

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (UPLC) PARA LA VALORACIÓN DE KETOROLACO TROMETAMINA EN COMPRIMIDOS RECUBIERTOS DE 20MG SEGÚN LINEAMIENTOS USP

AUTOR:

LLERENA CHÉVEZ INGRID PAMELA

Guayaquil - Ecuador

2026

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad verificar la idoneidad de un método analítico por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) para la cuantificación de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, frente a la necesidad de evidenciar su equivalencia con el método oficial descrito en la USP tras la migración desde HPLC. Se planteó como objetivo demostrar que el procedimiento adaptado satisface los criterios de desempeño establecidos para precisión, exactitud, linealidad, especificidad e incertidumbre de medición, conforme a los lineamientos de USP. La metodología correspondió a una investigación aplicada de carácter experimental en laboratorio, en la que se evaluaron los parámetros analíticos mediante herramientas estadísticas como regresión lineal, ANOVA y cálculo de %RSD. Los resultados evidenciaron coeficientes de determinación mayores a 0,99, valores de precisión con %RSD inferiores al 2 %, recuperaciones dentro del rango de 98 % a 102 %, ausencia de interferencias y una incertidumbre expandida de $\pm 1,38$ % ($k=2$), considerada aceptable. En consecuencia, el método UPLC demostró ser equivalente al procedimiento farmacopeico y adecuado para su uso rutinario en el control de calidad.

Palabras clave: UPLC, Ketorolaco Trometamina, verificación analítica, incertidumbre de medición, control de calidad.

ABSTRACT

The present study aimed to verify the suitability of an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) analytical method for the quantification of Ketorolac Tromethamine in 20 mg film-coated tablets, addressing the need to demonstrate its equivalence to the official USP method after migration from HPLC. The objective was to confirm that the adapted procedure meets the established performance criteria for precision, accuracy, linearity, specificity, and measurement uncertainty, in accordance with USP. The methodology consisted of an applied experimental laboratory study in which analytical parameters were evaluated using statistical tools such as linear regression, ANOVA, and %RSD calculation. The results showed determination coefficients greater than 0.99, precision values with %RSD below 2%, recoveries within the 98%–102% range, absence of interferences, and an expanded uncertainty of $\pm 1.38\%$ ($k=2$), considered acceptable. Therefore, the UPLC method proved to be equivalent to the pharmacopeial procedure and suitable for routine application in quality control.

Keywords: UPLC, Ketorolac Tromethamine, analytical verification, measurement uncertainty, quality control.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, por darme sabiduría, perseverancia y la oportunidad de culminar esta etapa tan importante en mi vida.

A mis padres, por su amor incondicional y sus consejos, sobre todo, a mi madre que es mi motivación cada día. Este logro también es suyo, porque han sido el pilar fundamental que me sostuvo en los momentos más difíciles y la inspiración para seguir adelante.

A mis hermanos y amigos, por su apoyo, paciencia y confianza en mí, incluso cuando yo mismo dudaba. Su compañía y palabras de aliento fueron esenciales para alcanzar esta meta.

A todas las personas que creyeron en mí y formaron parte de este proceso, gracias por cada enseñanza y cada impulso para no rendirme.

Con gratitud y orgullo, dedico este trabajo como reflejo del esfuerzo y la constancia que hicieron posible este sueño.

AGRADECIMIENTO

A mis padres y familia, por su apoyo incondicional, comprensión y motivación constante. A mis docentes y tutor, por su guía académica, paciencia y valiosas enseñanzas, que contribuyeron significativamente al desarrollo de esta investigación y a mi formación profesional.

De manera especial, manifiesto mi profundo agradecimiento al laboratorio farmacéutico que facilitó el uso de sus instalaciones, equipos y recursos analíticos para la ejecución experimental de este trabajo. Su apertura, colaboración y acompañamiento técnico fueron fundamentales para el desarrollo adecuado de la investigación.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, directa o indirectamente, aportaron con su apoyo y orientación para hacer posible la culminación de este proyecto.

Declaración Expresa

Yo Ingrid Pamela Llerena Chévez acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. El o los estudiantes deberán procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autores/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 31 de marzo del 2026.

Autor: Ingrid Pamela
Llerena Chévez

EVALUADORES

Cesar Augusto Araque Molina, Ph.D.

TUTOR

Michael Guillermo Rendón Morán, MS.c.

EVALUADOR

Joel Vielma Puente, Ph.D.

PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

USP: United States Pharmacopeia

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

ICH: Consejo Internacional de armonización

ISO: Organización Internacional de Normalización

RC: Celulosa regenerada

ANOVA: Analysis of Variance, que en español se traduce como Análisis de Varianza, este método estadístico se llama así porque analiza las fuentes de variación en un conjunto de datos para determinar si las diferencias entre las medias de varios grupos son estadísticamente significativas o si simplemente se deben al azar.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RSD: Desviación estándar relativa.

DS: Desviación estándar

tR: Tiempo de retención

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Descripción del problema	4
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivo específico.....	6
1.4. Hipótesis.....	6
1.5. Alcance.....	6
CAPÍTULO 2.....	8
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Fundamentos del Control de Calidad Farmacéutico	8
2.1.1. Importancia de la Valoración Cuantitativa en Medicamentos	8
2.1.2. Rol de las Farmacopeas Oficiales en el Aseguramiento de Calidad. 10	
2.1.3. Normativas Internacionales Aplicables (USP, ICH, ISO/IEC 17025) 11	
2.1.3.1. USP (United States Pharmacopeia).....	11
2.1.3.2. ICH (International Council for Harmonisation).....	11
2.1.3.3. ISO/IEC 17025:2017	12
2.2. Ketorolaco Trometamina: Caracterización y Relevancia Terapéutica	12
2.2.1. Propiedades Físicoquímicas del Ketorolaco Trometamina	13
2.2.2. Mecanismo de Acción y Aplicaciones Clínicas	14
2.2.3. Especificaciones Farmacopeicas para Comprimidos de 20 mg	14
2.3. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UPLC).....	15
2.3.1. Principio de separación cromatográfica	15
2.3.2. Diferencias entre HPLC y UPLC: Eficiencia y Resolución	16
2.3.3. Componentes del Sistema UPLC y Parámetros Críticos	17
2.3.3.1. Sistema de bombeo y condiciones de presión.....	18
2.3.3.2. Sistema de inyección de muestra	18
2.3.3.3. Detector	18
2.3.3.4. Columna cromatográfica.....	19
2.3.4. Aplicaciones del UPLC en el análisis de fármacos.	19
2.4. Verificación de Métodos Analíticos.....	21

2.4.1.	Definición y Alcance de la Verificación según USP <1226>	21
2.4.2.	Diferencias entre Verificación y Validación	21
2.4.3.	Condiciones del Laboratorio y su Impacto en el Desempeño Analítico	22
2.4.4.	Criterios de Aceptación Farmacopeicos para Métodos Verificados ..	23
2.5.	Evaluación de Parámetros de Desempeño Analítico.....	25
2.5.1.	Precisión: Repetibilidad e Intermedia.....	25
2.5.2.	Exactitud: Estudios de Recuperación	25
2.5.3.	Linealidad: Curva de Calibración y Rango de Trabajo.....	26
2.5.4.	Especificidad: Discriminación frente a Excipientes e Impurezas.....	27
2.5.5.	Robustez y Aptitud del Sistema	27
2.6.	Estimación de la Incertidumbre de Medición	28
2.6.1.	Fundamentos Metrológicos y Relevancia en Ensayos Farmacéuticos	29
2.6.2.	Fuentes de Incertidumbre en Procedimientos Cromatográficos	30
2.6.3.	Metodología de Cálculo	31
2.6.4.	Impacto de la Incertidumbre en la Toma de Decisiones Analíticas...	34
2.7.	Ajustes Cromatográficos Permitidos según USP	34
2.7.1.	Cambios en Fase Estacionaria y Tamaño de Partícula	35
2.7.2.	Justificación de Ajustes en Flujo y Geometría de Columna	35
2.7.3.	Evaluación de Equivalencia Analítica y Selectividad	37
CAPÍTULO 3.....		38
3.	METODOLOGÍA.....	38
3.1.	Enfoque de la investigación.....	38
3.1.1.	Tipo de investigación	38
3.2.	Metodología.....	38
3.2.1.	Variables.....	38
3.2.2.	Diseño experimental	39
3.2.3.	Recolección de datos.....	39
CAPÍTULO 4.....		58
4.	RESULTADOS	58
4.1.	Equivalencia analítica del método UPLC frente a la USP: condiciones, preparación y criterios de aceptación	58
4.2.	Desempeño metrológico del método UPLC: precisión, exactitud, linealidad y especificidad	60
4.2.1.	Especificidad.....	60
4.2.2.	Linealidad	62
4.2.3.	Precisión	66
4.2.4.	Exactitud	71

4.3. Incertidumbre de medición del procedimiento UPLC: fuentes de variabilidad y cuantificación	72
4.3.1. Cálculo de la incertidumbre de medición	72
4.3.2. Análisis de la incertidumbre de medición frente a investigaciones publicadas.	74
CAPÍTULO 5.....	76
5.1. CONCLUSIONES.....	76
5.2. RECOMENDACIONES	77
6. Referencias	78
7. Apéndices y anexos	84
7.1. Apéndice A: Equivalencia del método UPLC con los lineamientos de la USP	84
7.2. Apéndice B: Cromatogramas pertenecientes a solución estándar y solución placebo (sin activo)	86
7.3. Apéndice C: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la linealidad del sistema.....	87
7.4. Apéndice D: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la linealidad del método	90
7.5. Apéndice E: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la precisión intermedia	94
7.6. Apéndice F: Incertidumbre de la medición	97

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Formula química del Ketorolaco Trometamina (Pawar et al., 2022).....	13
Figura 2.2 The ACQUITY UPLC System.....	17
Figura 2.3 Diagrama Ishikawa con los factores que influyen en el cálculo de incertidumbre.....	32
Figura 3.1 Diagrama de flujo general del procedimiento analítico de valoración de Ketorolaco Trometamina	42
Figura 4.1 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del sistema.	63
Figura 4.2 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del método.....	64
Figura C.1 Gráfica de regresión lineal de la linealidad del sistema.	87
Figura C.2 Gráfica de residuos para las áreas obtenidas en la linealidad del sistema. .	88
Figura C.3 Residuos vs áreas	88
Figura C.4 Gráfica de probabilidad de residuos	89
Figura C.5 Gráfica de corrida de residuos.....	89
Figura D.1 Gráfica de regresión lineal de la linealidad del método.....	91
Figura D.2 Gráfica de residuos para las áreas obtenidas en la linealidad del método ..	91
Figura D.3 Residuos vs áreas	92
Figura D.4 Gráfica de probabilidad de residuos	92
Figura D.5 Gráfica de corridas de residuos	93
Figura E. 1 Gráfica de intervalos de muestra vs analista.	94
Figura E.2 Gráfica de ANOVA de un solo factor para analista A, B y C.	95
Figura E.3 Gráfica de probabilidad de analista A	95
Figura E.4 Gráfica de probabilidad de analista B	96
Figura E.5 Gráfica de probabilidad de analista C	96
Figura F.1 Diagrama Ishikawa de las fuentes que afectan a la incertidumbre de medición en el análisis de determinación de Ketorolaco trometamina	97
Figura F.2 Certificado de análisis del estándar de Ketorolaco trometamina.....	97

