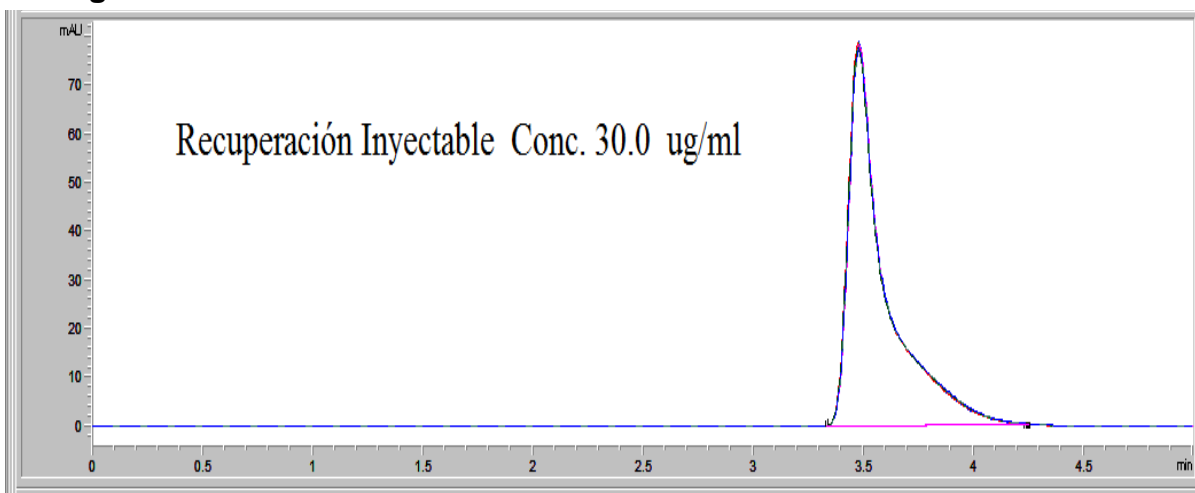
FIGURA N°6.1.1



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

FIGURA N°6.2

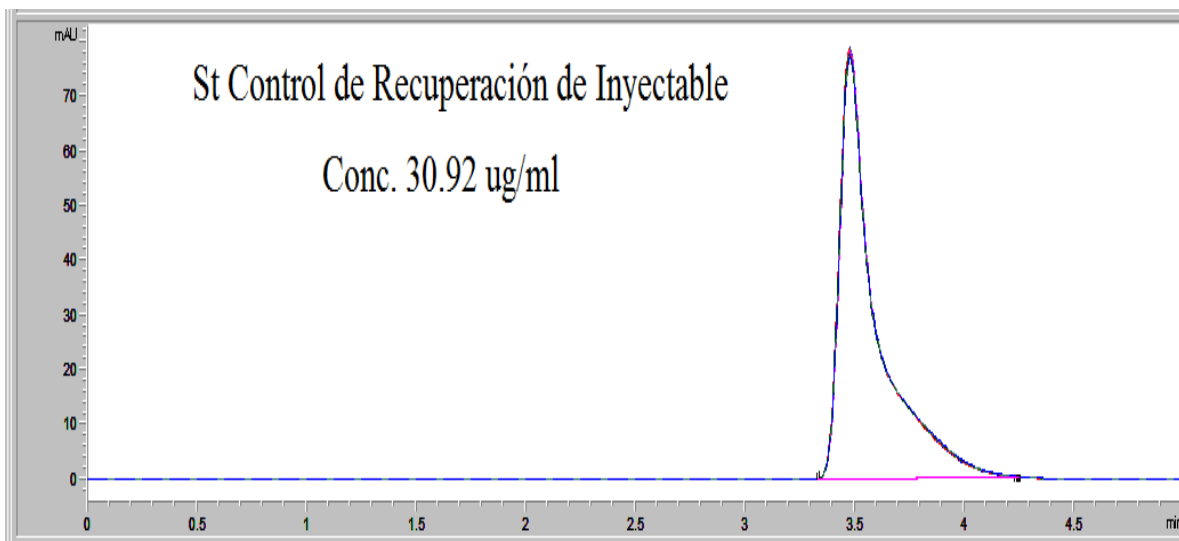
Porcentaje de recuperación de metronidazol base Inyectables de 500mg/ml.



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

FIGURA N°6.2.1

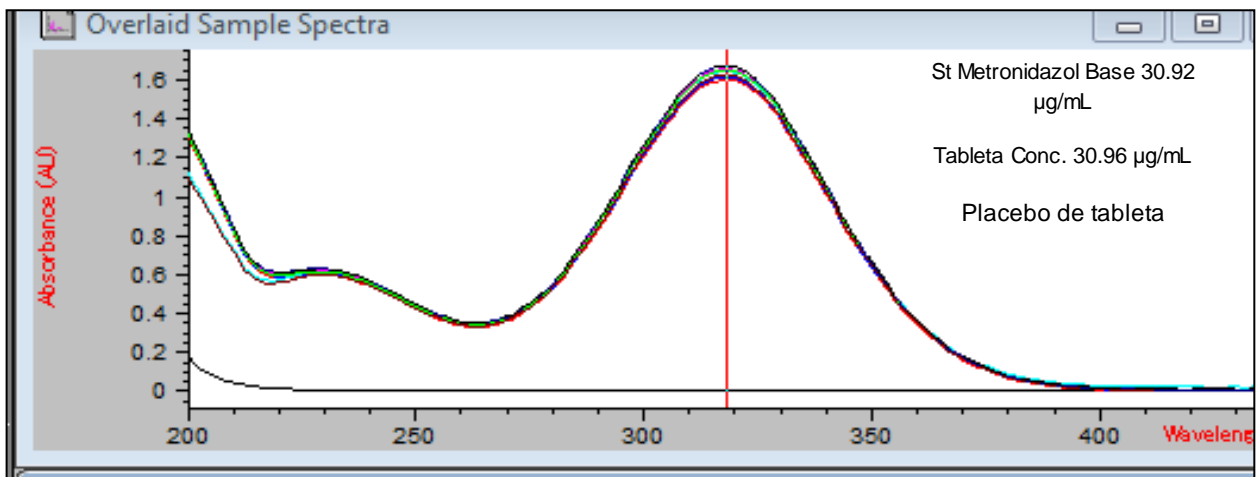
Estándar control de metronidazol base.



Fuente: Software ChemStation Agilent 1260

1. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO EN ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

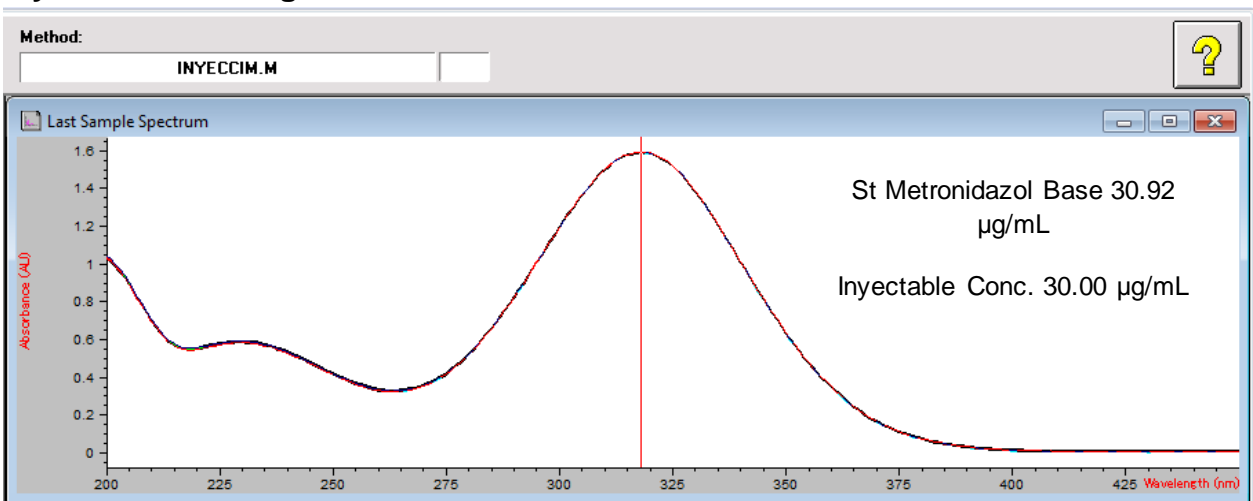
FIGURA N° 1.1 Especificidad del método para la cuantificación de metronidazol base Tabletas 500 mg.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

FIGURA N° 1.2

Especificidad del método para la cuantificación de metronidazol base Inyectables 500 mg /100 mL.