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Comparación de las técnicas analíticas HPLC vs UPLC (Sahani & Wakode, 2018)	17
Tabla 2. 2 Diferencias principales entre Validación y Verificación (USP, 2025)	22
Tabla 3.1 Descripción de las Variables	39
Tabla 3.2 Niveles de concentración para la linealidad del sistema.....	45
Tabla 3.3 Niveles de concentración para a linealidad del método	47
Tabla 3.4 Criterios de decisión a cada parámetro de verificación	56
Tabla 4.1 Tabla de los cambios entre el método farmacopeico y el método verificado ajustado a los lineamientos farmacopeicos	59
Tabla 4.2 Resultados del parámetro de selectividad del método UPLC	61
Tabla 4.3 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del sistema.	62
Tabla 4.4 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la linealidad del sistema.....	63
Tabla 4.5 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del método.....	63
Tabla 4.6 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la linealidad del método.	64
Tabla 4.7 Resultados de las recuperaciones obtenidas en el análisis de repetibilidad.	67
Tabla 4.8 Resultados de las recuperaciones obtenidas en el análisis de precisión intermedia entre analistas y en diferentes días.	68
Tabla 4.9 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la precisión intermedia.	68
Tabla 4.10 Resultados obtenidos en la prueba de normalidad de los analistas A, B y C.	69
Tabla 4.11 Resultados obtenidos en el análisis de exactitud.	71
Tabla 4.12 Tabla de Componentes y fuentes de incertidumbre	72
Tabla 7.1 Resumen del modelo.....	87
Tabla 7.2 Análisis de Varianza	87
Tabla 7.3 Tabla de resultados Linealidad del método	90
Tabla 7.4 Tabla de Resumen del modelo.....	90
Tabla 7.5 Tabla de Resultados Análisis de Varianza	90
Tabla 7.6 Tabla de Resultados de Análisis de Varianza	94
Tabla 7.7 Tabla de Medias obtenidas de la precisión intermedia	94
Tabla 7.8 Resumen del modelo.....	94

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La valoración cuantitativa de principios activos es un proceso esencial en el control de calidad farmacéutico, pues asegura la potencia y seguridad de los medicamentos. Para Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, la USP establece métodos cromatográficos que garantizan el cumplimiento de especificaciones oficiales. La creciente adopción de tecnologías UPLC permite mejorar la eficiencia analítica mediante tiempos de corrida más cortos, mayor resolución y menor consumo de solventes. Sin embargo, al reemplazar procedimientos HPLC por UPLC, es necesario verificar la equivalencia analítica del método adaptado para asegurar que mantiene el desempeño requerido por la normativa vigente.

La verificación de un método UPLC derivado de la monografía USP requiere confirmar su aptitud bajo las condiciones reales del laboratorio. Según USP, deben evaluarse parámetros como precisión, exactitud, linealidad, especificidad y aptitud del sistema, demostrando que el procedimiento mantiene su capacidad para generar resultados confiables. Adicionalmente, la International Organization for Standardization e International Electrotechnical Commission (2017) exige considerar la incertidumbre de medición, integrando variabilidad instrumental, preparación de soluciones y condiciones ambientales. Este enfoque asegura que el método adaptado cumpla criterios técnicos mínimos para su uso rutinario en la valoración de productos farmacéuticos.

El presente proyecto tiene como objetivo verificar el método UPLC utilizado para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos de 20 mg, asegurando su equivalencia con los requisitos establecidos en la USP. Para ello se realizarán estudios de linealidad, precisión intermedia, exactitud, especificidad y aptitud del sistema, empleando condiciones experimentales controladas. También se realizará la estimación de la incertidumbre de medición siguiendo lineamientos EURACHEM, identificando las principales fuentes de variabilidad.

1.1. Antecedentes

El Ketorolaco Trometamina es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente utilizado para el manejo del dolor agudo, disponible en diversas formas farmacéuticas como comprimidos, inyectables, aerosol nasal y solución oftálmica. La correcta dosificación y pureza del principio activo en los medicamentos son fundamentales para garantizar su eficacia terapéutica y seguridad, por lo que la determinación cuantitativa en productos terminados es un paso crítico dentro del control de calidad farmacéutico (Orosco, 2022).

Las farmacopeas oficiales, en particular la United States Pharmacopeia (USP), establecen métodos estandarizados para la valoración del Ketorolaco Trometamina, basados principalmente en técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Según la USP 42, el contenido del principio activo en comprimidos debe estar entre 90% y 110% del valor declarado para asegurar la calidad del producto (Soto Coaquira, 2016).

Diversos estudios han demostrado la aplicabilidad y confiabilidad de la cromatografía líquida para la identificación y cuantificación del Ketorolaco Trometamina en diferentes formulaciones, confirmando que los productos comerciales y genéricos cumplen con los criterios farmacopeicos. Además, se han desarrollado métodos acoplados a espectrometría de masas para mejorar la especificidad y sensibilidad en matrices complejas (Orosco, 2022).

En un estudio realizado por Caiza López (2022), se realizó una comparación de métodos UPLC y HPLC para el análisis de hidroclorotiazida y valsartán en tabletas, demostrando que la técnica de UPLC representa una alternativa analítica robusta y eficiente para la determinación de estos activos en formas farmacéuticas sólidas. La implementación del método requirió una optimización de las condiciones cromatográficas originales, específicamente mediante la modificación de la química de la columna y el ajuste en la composición de la fase móvil, lo cual permitió mejorar la eficiencia del sistema y obtener una resolución cromatográfica adecuada de ambos analitos. Entre los parámetros realizados fueron: especificidad, linealidad exactitud, precisión, robustez y límite de detección y cuantificación para ambos métodos cromatográficos.

Asimismo, en un estudio realizado por Soledispa et al. (2024) mostraron una comparación entre los métodos cromatográficos UPLC y HPLC aplicados a la

cuantificación de atorvastatina en tabletas y se evidenció que ambos procedimientos presentan alta precisión y exactitud. Aunque el método UPLC mostró una exactitud ligeramente superior (0,80%) en comparación con HPLC, ambos se mantuvieron dentro de los límites aceptables establecidos por la normativa. El análisis estadístico, que incluyó el coeficiente de variación, pruebas de concordancia y el test de Student, permitió concluir que ambos métodos son equivalentes en cuanto a desempeño analítico. Esta evaluación proporciona evidencia sólida sobre la validez de ambas técnicas para su uso en el control de calidad, cumpliendo con los criterios exigidos por la USP o metodologías equivalentes.

Otro ejemplo es una investigación de Márquez (2018), donde se validó un método por UPLC para determinación de ácido acetilsalicílico en tabletas de 100 mg, evaluando especificidad, linealidad ($r^2 > 0.999$), precisión (RSD de repetibilidad 0,64% y precisión intermedia 0,89%), exactitud (recuperación 100,06%) y robustez. Esos resultados obtenidos cumplen con los requisitos de validación, garantizando confiabilidad y reproducibilidad con evaluación indirecta de incertidumbre metodológica.

Además, Toro (2024) en una revisión de parámetros de validación para un principio activo por HPLC, aplica un tratamiento estadístico que abarca prueba de Student para evaluar precisión y exactitud, y se mencionan directrices de la EURACHEM para validación. Esta revisión muestra la correcta metodología para comparar métodos analíticos y garantizar su equivalencia con procedimientos oficiales (USP) a través de análisis estadísticos aplicados.

Finalmente, la norma ISO/IEC 17025:2017 resalta la importancia de estimar y reportar la incertidumbre de medición en los ensayos analíticos para garantizar trazabilidad y comparabilidad de resultados, aspecto que debe incorporarse en la validación o verificación del método para asegurar la confiabilidad y calidad del medicamento.

El presente proyecto propone soluciones prácticas y actualizadas, la eficiencia de los procesos analíticos al migrar de un método de HPLC a UPLC siendo lo más equivalente a USP, además se enfoca en la reducción de errores y confiabilidad de resultados ya que incluirá, además, una evaluación rigurosa de la incertidumbre de medición.

En conclusión, el estado actual del arte muestra que la valoración cuantitativa de Ketorolaco Trometamina en comprimidos está bien establecida mediante métodos HPLC

según la USP, y que la transición hacia técnicas UPLC debe estar sustentada en una verificación exhaustiva que garantice equivalencia analítica, precisión, exactitud, especificidad y control de incertidumbre, asegurando así la calidad y seguridad del producto farmacéutico final.

1.2. Descripción del problema

La determinación cuantitativa del principio activo en medicamentos es un proceso esencial dentro del control de calidad, ya que asegura tanto la eficacia terapéutica como la seguridad del paciente. Las farmacopeas oficiales, como la United States Pharmacopeia (USP), proporcionan metodologías estandarizadas ampliamente aceptadas para evaluar la concentración de principios activos en productos farmacéuticos terminados. En el caso específico de los comprimidos recubiertos de 20 mg de Ketorolaco Trometamina, es fundamental para realizar una valoración precisa para cumplir con los requisitos establecidos por la farmacopea y las normativas regulatorias nacionales e internacionales. No obstante, diversos factores pueden influir en la confiabilidad del ensayo de valoración, incluyendo la exactitud de los equipos de medición, la correcta manipulación del material volumétrico, la pureza de los reactivos utilizados y la consistencia en la aplicación del procedimiento analítico (Orosco, 2022).

El Ketorolaco Trometamina, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) utilizado en el tratamiento del dolor agudo, debe cumplir con especificaciones estrictas de contenido y pureza para asegurar su acción terapéutica y minimizar efectos adversos. Según la USP, el método oficial para su valoración en formas farmacéuticas orales se basa en técnicas cromatográficas, específicamente la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Sin embargo, con la evolución tecnológica, muchos laboratorios han adoptado sistemas de cromatografía líquida de ultra alta resolución, que ofrecen ventajas como menor tiempo de análisis, mayor resolución y menor consumo de disolventes (Orosco, 2022).

No obstante, la implementación de métodos equivalentes en tecnologías diferentes a las descritas en la farmacopea exige la verificación del procedimiento analítico. Esta verificación, de acuerdo con la USP <1226> y la guía ICH Q2(R1), debe confirmar que el método adaptado conserva su capacidad para proporcionar resultados confiables, precisos y específicos bajo las condiciones del laboratorio que lo aplica. La ausencia de

esta verificación podría comprometer la validez de los resultados analíticos y, por ende, la calidad del medicamento fabricado. (ISO e IEC, 2017)

Adicionalmente, la falta de un cálculo riguroso de la incertidumbre asociada a estos factores compromete la confiabilidad de los resultados analíticos y, por ende, la garantía de calidad del medicamento. Según la norma ISO e IEC (2017), es imprescindible que los laboratorios de ensayo estimen y reporten la incertidumbre de sus mediciones para asegurar la trazabilidad y la comparabilidad de los resultados (ISO e IEC, 2017).

Es por esto por lo que, en base a lo planteado se tiene la siguiente interrogante:

¿El método basado en cromatografía líquida (UPLC) implementado para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg cumple con los criterios de desempeño establecidos por la farmacopea USP en cuanto a precisión, exactitud, linealidad, especificidad e incertidumbre de medición?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Verificar la adecuación de un método basado en cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, asegurando el cumplimiento de los lineamientos establecidos por la farmacopea USP.

1.3.2. Objetivo específico

1. Comparar las condiciones analíticas del método UPLC implementado con las especificadas en la farmacopea USP, incluyendo parámetros cromatográficos, preparación de soluciones y criterios de aceptación.
2. Evaluar la precisión, exactitud, linealidad y especificidad del método UPLC mediante análisis estadísticos de muestras preparadas en diferentes concentraciones y condiciones operativas.
3. Determinar la incertidumbre asociada al procedimiento analítico verificado, identificando las principales fuentes de variabilidad y cuantificándolas de acuerdo con las directrices del EURACHEM.

1.4. Hipótesis

La verificación del método analítico en cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), adaptado y validado conforme a los lineamientos de la USP, cumple con los requisitos establecidos para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, proporcionando resultados precisos, exactos, lineales y específicos, con una incertidumbre de medición controlada y dentro de los límites aceptados por la normativa internacional.

1.5. Alcance

El presente estudio tiene como alcance la verificación del método analítico basado en cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) para la valoración cuantitativa de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, conforme a los lineamientos establecidos por la United States Pharmacopeia (USP).

La verificación se desarrollará bajo las condiciones reales del laboratorio de control de calidad, considerando el desempeño del personal, la calibración y trazabilidad de los equipos, la calidad de los reactivos y materiales de referencia, así como las condiciones ambientales y operativas que puedan influir en el comportamiento del método.

El estudio abarcará la evaluación de los parámetros de desempeño analítico requeridos para métodos farmacopeicos, incluyendo precisión (repetibilidad e intermedia), exactitud mediante recuperaciones, linealidad en el rango analítico definido, especificidad frente a excipientes y aptitud del sistema según USP <621>. Adicionalmente, se realizará la estimación de la incertidumbre de medición siguiendo las directrices de EURACHEM, identificando y cuantificando las fuentes de variabilidad asociadas al procedimiento. El alcance incluye también la justificación de los ajustes cromatográficos empleados durante la adaptación del método HPLC de la USP a tecnología UPLC, asegurando la equivalencia analítica. El estudio no contempla el desarrollo ni la validación completa del método ni la evaluación de matrices distintas, siendo su duración estimada es de seis meses.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentos del Control de Calidad Farmacéutico

Como fundamento principal el control de calidad farmacéutico es un conjunto de actividades dirigidas a la verificación del cumplimiento de las especificaciones de los medicamentos que están establecidas para garantizar su seguridad, potencia, pureza, identidad y eficacia terapéutica cuando se administren. Con el fin de garantizar que cada lote producido sea apto para el consumo humano, el control de calidad incluye técnicas analíticas validadas, aseguramiento documental y cumplimiento normativo estricto (Aulton y Taylor, 2017).

Allen y Ansel (2020) subrayan que la confiabilidad de los resultados analíticos es fundamental para asegurar la reproducibilidad de lotes y la uniformidad terapéutica de los medicamentos. En la industria farmacéutica, el control de calidad es un pilar crítico del sistema de gestión de calidad, responsable de identificar desviaciones en materias primas, procesos intermedios y productos terminados, lo que permite implementar acciones correctivas oportunas. Los métodos analíticos empleados, incluyendo pruebas de identificación, valoración cuantitativa, ensayos de disolución y determinación de impurezas, se basan en procedimientos validados y estandarizados de acuerdo con farmacopeas internacionales (USP, EP, JP) y cumplen con las directrices regulatorias de organismos como la ICH (International Council for Harmonisation) y la ISO (International Organization for Standardization).

De la misma manera, es indispensable que los laboratorios de control de calidad demuestren competencia técnica mediante la adopción de sistemas de gestión como ISO/IEC 17025, lo cual garantiza trazabilidad, estimación de incertidumbre y control sistemático de equipos, reactivos y condiciones de ensayo (Ellison, 2020).

2.1.1. Importancia de la Valoración Cuantitativa en Medicamentos

La valoración cuantitativa del principio activo es un componente crítico del control de calidad farmacéutico, ya que garantiza que la concentración del fármaco en el producto terminado se encuentre dentro de los límites establecidos para asegurar su eficacia terapéutica, seguridad y consistencia entre lotes. Durante los últimos años, los avances en tecnologías analíticas, así como el fortalecimiento regulatorio internacional, han reforzado la relevancia de este ensayo dentro de la industria farmacéutica. Dentro de las importancias, algunas de las más relevantes se detallan a continuación:

➤ **Garantía de Eficacia y Seguridad Terapéutica**

La determinación cuantitativa del principio activo en los medicamentos constituye una de las evaluaciones analíticas más relevantes dentro del control de calidad, pues garantiza que la cantidad indicada en el etiquetado coincida con el contenido declarado del producto. Actualmente, tanto las entidades regulatorias como las farmacopeas enfatizan la importancia de aplicar métodos analíticos robustos, exactos y con adecuada trazabilidad, motivadas por la creciente complejidad de las formulaciones farmacéuticas y por el aumento de desviaciones respecto a las especificaciones oficiales en productos disponibles en el mercado (OMS, 2011).

➤ **Relevancia clínica y terapéutica**

La Farmacopea Española, indica que la determinación cuantitativa permite verificar que el medicamento contiene la potencia necesaria para ejercer su acción farmacológica. Además, estudios iberoamericanos recientes señalan que la subdosificación puede aumentar la resistencia antimicrobiana, mientras que la sobredosificación incrementa la toxicidad, especialmente en medicamentos de margen terapéutico estrecho. Por ellos, una concentración incorrecta del principio activo puede producir fallas terapéuticas o efectos adversos graves (OMS, 2011)

➤ **Aseguramiento del proceso de manufactura**

La valoración cuantitativa también es un control crítico del proceso de producción. Esta prueba permite detectar variaciones en mezcla, compresión y recubrimiento que podrían no ser visibles mediante inspección física. En formas sólidas, la uniformidad del contenido depende directamente del control estadístico de la valoración del principio activo (OMS, 2011).

➤ **Cumplimiento regulatorio y aceptación internacional**

Desde 2019, organismos como ANMAT (Argentina), INVIMA (Colombia), COFEPRIS (México) y DIGEMID (Perú) han reforzado los requerimientos de métodos analíticos sólidos, alineados con ICH Q2(R1) y las farmacopeas oficiales. La valoración cuantitativa es una prueba obligatoria para:

- Registro sanitario
- Liberación de lotes
- Estudios de estabilidad
- Certificaciones GMP

➤ **Evaluación de estabilidad del principio activo**

Los estudios de estabilidad requieren cuantificar el fármaco a lo largo del tiempo para detectar degradación. En 2021, un estudio realizado por la Universidad de Antioquia (Colombia) demostró que la cinética de degradación de fármacos como analgésicos y AINEs puede adelantarse mediante modelos cuantitativos basados en UPLC, justificando la migración de HPLC a nuevas tecnologías (Restrepo y Marín, 2021).

2.1.2. Rol de las Farmacopeas Oficiales en el Aseguramiento de Calidad

Las farmacopeas son documentos oficiales que establecen normas, especificaciones y métodos analíticos obligatorios para garantizar la calidad de medicamentos y materias primas. Constituyen referencias regulatorias internacionalmente aceptadas y son esenciales en los sistemas de control de calidad.

Principales funciones de las farmacopeas se describen a continuación:

a) Proporcionar métodos analíticos validados

Los métodos descritos se consideran procedimientos oficiales estandarizados y deben ser verificados antes de su implementación en cada laboratorio (USP, 2025).

b) Garantizar estandarización internacional

Permiten que productos fabricados en diferentes regiones mantengan criterios uniformes (WHO, 2019).

c) Actuar como referencia regulatoria

Las autoridades sanitarias utilizan las farmacopeas durante inspecciones, auditorías y procesos de registro sanitario.

d) Permitir ajustes cromatográficos controlados

Según USP (2025), modificaciones como cambio de columna, flujo o fase móvil deben estar justificadas para mantener la equivalencia del método.

En la industria farmacéutica, las farmacopeas más utilizadas son USP, EP (Ph. Eur.), JP y farmacopeas regionales como la FEUM. Todas ellas convergen en asegurar la calidad, pureza y potencia de los medicamentos (Shinde, 2024).

2.1.3. Normativas Internacionales Aplicables (USP, ICH, ISO/IEC 17025)

La valoración cuantitativa y los análisis cromatográficos se desarrollan dentro de un marco normativo internacional que garantiza la confiabilidad y la comparabilidad de los resultados analíticos.

2.1.3.1. USP (United States Pharmacopeia)

La USP (2025) establece especificaciones oficiales y métodos analíticos obligatorios para medicamentos, así como capítulos generales que regulan el desempeño de los métodos.

Normas relevantes para métodos cromatográficos y valoración:

- USP <621>: Cromatografía. Requisitos de resolución, tiempos de retención, eficiencia, aptitud del sistema.
- USP <1225>: Validación de procedimientos farmacopeicos.
- USP <1226>: Verificación de procedimientos farmacopeicos.
- Monografías individuales: especificaciones del principio activo y producto terminado.

La USP es referencia obligatoria en gran parte de América y es utilizada por agencias como FDA y OMS.

2.1.3.2. ICH (International Council for Harmonisation)

El ICH armoniza criterios regulatorios entre EE. UU., Europa y Japón, y sus guías son consideradas normas globales.

Guías aplicables:

- ICH Q2(R1): Validación de métodos (linealidad, precisión, exactitud, especificidad, LOD/LOQ, robustez).
- ICH Q3: Impurezas orgánicas, inorgánicas y solventes residuales.
- ICH Q6A: Especificaciones de productos farmacéuticos (criterios de aceptación).
- ICH Q8–Q11: Desarrollo farmacéutico, gestión de riesgos y sistemas de calidad.

Estas guías establecen los requisitos científicos y técnicos para garantizar que los métodos analíticos sean confiables y reproducibles (ICH, 2005).

2.1.3.3. ISO/IEC 17025:2017

Es la norma internacional que establece los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.

Los aspectos claves para considerar son:

- Estimación de incertidumbre de medición, obligatoria para resultados analíticos cuantitativos.
- Trazabilidad metrológica a patrones nacionales o internacionales.
- Validación/verificación de métodos utilizados.
- Control de equipos críticos (HPLC/UPLC, balanzas, micropipetas).
- Gestión documental y aseguramiento de calidad continuo.

2.2. Ketorolaco Trometamina: Caracterización y Relevancia Terapéutica

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son de uso frecuente en el manejo del dolor y de los procesos inflamatorios relacionados con afecciones musculoesqueléticas, articulares y con intervenciones quirúrgicas. Dentro de este grupo, el ketorolaco trometamina destaca por su elevada eficacia como analgésico, antipirético y agente antiinflamatorio (Pawar et al., 2022).

El ketorolaco trometamina es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) del grupo de los derivados heterocíclicos del ácido acético, utilizado principalmente por sus potentes propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Se comercializa en varias formas farmacéuticas como comprimidos, inyectables, aerosoles nasales y soluciones oftálmicas, siendo empleado para el tratamiento a corto plazo del dolor leve a moderado, especialmente en postoperatorios. Su relevancia terapéutica se basa en su efectividad analgésica comparable a opiáceos como la morfina, pero con menores efectos secundarios molestos (Orosco, 2022).