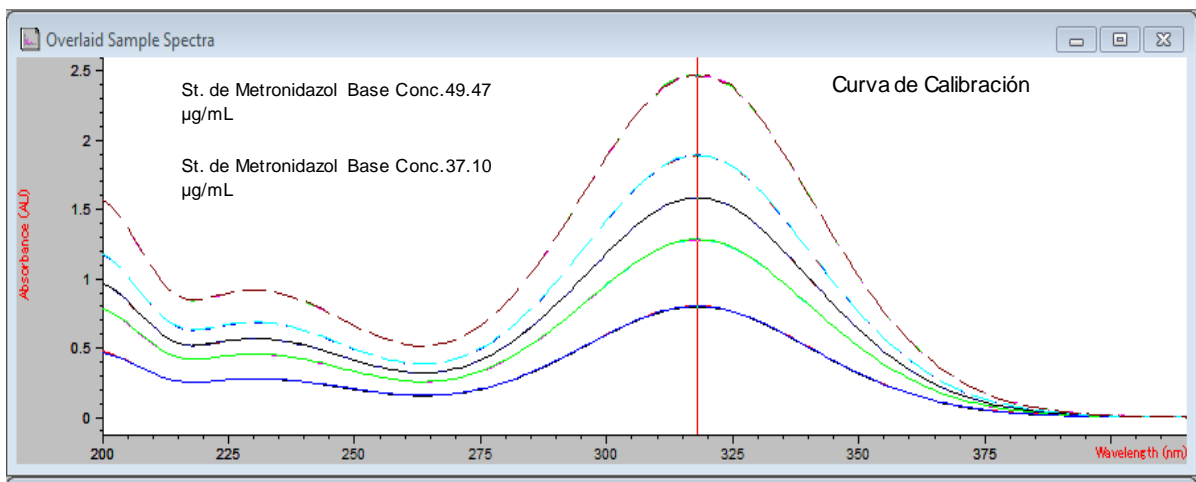


Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

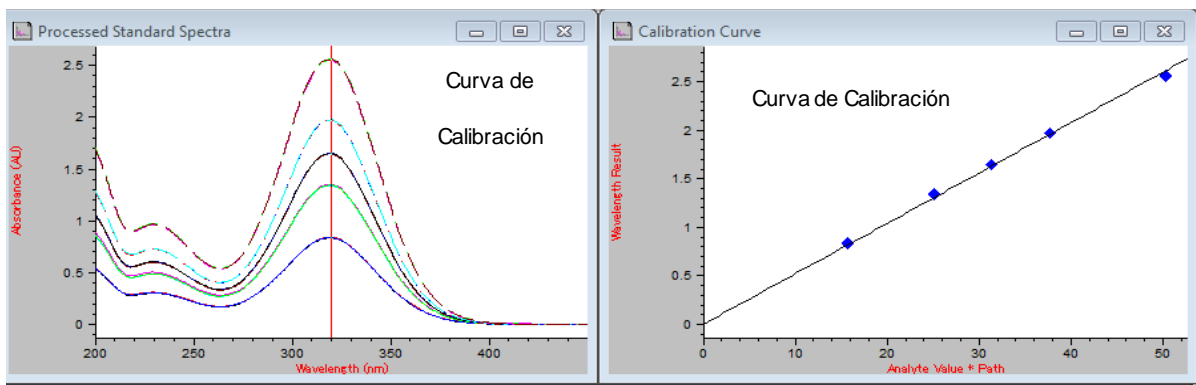
2. CALIBRADO DEL SISTEMA EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

FIGURA N°2.1

Calibrado del sistema en absorbancia, estándar de referencia metronidazol base USP.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

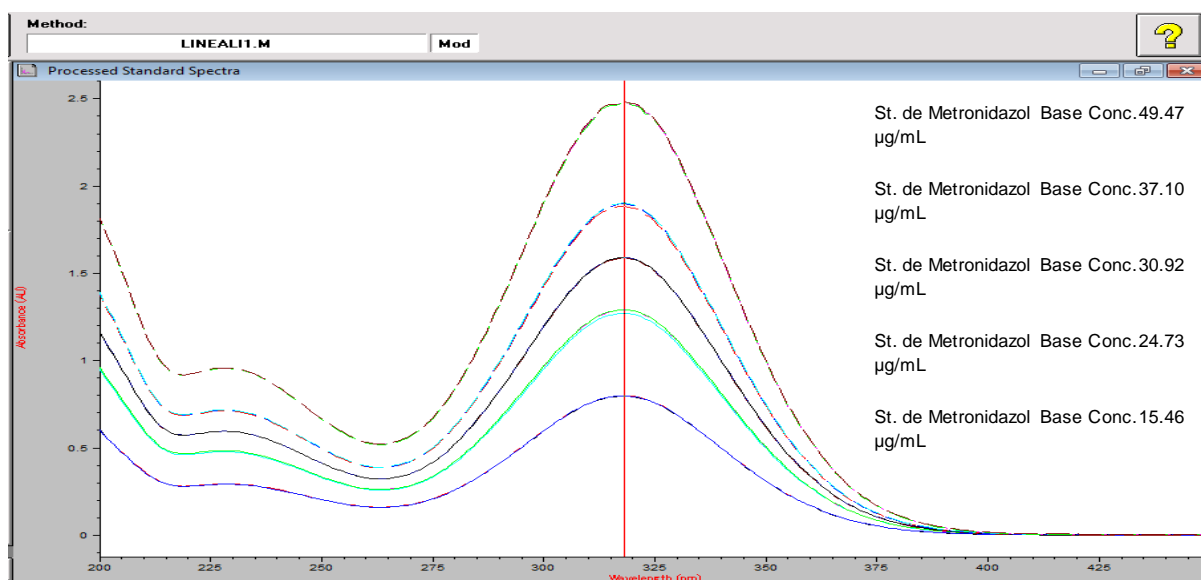


Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

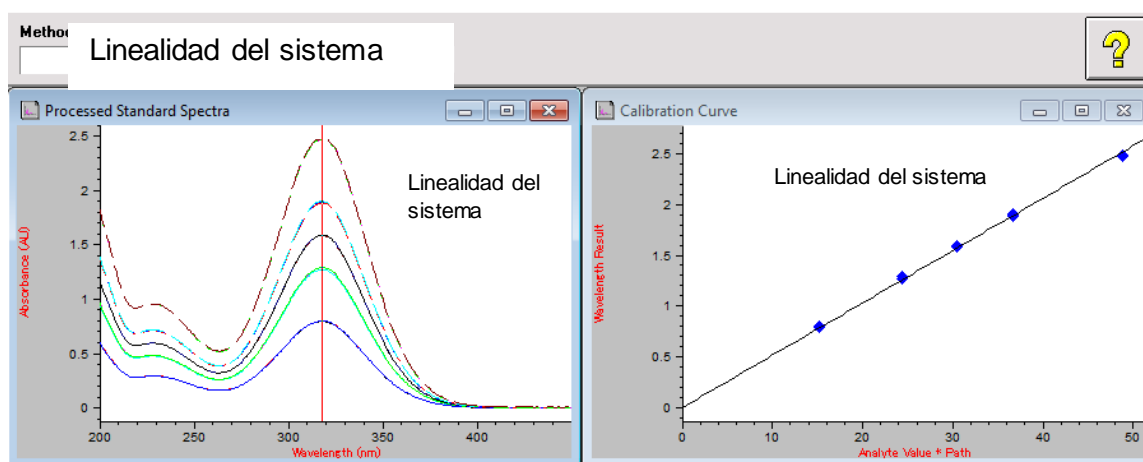
3. LINEALIDAD DEL SISTEMA EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

FIGURA N°3.1

Linealidad del sistema en absorbancia de estándar de referencia metronidazol base.