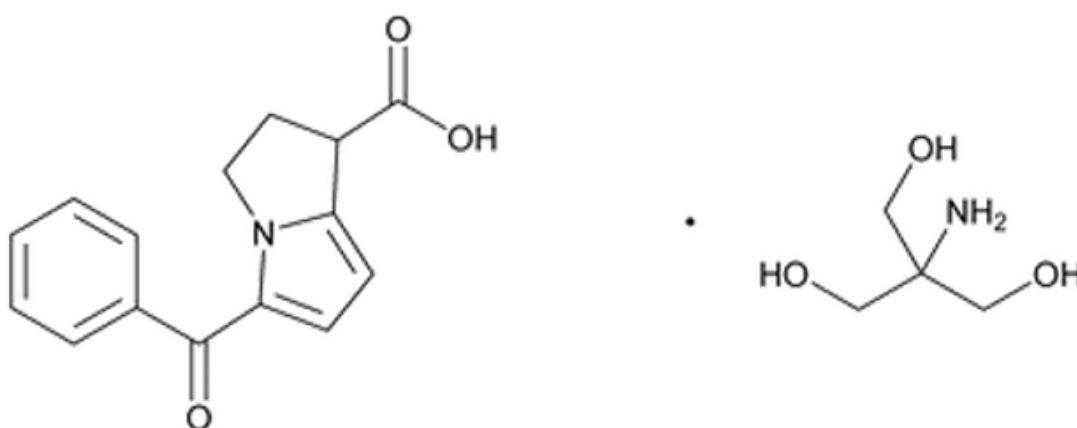


Figura 2.1 Formula química del Ketorolaco Trometamina (Pawar et al., 2022).

2.2.1. Propiedades Físicoquímicas del Ketorolaco Trometamina

El ketorolaco trometamina es la sal de trometamol del ketorolaco, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) utilizado en el tratamiento del dolor agudo moderado a severo. Estructuralmente, es un derivado del ácido pirrolizina carboxílico y se presenta como una mezcla racémica de los enantiómeros (R) y (S), siendo este último el principal responsable de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) (Bhongale et al., 2023).

Su fórmula molecular es $C_{15}H_{13}NO_3$, con un peso molecular aproximado de 255.27 g/mol. Presenta un punto de fusión entre 162–165 °C y un coeficiente de partición octanol/agua cercana a 2.1. La forma trometamina incrementa su solubilidad en agua (hasta 200 g/L), permitiendo su administración parenteral (Bhongale et al., 2023).

Farmacocinéticamente, posee una biodisponibilidad oral elevada (80–100 %), alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 20 y 60 minutos. Presenta alta

unión a proteínas plasmáticas (>99 %) y bajo volumen de distribución (0.1–0.3 L/kg), características relevantes para su comportamiento terapéutico (Bhongale et al., 2023). Debido a su alta potencia analgésica, pequeñas variaciones en su liberación pueden generar efectos clínicos significativos, por lo que requiere estricto control tecnológico durante el desarrollo de formulaciones sólidas (Andrade Acosta et al., 2025).

2.2.2. Mecanismo de Acción y Aplicaciones Clínicas

El ketorolaco actúa mediante la inhibición no selectiva de las enzimas COX-1 y COX-2, reduciendo la síntesis de prostaglandinas responsables del dolor, inflamación y fiebre. El enantiómero (S) es el principal inhibidor de COX. Se emplea en el tratamiento del dolor postoperatorio, dolor musculoesquelético, cólico renal y procesos inflamatorios como artritis y osteoartritis. Presenta potencia comparable a opioides leves, pero sin generar dependencia. Su uso debe limitarse a un máximo de cinco días debido al riesgo de efectos adversos gastrointestinales, renales y cardiovasculares, especialmente en dosis elevadas o en pacientes de edad avanzada (Bhongale et al., 2023).

2.2.3. Especificaciones Farmacopeicas para Comprimidos de 20 mg

El desarrollo de comprimidos de ketorolaco trometamina de 20 mg debe cumplir con los estándares de la USP. Entre las especificaciones evaluadas principalmente se incluyen: Uniformidad de peso, contenido de principio activo (90–110 %), friabilidad (<1 %). Tiempo de desintegración y perfil de disolución. En una publicación realizada por Mou, et al., (2024) analizaron a unas tabletas de liberación inmediata de ketorolaco trometamina 10 mg variación de peso, dureza, friabilidad, espesor, desintegración, disolución y potencia mediante espectrofotometría UV-Vis. Los resultados evidenciaron que tanto las marcas comerciales como la formulación experimental cumplieron con las especificaciones oficiales, presentando perfiles de disolución superiores al 75% a los 45 minutos y potencias entre 93%–97% en productos comerciales, confirmando su equivalencia farmacéutica y adecuada calidad.

2.3. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UPLC)

2.3.1. Principio de separación cromatográfica

De manera general el principio de separación de la cromatografía líquida se basa en la ecuación de Van Deemter, que describe la relación entre la velocidad lineal (flujo) y la altura equivalente a un plato teórico (HETP). A medida que disminuye el tamaño de partícula aumenta la eficiencia cromatográfica, aumenta la velocidad y mejora la resolución (Patil et al., 2023).

La técnica de separación cromatográfica, según Moldoveanu y David (2025) es uno de los métodos más usados para análisis ya que permite la separación y la detección de diferentes elementos moleculares que se encuentra en una muestra. Esta técnica funciona mediante la inyección de una muestra en una fase móvil en flujo que pasa por una fase estacionaria. De esta manera, la fase estacionaria retiene, con menor o mayor intensidad, a las diferentes especies moleculares que pasan y posteriormente las libera a la fase móvil. En cromatografía la fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico. En la práctica se utilizan generalmente columnas en la fase estacionaria y estas difieren de los componentes de la fase móvil debido a ciertas propiedades fisicoquímicas, lo que lo vuelve mayormente detectables.

Para la cromatografía líquida, uno de los métodos más utilizados es la cromatografía líquida de alto rendimiento o también conocida como de alta presión o por sus siglas en inglés (HPLC). Según Moldoveanu y David (2025) este método cuenta con mucha versatilidad ya que puede ser utilizado para análisis de moléculas poliméricas y no poliméricas, orgánicas e inorgánicas, polares y no polares, iónicas, etc. Esta técnica no aplica para análisis de materiales que no pueden solubilizarse en solventes. Los detectores usados en estos equipos son los encargados de producir una señal eléctrica la cual se muestra como una gráfica, en dicha gráfica los picos denotan los componentes separados.

Sin embargo, existen limitaciones en HPLC, especialmente en la determinación de impurezas a niveles bajos (0.1%), análisis de muestras complejas, tiempo de análisis, resolución por unidad de tiempo, etc y para superar estas limitaciones se desarrollaron partículas sub-2 μm , dando origen a la UHPLC/UPLC. La separación en UHPLC se realiza a presiones de hasta 100 MPa (Patil et al., 2023).

2.3.2. Diferencias entre HPLC y UPLC: Eficiencia y Resolución

La fase estacionaria puede estar compuesta por partículas porosas o por varillas monolíticas porosas, de esta forma, dependiendo según el tamaño de las partículas utilizadas en la columna cromatográfica se puede hacer una diferenciación de que tipo de equipo utilizar. Generalmente para partículas con un diámetro de 2.5 a 1.7 μm proporciona una mejor separación, no obstante, también se requiere de presiones más altas para desplazar la fase móvil a través de la columna (presiones de 5000 psi o 345 bar). (Moldoveanu y David, 2025)

El tipo de cromatografía que emplea partículas más pequeñas se conoce como cromatografía líquida de ultra rendimiento o por sus siglas en inglés UHPL o UPLCA. Además de utilizar mayor rango de presión, también se diferencia en la temperatura en la que realiza la separación.

En la práctica de HPLC, los volúmenes más comunes de inyección de muestra se encuentran entre 1 μL y 25 μL , mientras que en UPLC el rango más habitual está entre 1 μL a 10 μL . (Moldoveanu y David, 2025)

Patil et al. (2023) mencionan que la UPLC mejora la velocidad, resolución y sensibilidad en comparación con la HPLC.

El HPLC y UPLC se fundamentan en el mismo principio de separación por partición entre fase móvil y fase estacionaria; no obstante, difieren sustancialmente en los parámetros que determinan la eficiencia y la resolución cromatográfica. De acuerdo Gupta et al. (2022), el HPLC emplea partículas de 3–5 μm y opera a presiones aproximadas de hasta 400 bar, lo que limita la velocidad lineal óptima y, en consecuencia, la eficiencia de separación. En contraste, la UPLC utiliza partículas menores a 2 μm y trabaja a presiones considerablemente superiores (hasta 15,000 psi), lo que, según la ecuación de Van Deemter, reduce la altura equivalente a un plato teórico (HETP) y mejora el número de platos teóricos. Esta disminución en la dispersión de banda genera picos más estrechos y mayor capacidad de resolución, particularmente en mezclas multicomponente. Además, el UPLC permite reducir la longitud de columna y el tiempo de análisis sin comprometer la eficiencia, optimizando simultáneamente sensibilidad y selectividad. En términos operativos, estas características posicionan al UPLC como una plataforma de mayor potencia cromatográfica frente a la HPLC convencional.

Tabla 2.1 Comparación de las técnicas analíticas HPLC vs UPLC (Sahani & Wakode, 2018)

Parámetro	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)	Impacto Analítico
Tamaño de partícula	3 – 5 μm	< 2 μm (1.7 μm típico)	Menor tamaño, mayor eficiencia y resolución
Presión máxima	35–40 MPa	103.5 MPa	Permite uso de partículas pequeñas
Resolución	Buena	Superior	Mejor separación de compuestos cercanos
Temperatura de la columna	25°C	65°C	
Longitud de columna	100–250 mm	30–100 mm	Columnas más cortas reducen tiempo de análisis
Volumen de inyección	10–20 μL	1–5 μL	Reduce ensanchamiento de picos
Tiempo de análisis	10–30 min	2–10 min	Aumento significativo de productividad
Consumo de solvente	Alto	60–70% menor	Reducción de costos y mayor sostenibilidad
Sensibilidad	Buena	2–3 veces mayor	Picos más estrechos y altos
Costo del equipo	Menor	Alto	Principal desventaja de UPLC
Vida útil de columna	Mayor	Menor (alta presión)	Mayor costo operativo

2.3.3. Componentes del Sistema UPLC y Parámetros Críticos

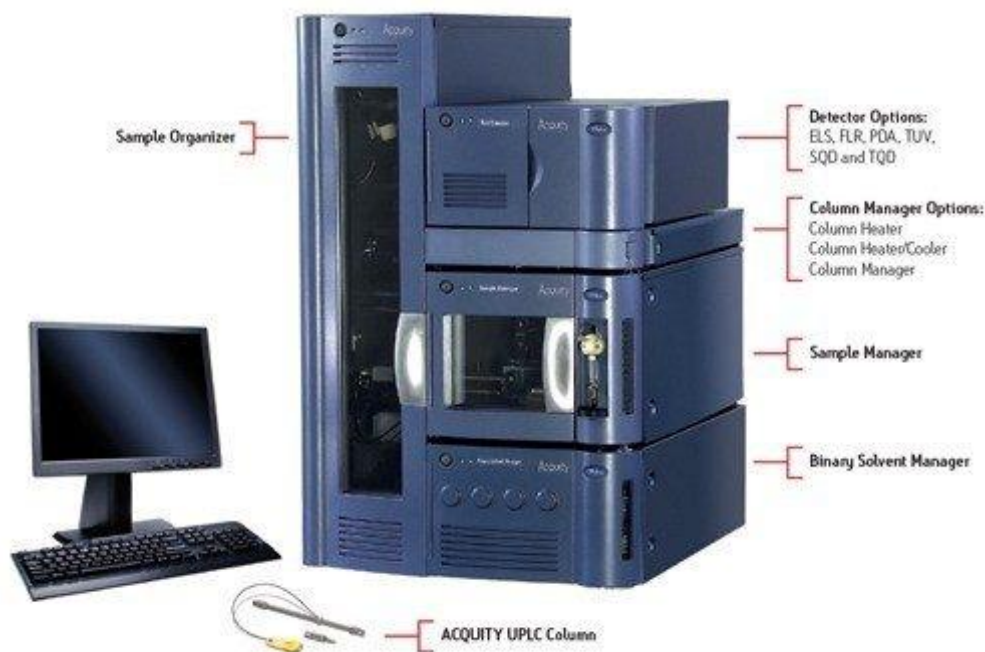


Figura 2.2 The ACQUITY UPLC System.

2.3.3.1. Sistema de bombeo y condiciones de presión

El sistema de bombeo es responsable de impulsar la fase móvil a través de la columna a presiones que pueden superar los 15000 psi. En UPLC, se emplean bombas binarias o cuaternarias de alta precisión, capaces de mantener un flujo constante con mínima pulsación. El sistema UPLC está diseñado para operar bajo condiciones de ultra alta presión, superiores a las empleadas en HPLC convencional. En una publicación realizada por Basharat et al. (2021), se indica que el UPLC puede trabajar aproximadamente a 103.5 MPa, mientras que HPLC opera entre 35–40 MPa. La presión constituye un parámetro crítico, ya que está directamente relacionada con el tamaño de partícula de la columna ($<2 \mu\text{m}$). Un incremento no controlado puede afectar la vida útil de la columna, la cual es señalada como una de las principales limitaciones del sistema. Asimismo, el control del flujo es fundamental para mantener la eficiencia cromatográfica conforme a la ecuación de Van Deemter, donde la altura de plato (H) depende de la velocidad lineal (μ).

2.3.3.2. Sistema de inyección de muestra

El inyector automático (autosampler) permite introducir volúmenes precisos y reproducibles, generalmente en el rango de microlitros. Los parámetros críticos incluyen el volumen de inyección, la exactitud y precisión del sistema de dosificación, la temperatura del compartimento de muestras y la limpieza de la aguja para evitar arrastre (carry-over). Además, el control de la temperatura del autosampler es esencial para muestras termolábiles, especialmente en análisis farmacéuticos donde la estabilidad del analito puede comprometer la exactitud del resultado. El inyector en UPLC introduce pequeños volúmenes de muestra en la fase móvil de manera precisa y reproducible; el volumen de inyección típico en UPLC es de 2–5 μL , significativamente menor que en HPLC (Basharat et al.,2021).

2.3.3.3. Detector

En UPLC, los detectores más empleados son UV/Vis, arreglo de diodos (PDA) y espectrometría de masas (MS). Debido a que las separaciones UPLC generan picos más estrechos, la frecuencia de adquisición de datos se convierte en un parámetro crítico. Barasharat et al. (2021) menciona en su trabajo el uso de detectores Acquity PDA y TUV, con velocidades de adquisición de 20 y 40 puntos por segundo respectivamente, y

volumen interno total de 500 nL. Otros parámetros críticos a considerar son la longitud de onda seleccionada, volumen de la celda de flujo y la sensibilidad y relación señal/ruido. Una velocidad de muestreo insuficiente puede comprometer la correcta integración del pico y afectar la exactitud de la cuantificación.

2.3.3.4. Columna cromatográfica

La columna es el componente central del sistema en el sistema UPLC. Se caracteriza por el uso de partículas de tamaño menor a 2 μm , lo que reduce la altura equivalente a un plato teórico (H) y mejora la eficiencia conforme a la ecuación de Van Deem, es decir, incrementa el número de platos teóricos y mejora la resolución. Los parámetros críticos asociados incluyen: tipo de fase estacionaria, tamaño de partícula, longitud y diámetro interno de la columna, así como la temperatura del horno de columna. Además, la temperatura de la columna es un parámetro crítico que influye en la viscosidad de la fase móvil, la presión del sistema y la cinética de transferencia de masa. Un control térmico adecuado mejora la reproducibilidad y puede optimizar la selectividad del método. Asimismo, la presión generada por partículas pequeñas requiere que el sistema esté diseñado para soportar altas cargas mecánicas sin comprometer la integridad de la columna (Chaudhary, 2025) (Basharat et al.,2021).

2.3.4. Aplicaciones del UPLC en el análisis de fármacos.

La cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC, por sus siglas en inglés) ha transformado el análisis farmacéutico al ofrecer mayor eficiencia cromatográfica, reducción del tiempo de corrida, menor consumo de solventes y mayor sensibilidad en comparación con la HPLC convencional. Por lo cual, se ha convertido en una excelente alternativa para la cuantificación de principios activos en fármacos, especialmente en los laboratorios de Control de Calidad. Sin embargo, estas características que posee la técnica UPLC también han favorecido su aplicación en estudios de validación de principios activos de fármacos, validación bioanalítica, monitorización terapéutica, estudios farmacocinéticos, evaluación de interacciones medicamentosas y análisis de matrices biológicas complejas, entre otras aplicaciones. Una de las principales aplicaciones del UPLC en el ámbito farmacéutico es la cuantificación simultánea de

principios activos en matrices biológicas para estudios de monitorización terapéutica. Alonso (2021) desarrolló e implementó un método UPLC-MS/MS para la determinación simultánea de carbamazepina y topiramato en plasma humano, demostrando linealidad, precisión, exactitud y estabilidad conforme a criterios regulatorios. Este estudio evidencia cómo la técnica UPLC permite reducir tiempos analíticos sin comprometer la selectividad ni la sensibilidad, aspectos críticos en el seguimiento farmacocinético de pacientes con epilepsia.

Por otro lado, la técnica cromatográfica UPLC ha mostrado una gran utilidad en estudios preclínicos y de interacción farmacológica. En un trabajo realizado por Otto et al. (2026) se evidencia que desarrollaron y validaron un método UPLC-MS/MS para la cuantificación de regorafenib y sus metabolitos activos en plasma de ratas, aplicándolo posteriormente a estudios farmacocinéticos e interacciones con trametinib. La elevada sensibilidad del método permitió detectar cambios significativos en parámetros como la concentración máxima) y área bajo la curva, confirmando la relevancia del UPLC en la evaluación de exposición sistémica y en la optimización de esquemas terapéuticos.

Otra aplicación relevante del UPLC en el análisis de fármacos es su empleo en la determinación de antibióticos en fluidos biológicos para estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en poblaciones especiales. Rigo-Bonnin et al. (2024) desarrollaron y validaron un procedimiento basado en UHPLC-MS/MS para la medición de ertapenem (antibiótico betalactámico de amplio espectro) en plasma y líquido ascítico en pacientes cirróticos con peritonitis bacteriana espontánea. La técnica mostró adecuados parámetros de linealidad, precisión y recuperación, demostrando su aplicabilidad clínica en escenarios donde la alteración fisiopatológica puede modificar significativamente la farmacocinética del medicamento.

Aunque el UPLC se asocia principalmente al análisis cuantitativo de fármacos, también tiene aplicaciones en la caracterización de compuestos bioactivos de interés farmacológico. En el estudio de Albuquerque et al. (2025), la técnica UPLC-MS/MS permitió la identificación de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos vegetales con potencial actividad terapéutica. Este tipo de aplicación es fundamental en etapas tempranas de investigación y desarrollo de nuevos principios activos, donde la caracterización estructural y la identificación de metabolitos resultan esenciales.

2.4. Verificación de Métodos Analíticos

2.4.1. Definición y Alcance de la Verificación según USP <1226>

La USP (2025) señala textualmente que verificación consiste en la evaluación de las características de desempeño analítico seleccionadas, para generar datos relevantes y adecuados, en vez de repetir el proceso de validación. Los usuarios de los procedimientos analíticos farmacopeicos no necesitan validar estos procedimientos cuando los usan por primera vez en sus laboratorios, aunque deben establecer evidencias documentadas de aptitud en las condiciones de uso reales. En los Estados Unidos, se estableció este requisito en el punto 21 CFR 211.194(a)(2) de las reglamentaciones de Buenas Prácticas de Fabricación vigentes, que declara que “se verificará la aptitud de todos los métodos de prueba usados bajo las condiciones de uso reales.” La verificación de procedimientos microbiológicos no se encuentra dentro del alcance del capítulo <1226>.

También la USP (2025) indica que el proceso de verificación de procedimientos de prueba farmacopeicos es la evaluación que sirve para determinar si el procedimiento puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales para un fármaco específico y/o matriz de un producto farmacéutico determinado.

2.4.2. Diferencias entre Verificación y Validación

En el ámbito de los métodos analíticos farmacéuticos, la validación y la verificación son procesos vinculados, aunque se diferencian en su concepto y en su ámbito de aplicación.

La validación de un método analítico se define como la demostración, mediante estudios experimentales, de que el procedimiento es adecuado para su propósito previsto, evaluando de forma sistemática parámetros como exactitud, precisión, especificidad, linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación y robustez (USP, 2025). Habitualmente, la validación completa es realizada por el desarrollador del método antes de su adopción rutinaria o de su inclusión en una farmacopea.

Por otro lado, la verificación de un método se refiere a la confirmación de que un método ya validado, por ejemplo, un método farmacopeico descrito en USP, EP o en un procedimiento interno corporativo es apto cuando se aplica en un laboratorio específico, con sus propias condiciones de trabajo, equipamiento y personal. La USP subraya que la verificación no implica repetir todos los estudios de validación, sino demostrar que, bajo las condiciones del laboratorio usuario, el método mantiene el desempeño esperado en los parámetros críticos definidos (USP, 2025).

Tabla 2. 2 Diferencias principales entre Validación y Verificación (USP, 2025)

Validación	Verificación
Se aplica a métodos nuevos o significativamente modificados.	Se aplica a métodos ya validados
Busca caracterizar de forma completa el desempeño del procedimiento analítico.	Confirma que el método funciona adecuadamente en el laboratorio receptor
Es más extensa en términos de número de parámetros y experimentos.	Se centra en un subconjunto de parámetros relevantes
Normalmente es responsabilidad del desarrollador del método	Es responsabilidad del laboratorio que implementa el método

2.4.3. Condiciones del Laboratorio y su Impacto en el Desempeño Analítico

Las condiciones del laboratorio son un elemento fundamental para el correcto funcionamiento de los métodos cromatográficos, especialmente en la verificación de procedimientos farmacopeicos que se adaptan de HPLC a UPLC. La norma ISO e IEC (2017) indica que los laboratorios deben controlar factores ambientales como temperatura, humedad, vibraciones e iluminación, para asegurar que los resultados de los ensayos sean válidos. En cromatografía líquida, cambios en la temperatura ambiental y de la columna pueden alterar la viscosidad de la fase móvil, los tiempos de retención y la eficiencia de los picos, lo que afecta parámetros como la precisión, la exactitud y la aptitud del sistema del método verificado (USP, 2025).