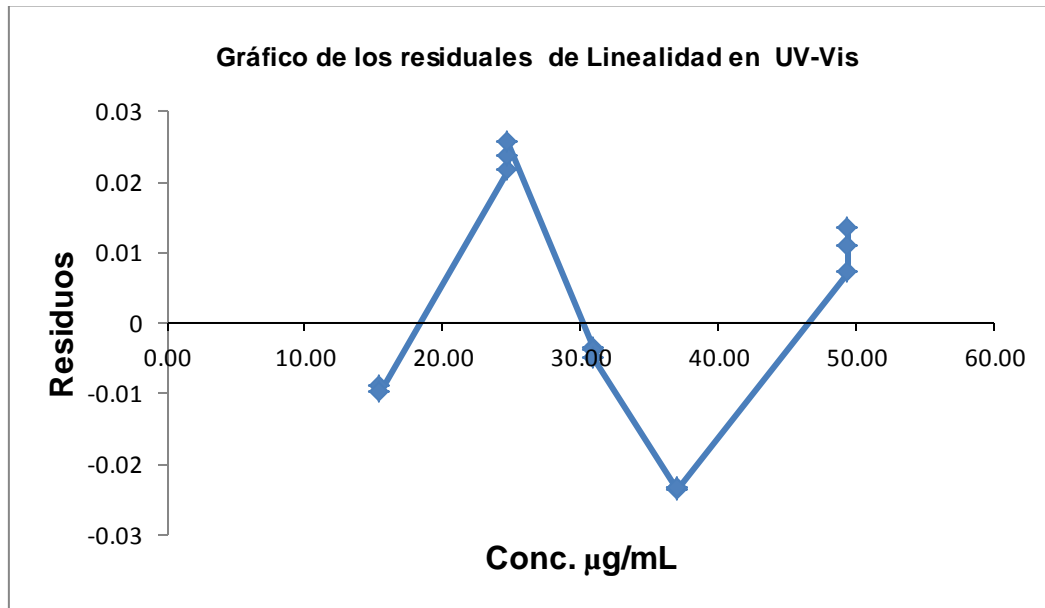


Fuente: Software ChemStation Agilent 8453



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

GRÁFICAS DE RESIDUALES EN UV/VIS

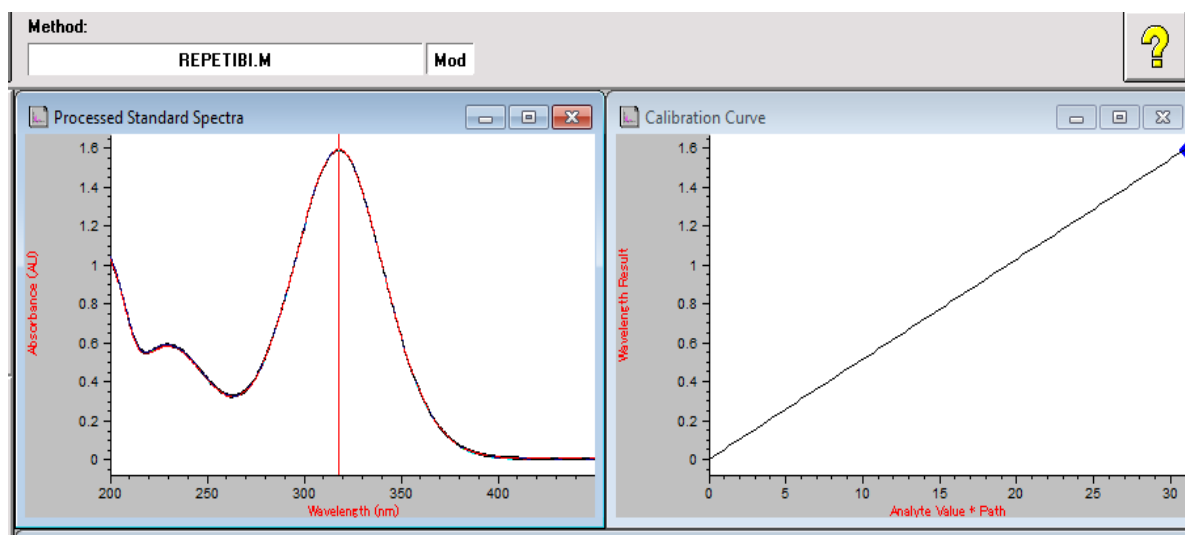


4. PRECISIÓN DEL SISTEMA EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

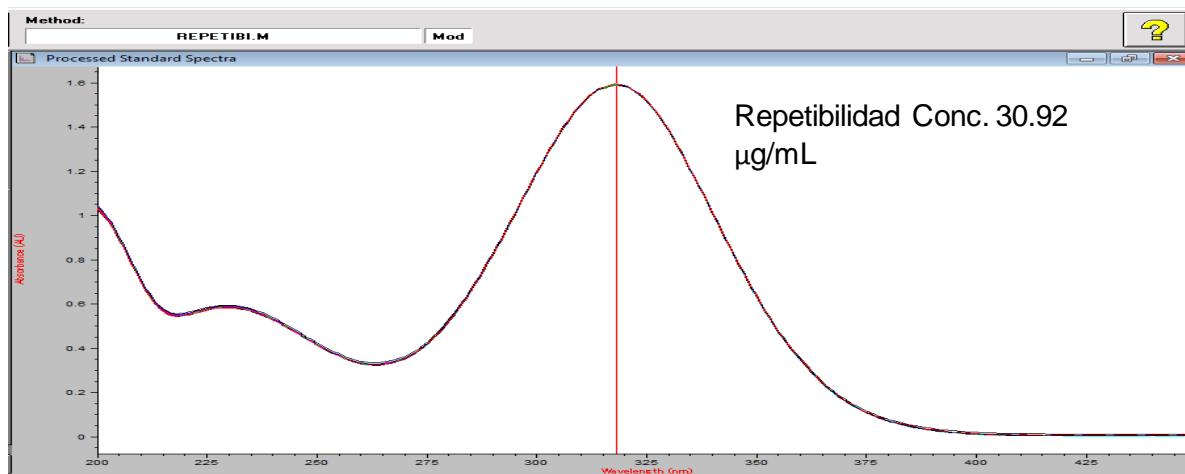
4.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

FIGURA N°4.1.1

Repetibilidad del sistema en absorbancia de estándar de referencia metronidazol base.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

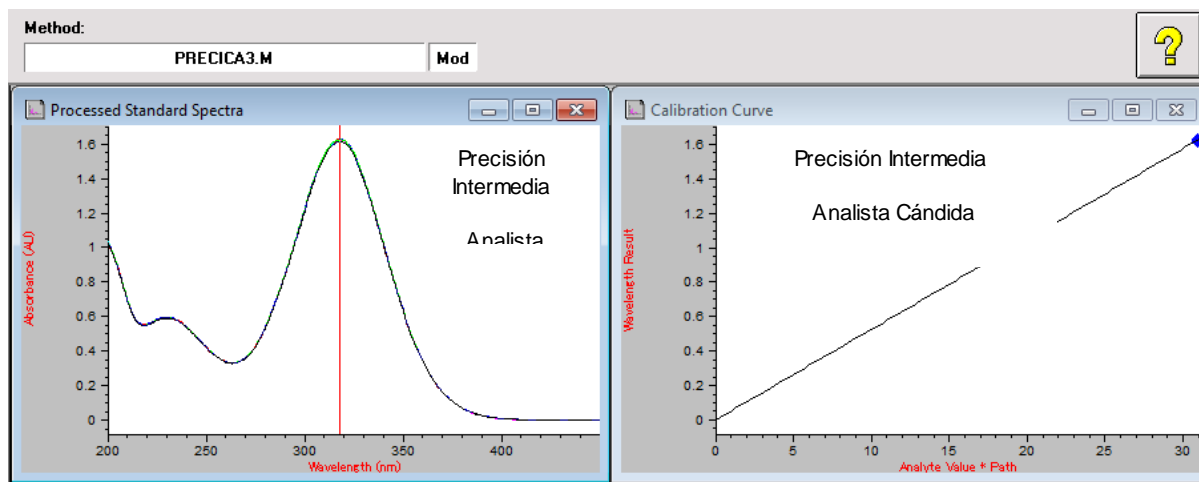


Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

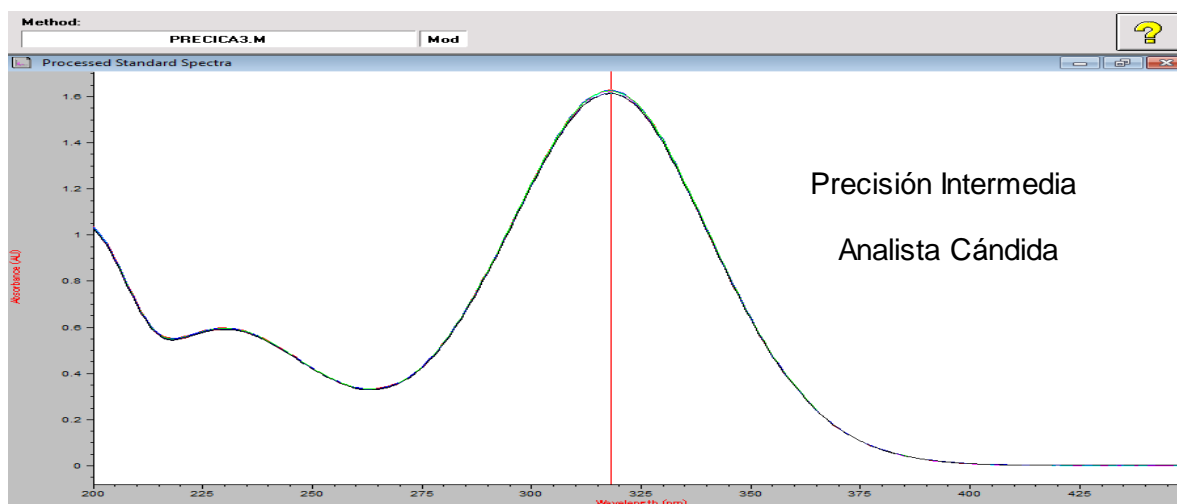
4.2 Precisión Intermedia del sistema en absorbancia de estándar de referencia metronidazol base.

FIGURA N°4.2.1

Precisión intermedia del sistema INTER-ANALISTA-1 DIA



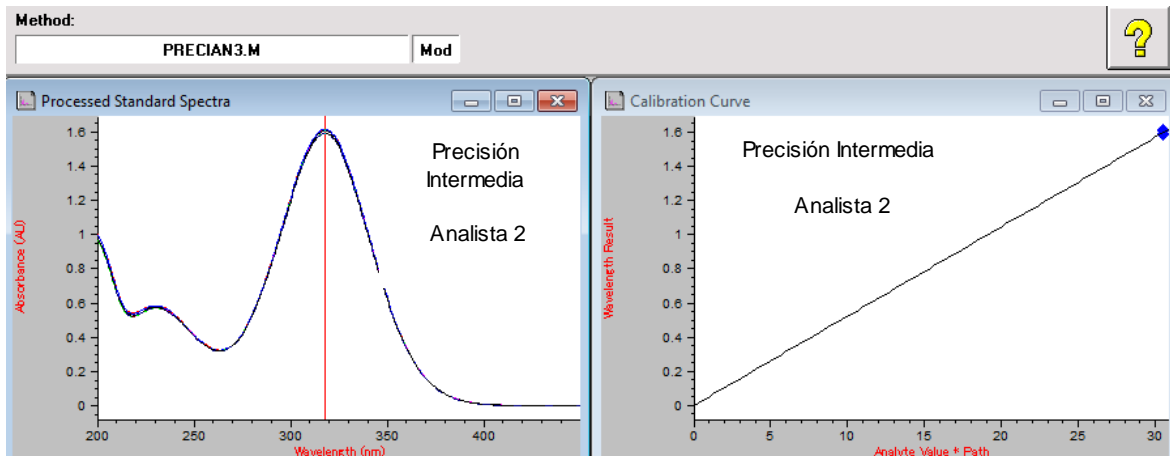
Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.



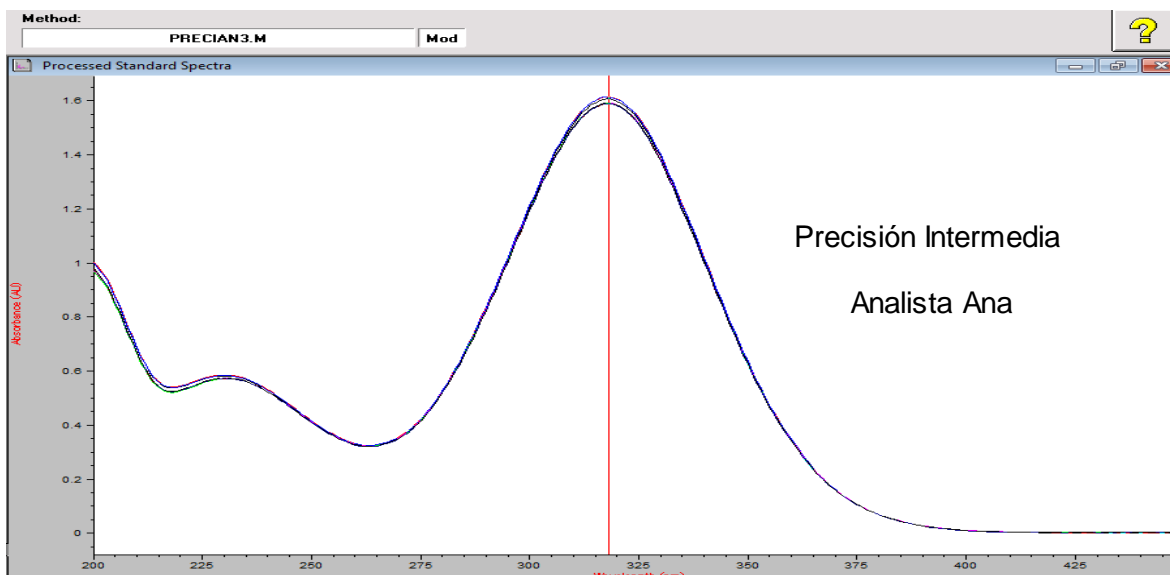
Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

FIGURA N°4.2.2

Precisión Intermedia del sistema INTERANALISTA-2 DIA



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

Anexo N°20

RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA INTER ANALISTA E INTER DÍA EN UV/VIS.

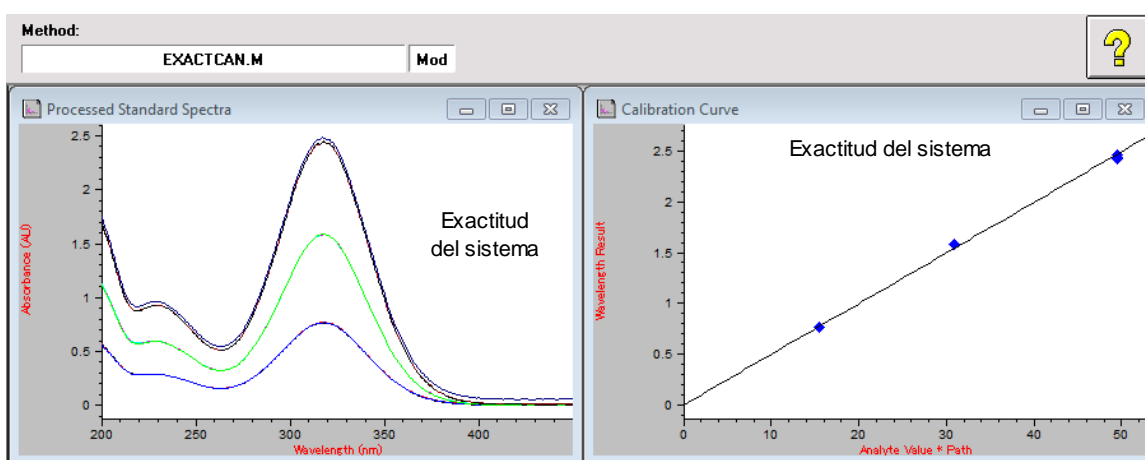
UV-VIS	PRECISIÓN INTERMEDIA EN UV-VIS					
	ANALISTA:1 DIA:1			ANALISTA:1 DIA:2		
CONC. mg/mL	Abs. <320nm>	Abs. MEDIA	FY/X (Abs.)	Abs. <320nm>	Abs. MEDIA	FY/X
30.920	1.625	1.625	0.053	1.592	1.590	0.051
30.920	1.624		0.053	1.592		0.051
30.920	1.627		0.053	1.588		0.051
30.920	1.624	1.625	0.053	1.586	1.582	0.051
30.920	1.625		0.053	1.586		0.051
30.920	1.626		0.053	1.573		0.051
30.920	1.614	1.615	0.052	1.579	1.579	0.051
30.920	1.616		0.052	1.579		0.051
30.920	1.615		0.052	1.578		0.051
		Media	0.052		Media	0.051
		s	0.0002		s	0.0002
		CV %	0.385		CV %	0.392

CONTINUIDAD DE LAS RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA INTER ANALISTA E INTER DÍA EN UV/VIS.

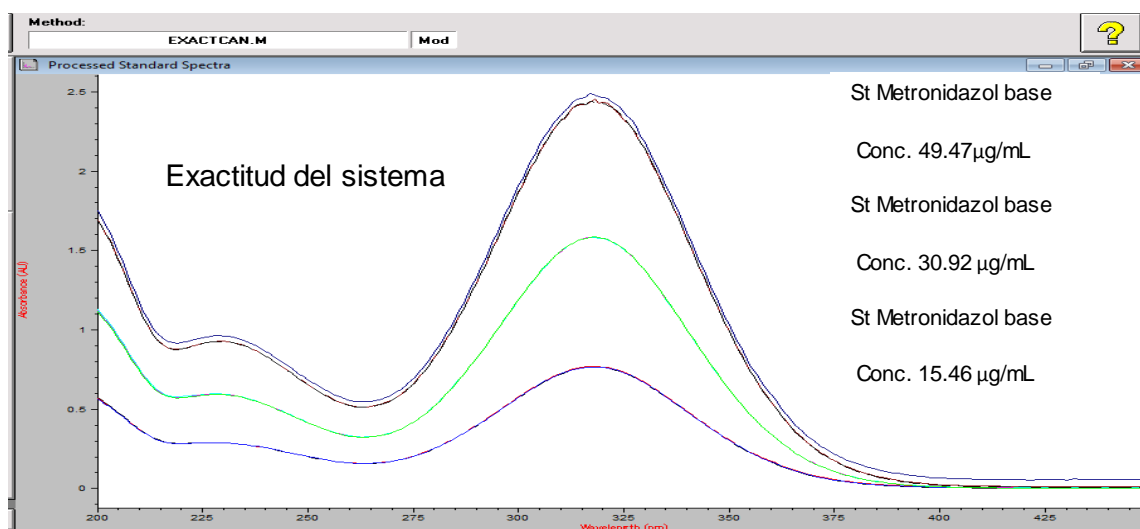
UV-VIS	PRECISION INTERMEDIA ANALISTA 1 UV-VIS					
	ANALISTA: 2 DÍA:1			ANALISTA: 2 DÍA:2		
CONC. mg/mL	Abs. <320nm>	Abs. MEDIA	FY/X (Abs.)	Abs. <320nm>	Abs. MEDIA	FY/X (Abs.)
30.520	1.606	1.610	0.053	1.576	1.581	0.052
30.520	1.613		0.053	1.584		0.052
30.520	1.612		0.053	1.583		0.052
30.520	1.589	1.590	0.052	1.589	1.591	0.052
30.520	1.591		0.052	1.583		0.052
30.520	1.590		0.052	1.602		0.052
30.520	1.588	1.589	0.052	1.601	1.605	0.052
30.520	1.588		0.052	1.607		0.053
30.520	1.591		0.052	1.606		0.053
Media			0.052			0.052
S			0.0003			0.0004
CV %			0.578			0.070

5. EXACTITUD DEL SISTEMA EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.
 FIGURA N°5.1

Exactitud del sistema en absorbanza de estándar de referencia metronidazol base.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453.