La calidad de los reactivos, solventes y estándares de referencia es otro elemento clave. La OMS enfatiza que los laboratorios de control de calidad farmacéutico deben emplear patrones de referencia primarios o secundarios trazables y solventes de grado cromatográfico, con registros documentados de lote, fecha de apertura y condiciones de almacenamiento (WHO, 2021). La degradación de soluciones patrón de Ketorolaco Trometamina o la contaminación de la fase móvil pueden generar picos espurios, cambios en la línea base y pérdida de linealidad en la curva de calibración, afectando la interpretación del desempeño del método verificado.

Finalmente, el sistema de gestión de calidad del laboratorio, incluyendo el control de cambios, la gestión de registros y la evaluación de riesgos, condiciona la capacidad de demostrar que el método UPLC verificado se mantiene apto en el tiempo. La ISO/IEC 17025 y las recomendaciones de organismos regulatorios indican que cualquier modificación relevante en las condiciones del laboratorio (cambio de columna, de lote de fase móvil, actualización de software del equipo, traslado de laboratorio, etc.) debe evaluarse mediante pruebas de aptitud del sistema y, cuando corresponda, reevaluaciones parciales de desempeño (ISO e IEC, 2017; WHO, 2021). De esta manera, las condiciones del laboratorio no solo influyen en los parámetros de desempeño (precisión, exactitud, linealidad, especificidad), sino que también determinan la magnitud y la estabilidad de la incertidumbre de medición atribuida al método verificado.

2.4.4. Criterios de Aceptación Farmacopeicos para Métodos Verificados

Los requisitos de verificación deben basarse en la evaluación de la complejidad tanto del procedimiento como del material al que se aplica el procedimiento. La verificación de métodos analíticos farmacopeicos se orienta a demostrar que un procedimiento ya validado (por ejemplo, el descrito en una monografía de la USP para Ketorolaco Trometamina) mantiene un desempeño adecuado bajo las condiciones específicas del laboratorio usuario. El capítulo general USP <1226> establece que la verificación debe enfocarse en un conjunto de parámetros de desempeño seleccionados evaluando la complejidad tanto del procedimiento como del material al que se aplica el procedimiento, los parámetros típicamente son exactitud, precisión, linealidad y rango, así como la aptitud del sistema, utilizando criterios de aceptación coherentes con los datos de validación originales y con los requerimientos de la monografía correspondiente (USP, 2025).

En términos generales, para ensayos de valoración de principio activo en comprimidos, las farmacopeas y guías internacionales establecen que:

- **Exactitud (recuperación):** las recuperaciones medias suelen aceptarse dentro de un intervalo de 98,0–102,0 % del valor teórico en el rango cercano al 100 % de la concentración nominal, salvo que la monografía o la guía regulatoria definan límites más estrictos.
- **Precisión (repetibilidad):** el coeficiente de variación (%RSD) de al menos seis determinaciones independientes debe situarse habitualmente en $\leq 2,0$ % para ensayos de valoración; en matrices complejas o métodos muy sensibles puede aceptarse un %RSD ligeramente superior, siempre que exista justificación técnica.
- **Linealidad:** se requiere demostrar una relación lineal entre respuesta y concentración en el intervalo, por ejemplo, 80–120 % de la concentración de trabajo, con coeficiente de correlación $r \geq 0,995$, residuales aleatorios y ausencia de curvatura significativa (USP, 2025).
- **Especificidad:** el método debe evidenciar ausencia de interferencias significativas de excipientes, degradantes u otras impurezas en el tiempo de retención del analito de interés. La USP y la Ph. Eur. enfatizan el uso de muestras placebo, muestras degradadas y, cuando sea posible, estándares de impurezas para demostrar separación adecuada (USP, 2025).

Además de estos parámetros, los criterios de aptitud del sistema son obligatorios en cromatografía y suelen incluir: resolución mínima entre el pico del analito y el pico más cercano (por lo general $R \geq 2,0$), eficiencia de la columna (número de platos teóricos), factor de cola (tailing, usualmente $\leq 2,0$) y %RSD del área de picos de soluciones estándar (habitualmente $\leq 2,0$ % para cinco o más inyecciones) (USP, 2025). Estos criterios permiten verificar en cada corrida que el sistema UPLC opera dentro de un desempeño equivalente al especificado para el método oficial de HPLC.

2.5. Evaluación de Parámetros de Desempeño Analítico

La evaluación de los parámetros de desempeño analítico constituye un componente esencial en la verificación de métodos farmacopeicos, especialmente cuando estos son adaptados o transferidos entre laboratorios o entre plataformas cromatográficas (por ejemplo, de HPLC a UPLC). Conforme a ICH Q2 (2022), la verificación debe demostrar que el método analítico mantiene su idoneidad bajo las condiciones reales del laboratorio ejecutante. Para ensayos de valoración cuantitativa, los parámetros críticos incluyen precisión (repetibilidad e intermedia), exactitud, linealidad, especificidad y, de manera complementaria, robustez y aptitud del sistema. La adecuada evaluación de estos parámetros permite confirmar que el método es capaz de generar resultados consistentes, veraces y trazables, asegurando la confiabilidad de los informes de contenido del principio activo.

2.5.1. Precisión: Repetibilidad e Intermedia

La precisión evalúa el grado de concordancia entre mediciones independientes realizadas bajo condiciones definidas. La USP (2025) indica que la precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo.

2.5.2. Exactitud: Estudios de Recuperación

La exactitud evalúa el grado de concordancia entre el resultado obtenido y el valor verdadero o aceptado como referencia. Para métodos de valoración, la práctica estándar consiste en realizar estudios de recuperación mediante la adición conocida del analito (spiking) en muestras placebo o matrices reales (ICH Q2(R2), 2022).

El estudio suele realizarse a tres niveles (80 %, 100 % y 120 %) con tres réplicas por nivel. Para métodos cuantitativos de comprimidos, las recuperaciones aceptables suelen situarse entre 98,0 % y 102,0 %, salvo criterios específicos de la monografía (USP, 2025).

La exactitud es fundamental en métodos de valoración porque:

- Confirma que el método mide el contenido real del principio activo sin sesgo sistemático.
- Evalúa potenciales interferencias de excipientes que podrían alterar la respuesta cromatográfica.
- Permite verificar que la adaptación del método (por ejemplo, su transferencia a UPLC) no introduce desviaciones significativas.

En el caso del Ketorolaco Trometamina, cuya matriz formulada puede contener excipientes altamente solubles, la exactitud asegura que no existan efectos de recuperación o interferencias que afecten el valor reportado del contenido del fármaco.

2.5.3. Linealidad: Curva de Calibración y Rango de Trabajo

En su definición, la USP (2025) menciona que la linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado.

En verificación de métodos farmacopeicos, ICH Q2(R2) recomienda evaluar la linealidad al menos en cinco niveles, típicamente entre 80 % y 120 % de la concentración nominal, con duplicados o triplicados por nivel para una evaluación estadística robusta.

El rango de trabajo corresponde al intervalo en el cual se ha demostrado simultáneamente precisión, exactitud y linealidad. Para la valoración de Ketorolaco Trometamina por UPLC, el rango esperado se situará dentro del intervalo 80–120 % del valor teórico, cubriendo las posibles variaciones en contenido del lote.

La linealidad es particularmente relevante en métodos UPLC, debido a la alta eficiencia de pico y al amplio rango dinámico de los detectores modernos, lo que permite una mayor sensibilidad, pero también exige controlar posibles saturaciones del detector o comportamientos no lineales en el extremo superior del rango.

2.5.4. Especificidad: Discriminación frente a Excipientes e Impurezas

La especificidad evalúa la capacidad del método para medir inequívocamente el analito en presencia de componentes que podrían interferir, tales como excipientes, productos de degradación, reactivos o impurezas del proceso (USP, 2025).

En métodos cromatográficos, los criterios fundamentales incluyen:

- Separación adecuada entre el pico del analito y los picos más cercanos (resolución $\geq 2,0$ según USP <621>).
- Ausencia de interferencias detectables en el tiempo de retención del analito.
- Evaluación con muestras placebo, muestras degradadas (pruebas de estrés) o, de ser posible, estándares de impurezas.

Para Ketorolaco Trometamina, un AINE sensible a condiciones oxidativas y térmicas, es esencial demostrar que los posibles degradantes no coeluyen con el pico del principio activo, especialmente porque la migración a UPLC puede alterar la selectividad debido a cambios en la columna o en el gradiente (Pawar et al., 2022).

La especificidad confirma que el método no confunde el analito con otros componentes y que los resultados reportados representan únicamente el contenido del principio activo.

2.5.5. Robustez y Aptitud del Sistema

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.

Aunque en una verificación no siempre se exige evaluar la robustez completa, incluir este parámetro aporta evidencia adicional de que el método es estable frente a variaciones mínimas controladas. La robustez examina la influencia de factores como:

- Cambios pequeños en el flujo, temperatura de columna o pH de la fase móvil.
- Diferencias entre lotes de columna del mismo tipo.
- Variaciones menores en el tiempo de extracción o preparación.

Un método robusto minimiza el riesgo de falla durante el uso rutinario. ICH Q2 y la USP recomiendan documentar cualquier parámetro crítico identificado, especialmente en métodos UPLC donde cambios pequeños pueden tener efectos significativos debido a las columnas de alta eficiencia.

La aptitud del sistema (system suitability) es obligatoria en métodos cromatográficos regulados y se debe ejecutar antes de cada corrida. Incluye criterios como:

- %RSD del área del estándar según USP (< 2.0 %).
- Factor de asimetría (≤ 2.0).
- Eficiencia (número de platos).
- Resolución crítica entre picos relevantes.

Estos criterios confirman que el sistema cromatográfico está operando adecuadamente y que los resultados de las muestras serán confiables.

2.6. Estimación de la Incertidumbre de Medición

La incertidumbre de medición constituye un componente fundamental en la evaluación de la calidad de los resultados analíticos, especialmente en ensayos farmacéuticos donde la conformidad del producto depende de límites específicos y decisiones regulatorias estrictas. Según EURACHEM (2012), la incertidumbre representa un parámetro asociado al resultado que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente atribuirse al mensurando. En métodos cromatográficos utilizados para la valoración de principios activos, estimar adecuadamente la incertidumbre permite evaluar la confiabilidad del resultado, su trazabilidad metrológica y la solidez de las decisiones tomadas respecto a la liberación de lotes (Ellison, 2020).

En el contexto del análisis de Ketorolaco Trometamina por UPLC, la incertidumbre integra componentes relacionados con preparación de soluciones, calibración instrumental, repetibilidad, variabilidad entre días, recuperación del analito, efectos de matriz y desempeño del sistema cromatográfico. Su estimación es un requisito creciente en auditorías regulatorias, certificaciones ISO/IEC 17025 y programas de aseguramiento de calidad en laboratorios farmacéuticos.

2.6.1. Fundamentos Metrológicos y Relevancia en Ensayos Farmacéuticos

Desde la perspectiva metrológica, la incertidumbre surge de la imposibilidad de conocer exactamente el valor verdadero del mensurando. De acuerdo con Joint Committee for Guides in Metrology (2023), la incertidumbre debe cuantificarse combinando estadísticamente los componentes identificados y expresándose como incertidumbre expandida (Ellison, 2020).

En ensayos farmacéuticos, la incertidumbre es relevante por las siguientes razones:

➤ Trazabilidad metrológica

ISO e IEC (2017) exige que los laboratorios cuenten con una cadena de trazabilidad que vincule los resultados analíticos con estándares nacionales o internacionales. La incertidumbre permite evaluar si esa trazabilidad es suficientemente sólida.

➤ Evaluación de conformidad

La ICH establece que la aceptación o rechazo de un lote debe considerar la variabilidad inherente al método analítico. Un resultado cercano a los límites de especificación puede conducir a decisiones incorrectas si no se incluye la incertidumbre.

➤ Transparencia y confiabilidad

EURACHEM (2012) resalta que la incertidumbre permite comparar métodos, laboratorios y resultados en el tiempo, siendo un indicador de desempeño crítico en auditorías regulatorias.

En métodos cromatográficos modernos (UPLC/HPLC), la incertidumbre adquiere mayor relevancia debido a la reducción de volúmenes analíticos, la alta sensibilidad instrumental y la susceptibilidad a variaciones menores.

2.6.2. Fuentes de Incertidumbre en Procedimientos Cromatográficos

En UPLC, las principales fuentes de incertidumbre pueden clasificarse en:

2.6.2.1. Preparación de soluciones y patrones

- Error de pesadas (balanzas, resolución, deriva).
- Exactitud de material de referencia.
- Volumen de aforo (matraces, micropipetas).

Estudios recientes confirman que la mayoría de la incertidumbre en valoración cromatográfica proviene de la preparación de soluciones y estándares (Pereira et al., 2022).

2.6.2.2. Calibración y curva analítica

- Ajuste de regresión.
- Residuos de la curva.
- Incertidumbre asociada a la concentración del estándar primario.

En UPLC, debido al amplio rango lineal del detector, el impacto de la regresión es menor, pero sigue siendo significativo cuando el rango es estrecho (González y Ángeles, 2020).

2.6.2.3. Repetibilidad y precisión intermedia

- Variación del equipo (inyección, bomba, detector).
- Variación entre analistas.
- Variación entre días o columnas.

Este componente suele representarse mediante el %RSD de series replicadas.

2.6.2.4. Condiciones instrumentales

- Temperatura de columna.
- Flujo de la bomba.
- Presión del sistema.
- Volumen inyectado.

Las variaciones en temperatura y flujo han sido identificadas como contribuyentes significativos especialmente en métodos UPLC por alta eficiencia de la columna (Zhang et al., 2021).

2.6.3. Metodología de Cálculo

La estimación de la incertidumbre en cromatografía se basa en las recomendaciones de EURACHEM (2012). Las etapas principales son:

2.6.3.1. Definición del mensurando

Concentración en mg/mL de Ketorolaco trometamina en comprimidos recubiertos de 20mg (k=2, 95% de nivel de confianza).

2.6.3.2. Elaboración del modelo matemático

$$x(\text{mg/unidad}) = \frac{A_m}{A_{PR}} \times \frac{P_{PR}}{\text{Vol}_{\text{matraz PR}}} \times \frac{\text{Pot}_{PR}}{100} \times \frac{\text{Vol}_{\text{matraz 1 muestra}}}{P_m} \times \frac{\text{Vol}_{\text{matraz 2 muestra}}}{\text{Vol}_{\text{pip 1 muestra}}} \times \text{PP} \times \text{Rep} \quad (2.1)$$

Dónde:

$X(\text{mg/unidad})$ = Concentración de Ketorolaco Trometamina (mg) por unidad

A_m = Respuesta del pico de Ketorolaco Trometamina en la solución muestra

A_{PR} = Respuesta del pico de Ketorolaco Trometamina en la solución de patrón de referencia

P_{PR} = Peso del patrón de referencia

$\text{Vol}_{\text{matraz PR}}$ = Volumen de la solución de patrón de referencia

Pot_{PR} = Potencia del patrón de referencia

$\text{Vol}_{\text{matraz 1 muestra}}$ = Volumen (mL) del primer matraz de la solución de la muestra (primera dilución)

P_m = Peso de la muestra (mg)

$\text{Vol}_{\text{matraz 2 muestra}}$ = Volumen (mL) del segundo matraz de la solución de la muestra (segunda dilución)

$\text{Vol}_{\text{pip 1 muestra}}$ = Volumen (mL) de la primera pipeta de la solución muestra (primera alícuota)

PP = Peso promedio del producto terminado

Cada componente del modelo tiene una incertidumbre asociada.

2.6.3.3. Identificación de fuentes de incertidumbre

Usando diagramas causa-efecto o Ishikawa como recomienda EURACHEM:

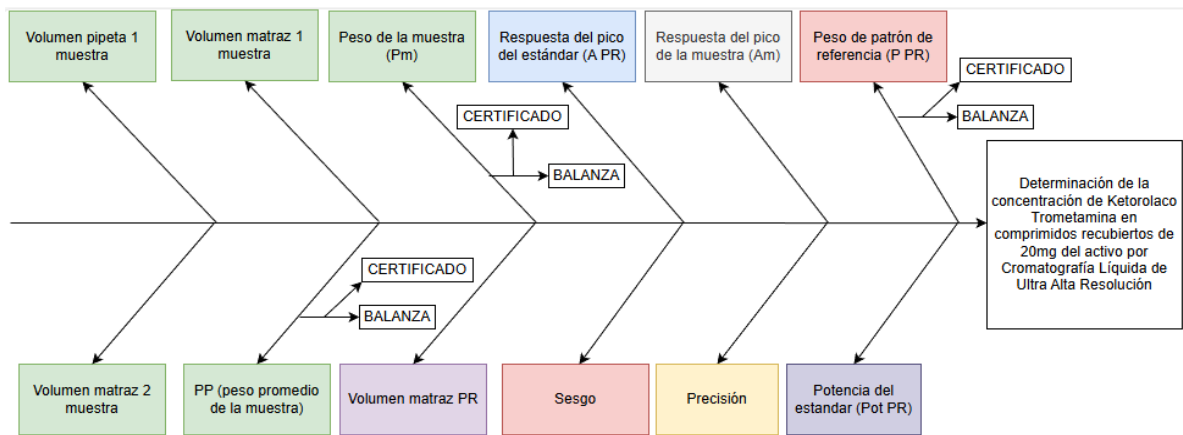


Figura 2.3 Diagrama Ishikawa con los factores que influyen en el cálculo de incertidumbre

2.6.3.4. Cuantificación de cada componente

- Tipo A: repetibilidad, varianza entre días, obtenida estadísticamente.
- Tipo B: incertidumbre de aforos, certificado del material de referencia, calibración de balanza.

2.6.3.5. Cálculo de la incertidumbre combinada (u_c)

Suma cuadrática de todos los componentes:

$$u_c = \sqrt{\sum(u_i^2)} \quad (2.2)$$

2.6.3.6. Cálculo de la incertidumbre expandida (U)

Aplicando un factor de cobertura $k = 2$ (95 % de confianza):

$$U = k \cdot u_c \quad (2.3)$$

2.6.3.7. Declaración final del resultado con incertidumbre

Este enfoque es ampliamente aceptado por autoridades regulatorias y por ISO/IEC 17025.

2.6.4. Impacto de la Incertidumbre en la Toma de Decisiones Analíticas

La incertidumbre afecta directamente la liberación de productos farmacéuticos, la verificación de métodos y la comparabilidad de resultados. Su impacto principal se observa en:

2.6.4.1. Comparación entre métodos o laboratorios

La incertidumbre permite interpretar si diferencias entre resultados son reales o atribuibles a variación analítica.

2.6.4.2. Control estadístico de métodos

Un método con incertidumbre excesiva puede ser inapto para liberar lotes o para estudios de estabilidad.

2.6.4.3. Minimización de errores regulatorios

La OMS (2011) resalta que la incertidumbre soporta la evidencia documental requerida durante inspecciones regulatorias, reforzando la confiabilidad de los resultados.

2.7. Ajustes Cromatográficos Permitidos según USP

La USP (2025) establece en su capítulo <621> un marco regulatorio claro para determinar qué modificaciones pueden realizarse a un método cromatográfico oficial sin requerir una revalidación completa. Estos ajustes son indispensables cuando un laboratorio adapta un método HPLC descrito en USP hacia tecnologías UPLC, busca mejorar la eficiencia analítica o sustituye columnas debido a disponibilidad comercial.

Según USP, 2025, los ajustes deben garantizar que:

1. No se altere la selectividad,
2. Se mantenga la aptitud del sistema, y
3. No se modifique de manera fundamental el procedimiento analítico.

La USP advierte explícitamente que *"múltiples ajustes pueden tener un efecto acumulativo en el desempeño del sistema y deben evaluarse adecuadamente"* (USP, 2025).

2.7.1. Cambios en Fase Estacionaria y Tamaño de Partícula

La USP permite algunos ajustes en la columna cromatográfica siempre que el laboratorio demuestre equivalencia en términos de selectividad, eficiencia y resolución.

a) Identidad de la fase estacionaria (restricción mayor)

La USP (2025) establece claramente: “Ningún cambio de la identidad del sustituyente (p. ej., ningún reemplazo de C18 por C8)” (*USP <621>, Sección: Cromatografía líquida — Elución isocrática*).

Lo cual significa que no se puede cambiar el tipo de fase ligada (C18 → C8) sin revalidación, porque afecta directamente la selectividad.

b) Ajuste de tamaño de partícula

Este es el cambio más relevante para migrar de HPLC a UPLC. La USP autoriza:

“Se puede modificar el tamaño de partícula y/o la longitud de la columna siempre que la relación L/dp permanezca dentro del intervalo de -25% a +50%.” (*USP <621>, Ajustes en elución isocrática*).

2.7.2. Justificación de Ajustes en Flujo y Geometría de Columna

Cuando se cambian las dimensiones de la columna, la USP exige ajustar proporcionalmente el flujo, el volumen inyectado, e incluso el tiempo del gradiente (si aplica).

Ajuste de flujo para cambios en tamaño de partícula y diámetro

La USP proporciona una ecuación oficial:

$$F_2 = F_1 \left(\frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \right) \quad (2.4)$$

Donde:

F_1 : flujo original

F_2 : flujo ajustado

d_c : diámetro interno

d_p : tamaño de partícula

Esto permite mantener la velocidad lineal del método original, que es clave para conservar la selectividad.

a) Ajuste de volumen de inyección

La USP establece:

$$V_{iny2} = V_{iny1} \left(\frac{L_2 \cdot d_{c2}^2}{L_1 \cdot d_{c1}^2} \right) \quad (2.5)$$

Esto evita sobrecargar columnas más pequeñas típicas de UPLC (2.1 mm).

a) Ajuste de gradiente (cuando aplica)

La USP indica:

“El tiempo del gradiente para cada segmento debe ajustarse para mantener una relación constante entre el volumen del gradiente y el volumen de la columna.”

Esto impide que la migración a UPLC modifique la selectividad del método.

b) Temperatura de columna

La USP permite:

- ± 10 °C para isocrático
- ± 5 °C para gradiente

La temperatura impacta la viscosidad, cinética de transferencia de masa y selectividad.

a) Cambio del diámetro de columna

Permitido:

“Se puede ajustar el diámetro interno de la columna incluso sin cambio de tamaño de partícula o longitud.”

Pero requiere evaluación de:

- Volumen extra-columna.
- Presión máxima.
- Ensanchamiento de banda no columnar.