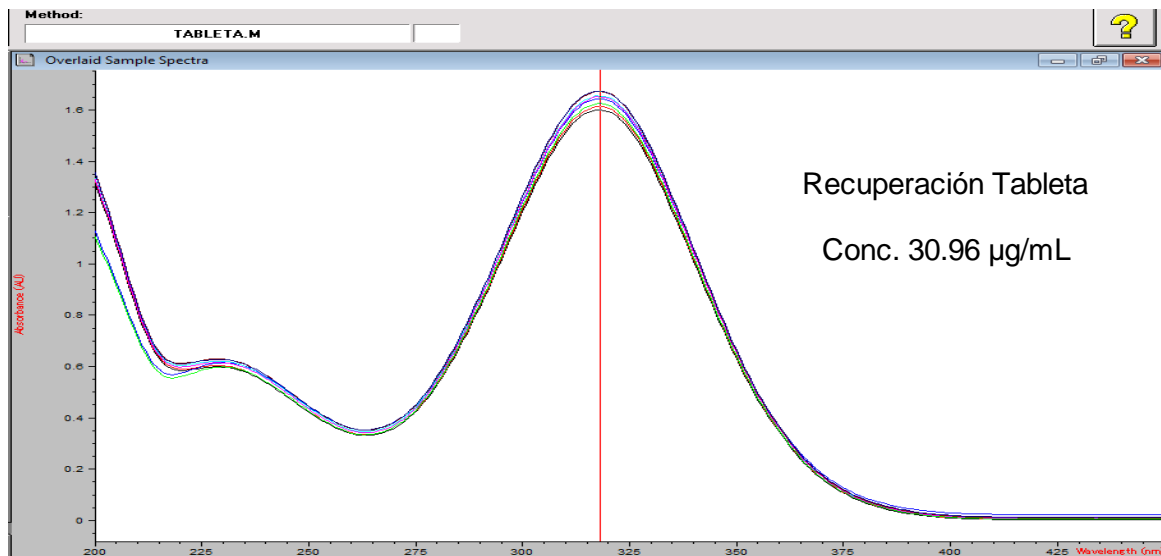


Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

6. EXACTITUD DEL METODO EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.

FIGURA N°6.1

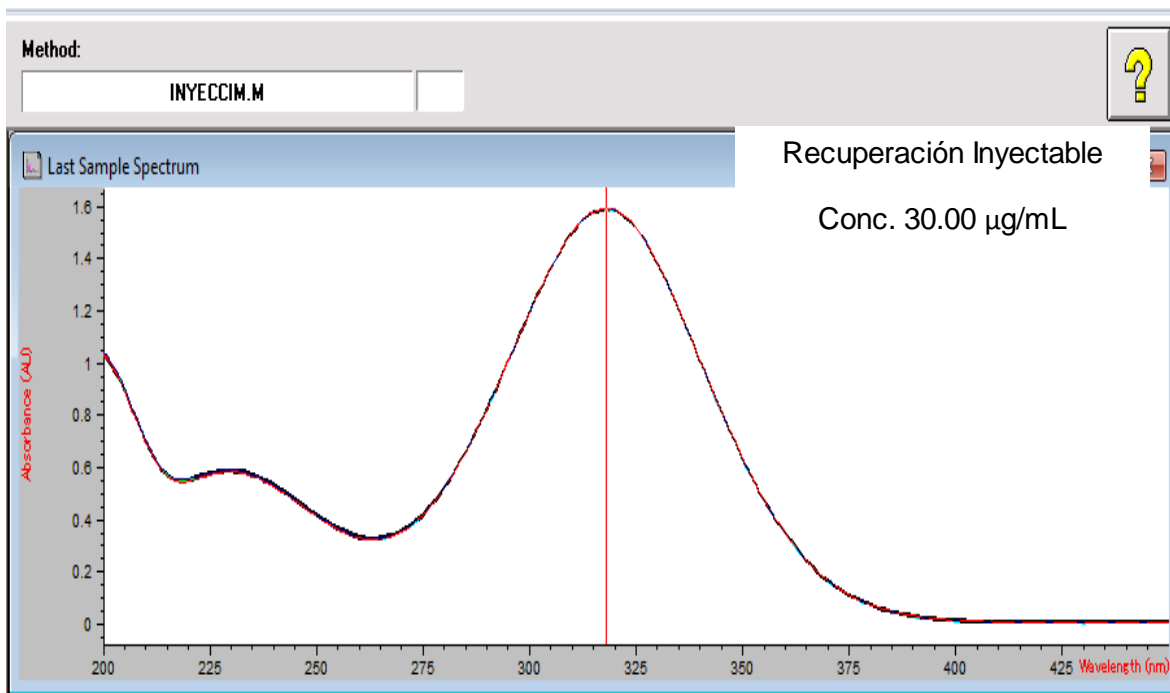
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE METRONIDAZOL BASE TABLETAS 500 mg.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

FIGURA N°6.2

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE METRONIDAZOL BASE INYECTABLES 500 mg /100 mL.



Fuente: Software ChemStation Agilent 8453

Metronidazole Tablets

» Metronidazole Tablets contain not less than 90.0 percent and not more than 110.0 percent of the labeled amount of metronidazole ($C_6H_9N_3O_3$).

Packaging and storage— Preserve in well-closed, light-resistant containers.

USP REFERENCE STANDARDS < 11 >—

USP Metronidazole RS

Identification—

A: To a portion of powdered Tablets, equivalent to about 300 mg of metronidazole, add 20 mL of dilute hydrochloric acid (1 in 100), shake for several minutes, and filter: suitable aliquots of the filtrate respond to *Identification* test B under *Metronidazole*.

B: The retention time of the major peak in the chromatogram of the Assay preparation corresponds to that of the Standard preparation as obtained in the Assay.

DISSOLUTION < 711 >—

Medium: 0.1 N hydrochloric acid; 900 mL.

Apparatus 1: 100 rpm.

Time: 60 minutes.

Procedure— Determine the amount of $C_6H_9N_3O_3$ dissolved from UV absorbances at the wavelength of maximum absorbance at about 278 nm of filtered portions of the solution under test, suitably diluted with 0.1 N hydrochloric acid, in comparison with a Standard solution having a known concentration of USP Metronidazole RS in the same medium.

Tolerances— Not less than 85% (Q) of the labeled amount of $C_6H_9N_3O_3$ is dissolved in 60 minutes.

UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS < 905 > : meet the requirements.

Procedure for content uniformity— Transfer one Tablet to a 250-mL volumetric flask, add about 100 mL of dilute hydrochloric acid (1 in 100), and shake for 30 minutes. Dilute with dilute hydrochloric acid (1 in 100) to volume, and mix. Filter, discarding the first 15 mL of the filtrate. Dilute the filtrate quantitatively with dilute hydrochloric acid (1 in 100), to obtain a solution having a concentration of about 0.2 mg of metronidazole per mL. Pipet 10 mL of this solution into a 100-mL volumetric flask, dilute with dilute hydrochloric acid (1 in 100) to volume, and mix. Concomitantly determine the absorbance of this test solution and that of a similarly prepared Standard solution of *USP Metronidazole RS*, having a known concentration of about 20 µg per mL, in 1-cm matched cells, at the wavelength of maximum absorbance at about 278 nm, with a suitable spectrophotometer, using dilute hydrochloric acid (1 in 100) as the blank. Calculate the quantity, in mg, of $C_6H_9N_3O_3$ in the Tablet taken by the formula:

$$(TC / D)(A_U / A_S)$$

in which *T* is the labeled quantity, in mg, of the metronidazole in the Tablet; *C* is the concentration, in µg per mL, of *USP Metronidazole RS* in the Standard solution; *D* is the concentration, in µg per mL, of metronidazole in the test solution, on the basis of the labeled quantity per Tablet and the extent of dilution; and *A_U* and *A_S* are the absorbances of the test solution and the Standard solution, respectively.

Assay—

Mobile phase— Prepare a filtered and degassed mixture of water and methanol (80:20), making adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Standard preparation— Dissolve an accurately weighed quantity of *USP Metronidazole RS* in *Mobile phase* to obtain a solution having a known concentration of about 0.5 mg per mL.

Assay preparation— Transfer to a suitable size volumetric flask 10 Tablets, whole or ground, which when diluted with methanol will yield a solution having a concentration of about 10 mg per mL. Add methanol, and shake by mechanical

means for 30 minutes or until the Tablets are disintegrated. Dilute with methanol to volume, and allow the solution to stand until the insoluble material has settled. Pipet 5.0 mL of the clear supernatant into a 100-mL volumetric flask, dilute with *Mobile phase* to volume, and mix. Filter the solution.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 254-nm detector and a 4.6-mm × 15-cm column that contains packing L7. The flow rate is about 1 mL per minute. Chromatograph the *Standard preparation*, and record the peak response as directed under *Procedure*: the tailing factor is not more than 2, and the relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0%.

Procedure— Separately inject equal volumes (about 10 µL) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the peak responses. Calculate the quantity, in mg, of metronidazole (C₆H₉N₃O₃) in the portion of Tablets taken by the formula:

$$10(L / D)C(r_U / r_S)$$

in which *L* is the labeled amount, in mg, of Metronidazole in each Tablet; *D* is the concentration, in mg per mL, of Metronidazole in the *Assay preparation* based on the labeled quantity per Tablet and the extent of dilution; *C* is the concentration, in mg per mL, of *USP Metronidazole RS* in the *Standard preparation*; and *r_U* and *r_S* are the metronidazole peak responses obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

Auxiliary Information— Please check for your question in the FAQs before contacting USP.

Topic/Question	Contact	Expert Committee
Monograph	Leonel M. Santos, Ph.D. Senior Scientific Liaison 1-301-816-8168	(SM12010) Monographs - Small Molecules 1
Reference Standards	RS Technical Services 1-301-816-8129 rstech@usp.org	
(711)	Margareth R.C. Marques, Ph.D. Senior Scientific Liaison 1-301-816-8106	(GCDF2010) General Chapters - Dosage Forms

USP34–NF29 Page 3520

Chromatographic Column—

METRONIDAZOLE TABLETS

Chromatographic columns text is not derived from, and not part of, USP 34 or NF 29.

Metronidazole Injection

» Metronidazole Injection is a sterile, isotonic, buffered solution of Metronidazole in Water for Injection. It contains not less than 90.0 percent and not more than 110.0 percent of the labeled amount of metronidazole ($C_6H_9N_3O_3$).

Packaging and storage— Preserve in single-dose containers of Type I or Type II glass, or in suitable plastic containers, protected from light.

USP REFERENCE STANDARDS 〈 11〉—

USP Endotoxin RS

USP Metronidazole RS

Identification—

A: Apply a measured volume of Injection containing 0.025 mg of metronidazole and a measured volume of a solution of *USP Metronidazole RS* containing 0.025 mg of metronidazole to a suitable thin-layer chromatographic plate (see *Chromatography* 〈 621〉) coated with a 0.25-mm layer of chromatographic silica gel mixture. Allow the spots to dry, and develop the chromatogram in a solvent system consisting of a mixture of chloroform, methanol, water, and ammonium hydroxide (70:28:4:2) until the solvent front has moved about three-fourths of the length of the plate. Remove the plate from the developing chamber, mark the solvent front, and allow the solvent to evaporate. Locate the spots on the plate by viewing under short-wavelength UV light: the R_F value of the principal spot obtained from the test solution corresponds to that obtained from the Standard solution.

B: The retention time of the major peak obtained from the *Assay preparation* corresponds to that of the *Standard preparation* obtained as directed in the *Assay*.

BACTERIAL ENDOTOXINS 〈 85〉— It contains not more than 0.35 USP Endotoxin

Unit per mg of metronidazole.

PH $\langle 791 \rangle$: between 4.5 and 7.0.

PARTICULATE MATTER $\langle 788 \rangle$: meets the requirements under small-volume injections.

Other requirements— It meets the requirements under *Injections* $\langle 1 \rangle$.

Assay—

Mobile phase— Prepare a suitable filtered and degassed mixture of monobasic potassium phosphate, prepared by dissolving 0.68 g of monobasic potassium phosphate in 930 mL of water, and methanol (930:70), and adjust with 1 M phosphoric acid to a pH of 4.0 ± 0.5 .

Standard preparation— Transfer about 25 mg of *USP Metronidazole RS*, accurately weighed, to a 25-mL volumetric flask, dissolve in methanol, dilute with methanol to volume, and mix. Pipet 2 mL of this solution into a 10-mL volumetric flask containing 2 mL of water, dilute with *Mobile phase* to volume, and mix.

Assay preparation— Transfer an accurately measured volume of Injection, equivalent to about 25 mg of metronidazole, to a 25-mL volumetric flask, dilute with water to volume, and mix. Pipet 2 mL of this solution into a 10-mL volumetric flask containing 2 mL of methanol, dilute with *Mobile phase* to volume, and mix.

Chromatographic system (see *Chromatography* $\langle 621 \rangle$)—The liquid chromatograph is equipped with a 320-nm detector and a 4.6-mm \times 25-cm column that contains packing L1. The flow rate is about 2.0 mL per minute. Chromatograph five replicate injections of the *Standard preparation*, and record the peak responses as directed under *Procedure*: the relative standard deviation is not more than 2.0%, and the tailing factor is not greater than 2.0.

Procedure— Separately inject equal volumes (about 20 μ L) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the major peaks. Calculate the

quantity, in mg, of metronidazole ($C_6H_9N_3O_3$) in each mL of the Injection taken by the formula:

$$125C / V(r_U / r_S)$$

in which C is the concentration, in mg per mL, of *USP Metronidazole RS* in the *Standard preparation*; V is the volume, in mL, of Injection taken; and r_U and r_S are the peak responses for metronidazole obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

Anexo N° 27

REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RCTA 11:03:39:06

**PRODUCTOS FARMACEUTICOS.
MEDICAMENTOS PARA USO HUMANO.
VERIFICACION DE LA CALIDAD.**

Correspondencia: No hay correspondencia con ninguna norma internacional

ICS 11.120.01

NSO RTCA 11.03.47:07

Reglamento Técnico Centroamericano editado por:

- Ministerio de Economía, MINECO
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC
- Secretaria de Industria y Comercio, SIC
- Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC

INFORME

Los respectivos Comités Técnicos de Normalización y de Reglamentación Técnica a través de los Entes de Normalización y de Reglamentación Técnica de los Países de la Región Centroamericana y sus sucesores, son los organismos encargados de realizar el estudio o la adopción de los Reglamentos Técnicos. Están conformados por representantes de los sectores Académico, Consumidor, Empresa Privada y Gobierno.

Este documento fue aprobado como Reglamento Técnico Centroamericano, NSO RTCA 11.03.47:07 Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad, por los Subgrupos de Medidas de Normalización y de Medicamentos y Productos Afines de los Países de la Región Centroamericana. La oficialización de este reglamento técnico, conlleva la ratificación por el Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica (COMIECO)

MIEMBROS PARTICIPANTES DEL SUBGRUPO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS AFINES

Por Guatemala
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Por El Salvador
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Consejo Superior de Salud Pública

Por Nicaragua
Ministerio de Salud

Por Honduras
Secretaría de Salud

Por Costa Rica
Ministerio de Salud

1. OBJETO

Este reglamento técnico tiene por objeto establecer las pruebas analíticas que deben ser realizadas para comprobar la calidad de los medicamentos por parte de la autoridad reguladora.

2. Ámbito de aplicación

Las disposiciones de este reglamento son de aplicación para todos los medicamentos importados y fabricados en los países de la región Centroamericana.

3. Documentos a consultar

RTCA 11.01.02:04 Productos Farmacéuticos. Etiquetado de Productos Farmacéuticos para uso Humano.

RTCA 11.03.42:07 Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas Prácticas de Manufactura para la industria farmacéutica.

4. Definiciones

4.1 Autoridad reguladora: Ente responsable del Registro Sanitario y/o Vigilancia Sanitaria de cada país Centroamericano.

4.2 Calidad: Naturaleza esencial de un producto y la totalidad de sus atributos y propiedades, las cuales determinan su idoneidad para los propósitos a los cuales se destina.

4.3 Características organolépticas: Son características que se confieren a las formas farmacéuticas tales como forma, color, olor, sabor, homogeneidad, textura, dimensiones u otros; los cuales se determinan a través de los sentidos.

4.4 Especificaciones: Descripción de los requisitos que debe satisfacer el material inicial, el material de empaque y los productos intermedios, a granel y terminados. Dichos requisitos incluyen características organolépticas y propiedades físicas, químicas, microbiológicas y biológicas.

4.5. Estabilidad durante el tiempo de uso: Valoración realizada al producto reconstituido o diluido al final del periodo máximo de uso y bajo las condiciones indicadas en la etiqueta.

4.6 Forma farmacéutica: Es la forma física que se le da a un medicamento, la cual facilita la dosificación del o de los principios activos para que puedan ejercer su acción en el lugar y tiempo.

4.7 Medicamento: Sustancia simple o compuesta, natural, sintética, o mezcla de ellas, con forma farmacéutica definida, empleada para diagnosticar, tratar, prevenir enfermedades o modificar una función fisiológica de los seres humanos.

4.8 Muestra: Parte o porción finita representativa de un material, un lote de producción o de medicamentos almacenados, transportados o en uso que se someten a análisis a efecto de verificar las características de calidad o su adecuación para el uso.

4.9 Muestra de retención: Cantidad de unidades representativas de cada lote de producto terminado, materia prima o material de envase, almacenada por un período de tiempo establecido y en cantidad suficiente para repetir el análisis completo.

5. Evaluación Técnica

5.1 Etiquetado

Debe cumplir con el RTCA 11.01.02:04 Productos Farmacéuticos. Etiquetado de Productos Farmacéuticos para uso Humano.

Pruebas

Las pruebas declaradas en las tablas que a continuación se describen detallan los parámetros de calidad de las diferentes formas farmacéuticas.

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas

Forma farmacéutica	Pruebas
Tabletas con y sin recubrimiento	Características organolépticas Peso promedio Variación de peso Friabilidad Fuerza de ruptura. Desintegración Contenido de agua Identificación de (los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Disolución Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (continuación)

Forma farmacéutica	Pruebas
Cápsulas de gelatina dura y blanda	Características organolépticas de la cápsula y de su contenido Peso promedio Variación de peso Desintegración Contenido de agua Identificación de (los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Disolución Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (continuación)

Forma farmacéutica	Pruebas
Soluciones y Emulsiones (orales y tópicos)	Características organolépticas Volumen de entrega pH Densidad relativa o peso específico Viscosidad Contenido de alcohol Identificación de (los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas, sustancias relacionadas o productos de degradación Límites microbianos
Suspensiones (orales y tópicos)	Características organolépticas Volumen de entrega pH Densidad relativa o peso específico Viscosidad Identificación de (los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Disolución Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos
Soluciones, Emulsiones y Suspensiones (inyectables, oftálmicas y óticas estériles)	Características organolépticas Volumen en envase pH Partículas Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Uniformidad de unidades de dosificación Esterilidad Endotoxinas bacterianas (solo en inyectables)

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (continuación)

Forma farmacéutica	Pruebas
Polvos y granulados (orales, tópicos y para reconstituir)	Características organolépticas (sin reconstituir y reconstituido) Contenido de agua Tiempo de reconstitución Llenado mínimo Uniformidad de unidades de dosificación Variación de peso pH Partículas Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Estabilidad durante el tiempo de uso Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos
Polvos para reconstituir (inyectables)	Características organolépticas (sin reconstituir y reconstituido) Contenido de agua Tiempo de reconstitución Llenado mínimo pH Partículas Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Esterilidad Endotoxinas bacterianas
Cremas, Ungüentos, Pastas y Geles (tópicos)	Características organolépticas Llenado mínimo pH Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia o concentración del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (continuación)

Forma farmacéutica	Pruebas
Cremas, Ungüentos y Geles (oftálmicas)	Características organolépticas Llenado mínimo pH Contenido de agua Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia o concentración del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Partículas metálicas Esterilidad

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (Final)

Forma farmacéutica	Pruebas
Supositorios (rectales, uretrales y vaginales) y supositorios en tabletas o cápsulas vaginales	Características organolépticas Peso promedio Variación de peso Desintegración Tiempo de fusión Identificación de (los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Disolución Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos

Continúa

Tabla N° 1. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas (Final)

Forma farmacéutica	Pruebas
Aerosoles, atomizadores e inhaladores	Características organolépticas Llenado mínimo Número total de descarga por envase pH Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Uniformidad de dosis liberada Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Velocidad de descarga Prueba de fuga (si la válvula es dosificadora) Cantidad descargada (si la válvula es de descarga continua) Prueba de presión (si la válvula es de descarga continua) Límites microbianos
Sistemas transdérmicos y emplastos o cintas adhesivas	Características organolépticas Peso promedio Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Uniformidad de unidades de dosificación Liberación de fármaco (Disolución, solo en sistemas transdérmicos) Impurezas: productos de degradación o sustancias relacionadas Límites microbianos
Implantes	Características organolépticas Peso promedio Variación de peso Identificación de (los) principio(s) activo(s) Valoración, potencia, concentración o actividad del (o los) principio(s) activo(s) Impurezas, sustancias relacionadas o productos de degradación Esterilidad

NOTAS

Las pruebas indicadas en la tabla N° 1 se realizarán cuando apliquen, de acuerdo a las especificaciones individuales de cada producto según lo declarado por el fabricante en el registro sanitario o según lo que indiquen las farmacopeas oficiales (anexo 4, Resolución 93-2002, COMIECO- 24, Septiembre 2002).

Las pruebas incluidas en la tabla N° 1, no declaradas por el fabricante, independientemente de si el producto es farmacopéico o no, constituyen pruebas que deben ser efectuadas al verificar la calidad en el registro y en la vigilancia.

En el anexo 1 se indica la cantidad de muestras y muestras de retención que deben ser tomadas para realizar las pruebas mencionadas en la tabla N° 1

BIBLIOGRAFÍA

Arias, T D. Glosario de Medicamentos: Desarrollo Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.: OPS. 1999.

Farmacopea de los Estados Unidos 30 y Formulario Nacional 25. Trigésima edición. The United States Pharmacopeial Convention Inc. USA. 2007.

7. VIGILANCIA Y VERIFICACIÓN

La vigilancia y verificación de este Reglamento Técnico Centroamericano corresponde a la Autoridad Reguladora de cada país.

Anexo A
(Normativo)

Cantidad de muestras requeridas para la verificación de la calidad de los medicamentos para uso humano

PRODUCTO	CANTIDAD		
	MUESTRA	MUESTRA DE RETENCIÓN	Total
Aerosoles, atomizadores e inhaladores (sin antibiótico)	10	10	20
Aerosoles, atomizadores e inhaladores (con antibiótico)	15	15	30
Cápsulas, grageas, tabletas	60	60	120
Líquidos orales (suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones)	13	13	26
Líquidos tópicos (soluciones, suspensiones y emulsiones)	13	13	26
Líquidos orales empacados en contenedores de dosis unitaria	13	13	26
Polvos y granulados (frascos/ sobres) con menos 150 g	20	20	40
Polvos y granulados (frascos/ sobres) con más 150 g	10	10	20
Inyectables menor e igual a 3 mL	50	50	100
Inyectable de 5 a 10 MI	30	30	60
Inyectable de 20 a 100mL	10	10	20
Inyectables más de 100 mL	7	7	14
Cremas, geles y ungüentos tópicos (sin antibiótico)	15	15	30
Cremas, geles y ungüentos tópicos (con antibiótico)	20	20	40
Polvos y liofilizados estériles (inyectables)	20	20	40
Soluciones Óticas y Nasaes	30	30	60
Supositorios o supositorios en tabletas	30	30	60
Parches transdérmicos y emplastos o cintas adhesivas	15	15	30

Implantes	15	15	30
Ungüentos, cremas, soluciones y suspensiones oftálmicas (sin antibióticos)	30	30	60
Ungüentos, cremas, soluciones y suspensiones oftálmicas (con antibióticos)	40	40	80
Lata con más de 200 g de polvo	3	3	6
Sueros orales en solución	3	3	6

TABLAS:
G-COCHRAN
F - FISHER
T-STUDENT

Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran

$\alpha = 0.05$

<i>k</i>	<i>n</i>													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.336	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

$\alpha = 0.01$

<i>k</i>	<i>n</i>													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.999	0.995	0.979	0.958	0.937	0.917	0.898	0.882	0.867	0.853	0.794	0.706	0.606	0.500
3	0.993	0.942	0.883	0.831	0.793	0.760	0.733	0.710	0.691	0.674	0.605	0.515	0.423	0.333
4	0.967	0.864	0.781	0.711	0.676	0.641	0.612	0.589	0.570	0.553	0.488	0.405	0.325	0.250
5	0.927	0.788	0.693	0.632	0.587	0.553	0.525	0.503	0.485	0.469	0.409	0.335	0.264	0.200
6	0.882	0.721	0.625	0.563	0.519	0.486	0.460	0.440	0.422	0.408	0.352	0.285	0.222	0.166
7	0.837	0.664	0.568	0.508	0.465	0.434	0.410	0.391	0.375	0.361	0.310	0.249	0.192	0.142
8	0.794	0.615	0.520	0.462	0.422	0.393	0.370	0.352	0.337	0.324	0.277	0.221	0.170	0.125
9	0.754	0.572	0.481	0.425	0.387	0.359	0.337	0.320	0.306	0.295	0.251	0.199	0.152	0.111
10	0.717	0.535	0.446	0.393	0.357	0.330	0.310	0.294	0.251	0.270	0.281	0.181	0.137	0.100

Tabla 5. VALORES F DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

1 - $\alpha = 0,95$ v_1 = grados de libertad del numerador
 1 - $\alpha = P (F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$ v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.968	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949	246.466	246.917	247.324	247.688	248.016
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.433	19.437	19.440	19.443	19.446
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.692	8.683	8.675	8.667	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.844	5.832	5.821	5.811	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.604	4.590	4.579	4.568	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.922	3.908	3.896	3.884	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.494	3.480	3.467	3.455	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.202	3.187	3.173	3.161	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.989	2.974	2.960	2.948	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.828	2.812	2.798	2.785	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.701	2.685	2.671	2.658	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.599	2.583	2.568	2.555	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.515	2.499	2.484	2.471	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.445	2.428	2.413	2.400	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.055	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.385	2.368	2.353	2.340	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.333	2.317	2.302	2.288	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353	2.329	2.308	2.289	2.272	2.257	2.243	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.575	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.250	2.233	2.217	2.203	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.542	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.215	2.198	2.182	2.168	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.184	2.167	2.151	2.137	2.124
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.156	2.139	2.123	2.109	2.096
22	4.301	3.443	3.048	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.131	2.114	2.098	2.084	2.071
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.109	2.091	2.075	2.061	2.048
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.620	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.088	2.070	2.054	2.040	2.027
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.196	2.165	2.136	2.111	2.089	2.069	2.051	2.035	2.021	2.007
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	2.052	2.034	2.018	2.003	1.990
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	2.036	2.018	2.002	1.987	1.974
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	2.021	2.003	1.987	1.972	1.959
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	2.007	1.989	1.973	1.958	1.945
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.995	1.976	1.960	1.945	1.932
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.904	1.885	1.868	1.853	1.839
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.850	1.831	1.814	1.798	1.784
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.815	1.796	1.778	1.763	1.748
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969	1.928	1.893	1.863	1.836	1.812	1.790	1.771	1.753	1.737	1.722
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.772	1.752	1.734	1.718	1.703
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938	1.897	1.861	1.830	1.803	1.779	1.757	1.737	1.720	1.703	1.688
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.746	1.726	1.708	1.691	1.676
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878	1.837	1.801	1.769	1.742	1.717	1.694	1.674	1.656	1.639	1.623
500	3.860	3.014	2.623	2.390	2.232	2.117	2.028	1.957	1.899	1.850	1.808	1.772	1.740	1.712	1.686	1.664	1.643	1.625	1.607	1.592
1000	3.851	3.005	2.614	2.381	2.223	2.108	2.019	1.948	1.889	1.840	1.798	1.762	1.730	1.702	1.676	1.654	1.633	1.614	1.597	1.581

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.

Tabla 5. VALORES F DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

1 - $\alpha = 0.975$ v_1 = grados de libertad del numerador
 1 - $\alpha = P (F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$ v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	647.793	799.482	864.151	899.599	921.835	937.114	948.203	956.643	963.279	968.634	973.028	976.725	979.839	982.545	984.874	986.911	988.715	990.345	991.800	993.081
2	38.506	39.000	39.166	39.248	39.298	39.331	39.356	39.373	39.387	39.398	39.407	39.415	39.421	39.427	39.431	39.436	39.439	39.442	39.446	39.448
3	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624	14.540	14.473	14.419	14.374	14.337	14.305	14.277	14.253	14.232	14.213	14.196	14.181	14.167
4	12.218	10.649	9.979	9.604	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.794	8.751	8.715	8.684	8.657	8.633	8.611	8.592	8.575	8.560
5	10.007	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.568	6.525	6.488	6.456	6.428	6.403	6.381	6.362	6.344	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.410	5.366	5.329	5.297	5.269	5.244	5.222	5.202	5.184	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.709	4.666	4.628	4.596	4.568	4.543	4.521	4.501	4.483	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.243	4.200	4.162	4.130	4.101	4.076	4.054	4.034	4.016	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.912	3.868	3.831	3.798	3.769	3.744	3.722	3.701	3.683	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.665	3.621	3.583	3.550	3.522	3.496	3.474	3.453	3.435	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.474	3.430	3.392	3.359	3.330	3.304	3.282	3.261	3.243	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.321	3.277	3.239	3.206	3.177	3.152	3.129	3.108	3.090	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.197	3.153	3.115	3.082	3.053	3.027	3.004	2.983	2.965	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.095	3.050	3.012	2.979	2.949	2.923	2.900	2.879	2.861	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	3.008	2.963	2.925	2.891	2.862	2.836	2.813	2.792	2.773	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.934	2.889	2.851	2.817	2.788	2.761	2.738	2.717	2.698	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.870	2.825	2.786	2.753	2.723	2.697	2.673	2.652	2.633	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.814	2.769	2.730	2.696	2.667	2.640	2.617	2.596	2.576	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.765	2.720	2.681	2.647	2.617	2.591	2.567	2.546	2.526	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.721	2.676	2.637	2.603	2.573	2.547	2.523	2.501	2.482	2.464
21	5.827	4.420	3.819	3.475	3.250	3.090	2.969	2.874	2.798	2.735	2.682	2.637	2.598	2.564	2.534	2.507	2.483	2.462	2.442	2.425
22	5.786	4.383	3.783	3.440	3.215	3.055	2.934	2.839	2.763	2.700	2.647	2.602	2.563	2.528	2.498	2.472	2.448	2.426	2.407	2.389
23	5.750	4.349	3.750	3.408	3.183	3.023	2.902	2.808	2.731	2.668	2.615	2.570	2.531	2.497	2.466	2.440	2.416	2.394	2.374	2.357
24	5.717	4.319	3.721	3.379	3.155	2.995	2.874	2.779	2.703	2.640	2.586	2.541	2.502	2.468	2.437	2.411	2.386	2.365	2.345	2.327
25	5.686	4.291	3.694	3.353	3.129	2.969	2.848	2.753	2.677	2.613	2.560	2.515	2.476	2.441	2.411	2.384	2.360	2.338	2.318	2.300
26	5.659	4.265	3.670	3.329	3.105	2.945	2.824	2.729	2.653	2.590	2.536	2.491	2.452	2.417	2.387	2.360	2.335	2.314	2.294	2.276
27	5.633	4.242	3.647	3.307	3.083	2.923	2.802	2.707	2.631	2.568	2.514	2.469	2.429	2.395	2.364	2.337	2.313	2.291	2.271	2.253
28	5.610	4.221	3.626	3.286	3.063	2.903	2.782	2.687	2.611	2.547	2.494	2.448	2.409	2.374	2.344	2.317	2.292	2.270	2.251	2.232
29	5.588	4.201	3.607	3.267	3.044	2.884	2.763	2.668	2.592	2.529	2.475	2.430	2.390	2.355	2.325	2.298	2.273	2.251	2.231	2.213
30	5.568	4.182	3.589	3.250	3.026	2.867	2.746	2.651	2.575	2.511	2.458	2.412	2.372	2.338	2.307	2.280	2.255	2.233	2.213	2.195
40	5.424	4.051	3.463	3.126	2.904	2.744	2.624	2.529	2.452	2.388	2.334	2.288	2.248	2.213	2.182	2.154	2.129	2.107	2.086	2.068
50	5.340	3.975	3.390	3.054	2.833	2.674	2.553	2.458	2.381	2.317	2.263	2.216	2.176	2.140	2.109	2.081	2.056	2.033	2.012	1.993
60	5.286	3.925	3.343	3.008	2.786	2.627	2.507	2.412	2.334	2.270	2.216	2.169	2.129	2.093	2.061	2.033	2.008	1.985	1.964	1.944
70	5.247	3.890	3.309	2.975	2.754	2.595	2.474	2.379	2.302	2.237	2.183	2.136	2.095	2.059	2.028	1.999	1.974	1.950	1.929	1.910
80	5.218	3.864	3.284	2.950	2.730	2.571	2.450	2.355	2.277	2.213	2.158	2.111	2.071	2.035	2.003	1.974	1.948	1.925	1.904	1.884
90	5.196	3.844	3.265	2.932	2.711	2.552	2.432	2.336	2.259	2.194	2.140	2.092	2.051	2.015	1.983	1.955	1.929	1.905	1.884	1.864
100	5.179	3.828	3.250	2.917	2.696	2.537	2.417	2.321	2.244	2.179	2.124	2.077	2.036	2.000	1.968	1.939	1.913	1.890	1.868	1.849
200	5.100	3.758	3.182	2.850	2.630	2.472	2.351	2.256	2.178	2.113	2.058	2.010	1.969	1.932	1.900	1.870	1.844	1.820	1.798	1.778
500	5.054	3.716	3.142	2.811	2.592	2.434	2.313	2.217	2.139	2.074	2.019	1.971	1.929	1.892	1.859	1.830	1.803	1.779	1.757	1.736
1000	5.039	3.703	3.129	2.799	2.581	2.423	2.302	2.206	2.128	2.063	2.008	1.960	1.918	1.881	1.848	1.819	1.792	1.768	1.746	1.725

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.

Áreas acumuladas de la distribución T-STUDENT

1. ¿Cómo se usa la tabla de la distribución T-STUDENT para averiguar $t_{1-\alpha/2, v}$?

Supongamos un riesgo del 5% (o un nivel de confianza del 95%), $\alpha=0.05$, y grados de libertad $v=10$. Utilizaremos $\alpha/2$ ya que dejamos el mismo espacio correspondiente a la región de rechazo por ambos lados. ¿Cuál es el valor, pues, de $t_{0,975,10}$? Se busca la intersección y el resultado es **2.228**. Éste es el valor crítico para rechazar la hipótesis alternativa.

v	0,6	0,75	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9975	0,999	0,9995
1	0,325	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	127,321	318,289	636,578
2	0,289	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	22,328	31,600
3	0,277	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,214	12,924
4	0,271	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,267	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,894	6,869
6	0,265	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,263	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,262	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,261	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,260	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,260	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,259	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,259	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,258	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,258	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,258	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,257	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,257	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,257	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,257	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,257	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,256	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,256	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768
24	0,256	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,256	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,256	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,256	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,689
28	0,256	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,256	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,660
30	0,256	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
40	0,255	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
60	0,254	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,232	3,460
120	0,254	0,677	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,160	3,373
∞	0,253	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,290