2.7.3. Evaluación de Equivalencia Analítica y Selectividad

La USP establece que todo ajuste debe evaluarse mediante aptitud del sistema y comparación de selectividad.

a) Mantenimiento de la selectividad

La USP define:

“Los cambios son aceptables siempre que se demuestre que la selectividad y el orden de elución de las impurezas especificadas a controlar son equivalentes.”

Por tanto, deben compararse:

- Tiempo de retención del analito.
- Orden de elución.
- Resolución entre picos críticos ($R \geq 2.0$).
- Aptitud del sistema como evidencia de equivalencia

El método ajustado debe cumplir todos los criterios USP:

- %RSD del estándar $\leq 2,0$ %.
- Factor de cola: 0.8–1.8.
- Número de platos dentro de la variación permitida.
- Resolución crítica $\geq 2,0$.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. Enfoque de la investigación

3.1.1. Tipo de investigación

De acuerdo con la naturaleza del proyecto, el estudio se clasifica como aplicada y experimental de laboratorio. Es aplicada porque tiene como objetivo resolver un problema real dentro del laboratorio de control de calidad que es verificar si el método UPLC adaptado cumple los requisitos analíticos exigidos por la USP para cuantificar Ketorolaco Trometamina en productos terminados. Es experimental de laboratorio ya que el estudio consiste en ejecutar pruebas cromatográficas en un entorno controlado de laboratorio, evaluando parámetros de desempeño mediante experimentación directa con el método UPLC.

El nivel es descriptivo y explicativo. Se considera una investigación de nivel descriptivo porque caracteriza el comportamiento del método UPLC bajo condiciones reales del laboratorio, describiendo sus parámetros de desempeño (precisión, linealidad, exactitud, especificidad, aptitud del sistema, etc.); y explicativo, porque busca determinar si el método adaptado explica y mantiene la equivalencia analítica frente al método original USP, e identifica causas de variabilidad evaluadas mediante la estimación de incertidumbre.

3.2. Metodología

3.2.1. Variables

Tabla 3.1 Descripción de las Variables

Tipo de variable	Descripción	Indicadores
Variable independiente	Concentración del analito en las soluciones preparadas para la valoración cromatográfica.	Esta se manipula en niveles comprendidos entre el 80 % y el 120 % del valor nominal, con el propósito de evaluar la respuesta del método UPLC y demostrar su linealidad en el rango analítico definido.
Variable dependiente	Desempeño analítico del método UPLC en la valoración de Ketorolaco Trometamina bajo las condiciones experimentales establecidas.	Este desempeño se expresa mediante indicadores críticos como precisión (%RSD), exactitud (% de recuperación), linealidad (coeficiente de correlación y parámetros de regresión), especificidad (resolución y ausencia de interferencias), aptitud del sistema e incertidumbre de medición.

3.2.2. Diseño experimental

El diseño experimental del presente trabajo se basó en un estudio de verificación de un método farmacopeico adaptado a una tecnología de cromatografía líquida de ultra alta resolución cuyos ajustes están alineados a los que permite por la USP, evaluando los parámetros de desempeño analítico establecidos en USP <1226>. Para cada parámetro se realizaron réplicas independientes bajo condiciones controladas, considerando variaciones de analista y día para la evaluación de la precisión intermedia.

3.2.3. Recolección de datos

3.2.3.1. Métodos y técnicas

3.2.3.1.1. Método de valoración de Ketorolaco Trometamina

- **Declarado:** Ketorolaco Trometamina 20 mg comprimidos recubiertos
- **Método:** Cromatografía de ultra alta resolución (UPLC)
- **Especificación:** 20 mg/Comprimido recubierto (18,0 – 22,0 mg/Comprimido recubierto / 90,0 – 110%)
- **Formula:**

Ketorolaco Trometamina20mg
Excipientes.....csp

Condiciones cromatográficas

- **Modo:** Isocrático
- **Velocidad de flujo:** 0,250 mL/min
- **Temperatura de columna:** 30°C ± 5°C
- **Temperatura del automuestreador:** 20°C ± 5°C
- **Detector:** Longitud de onda a 254 nm con ancho de banda de 1,2 nm
- **Volumen de inyección:** 3,0 µL
- **Tiempo de corrida:** 10 minutos

Columna cromatográfica:

- **Marca:** Acquity UPLC Beh Shield (RP18)
- **Clasificación USP:** L1
- **Tamaño de partícula:** 1,7 µm
- **Longitud:** 100 mm
- **Diámetro interno:** 2,1 mm

Requisitos de Aptitud del sistema:

- **Factor de asimetría:** No más de 1,5 en la solución estándar
- **Desviación estándar relativa:** No más de 1,5% entre inyecciones repetidas de la solución estándar
- **Platos teóricos:** No menor a 1700.
- **Resolución:** No menos de 1,5 entre Ketorolaco y Compuesto Relacionado B de Ketorolaco y no menos de 1,5 entre Ketorolaco y Compuesto Relacionado C de Ketorolaco

Reactivos:

- **Solución diluyente:** Agua tipo 1: Metanol (1:1)
- **Fase móvil: Metanol:** Ácido Acético al 0,5% solución en agua (55:45)

Procedimiento:

Se trabajo según el siguiente procedimiento:

- **Preparación de solución estándar de Ketorolaco trometamina:**
Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente. Se pesaron aproximadamente 12,0 mg de Ketorolaco Trometamina estándar y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron 15 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó. A partir de esta solución, se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, el cual se diluyó a volumen con la misma solución diluyente. La solución resultante se homogenizó, se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y finalmente se inyectó en el sistema cromatográfico.
- **Preparación de solución muestra de Ketorolaco trometamina:**
Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente. Se obtuvo el polvo proveniente de 10 comprimidos y se pesó una cantidad equivalente a 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina (aproximadamente 180 mg de polvo). Esta masa se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 100 mL, se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se enrazó con la misma solución diluyente y se homogenizó. A partir de esta preparación, se transfirieron 3 mL a un matraz volumétrico actínico de 25 mL, el cual se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y finalmente se inyectó en el sistema cromatográfico.

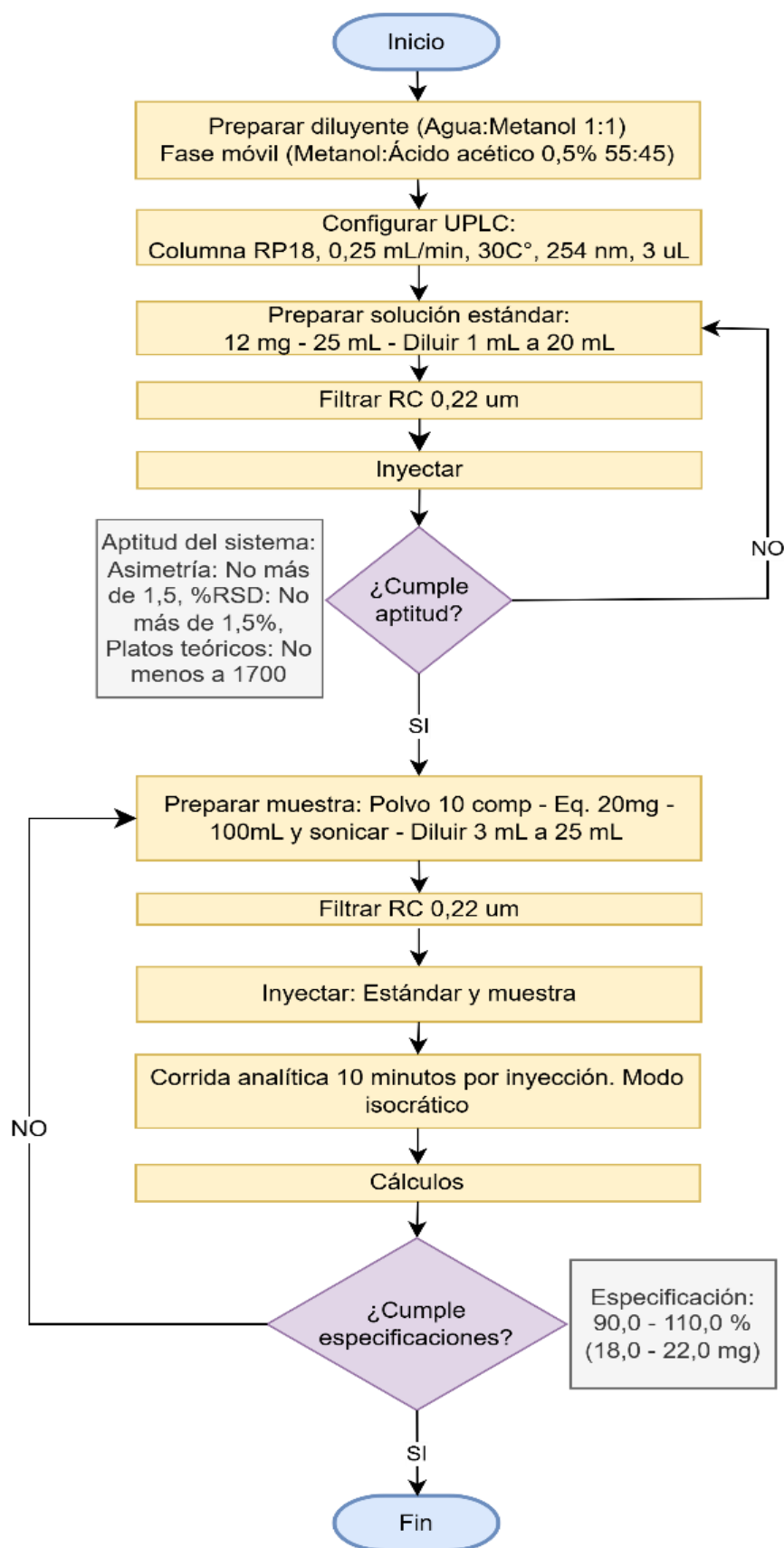


Figura 3.1 Diagrama de flujo general del procedimiento analítico de valoración de Ketorolaco Trometamina

3.2.3.1.2. Procedimiento de los parámetros de verificación

A. Especificidad

Determinación de interferencia de excipientes

Procedimiento:

Preparación de soluciones de estándar de Compuesto relacionado A, B, C y D de Ketorolaco:

Concentración: 0,250 µg/mL de Compuesto relacionado A, B, C, D de Ketorolaco en solución estándar.

Se pesaron aproximadamente 5,000 mg de cada uno de los Compuestos relacionados A, B, C y D de Ketorolaco en matraces volumétricos actínicos de 100 mL, preparándose cada solución por separado. A cada matraz se añadió diluyente, se sometió la mezcla a ultrasonido hasta lograr la completa disolución, se diluyó a volumen con el mismo diluyente y se homogenizó, obteniéndose las soluciones madre individuales. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 0,5 mL de cada solución madre de los compuestos relacionados y 5 mL de la solución madre de Ketorolaco Trometamina a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. La mezcla se llevó a volumen con diluyente, se homogenizó y se filtró a través de una membrana RC de 0,22 µm de porosidad. Finalmente, la solución obtenida se inyectó en el sistema cromatográfico.

Preparación de la solución muestra placebo (por triplicado)

Nota: Se preparó un placebo de polvo con los excipientes sin el principio activo.

Se pesaron 160,0 mg de placebo y se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta la completa disolución. Posteriormente, se enrasó con la misma solución diluyente y se homogenizó.

De esta preparación, se tomó una alícuota de 3 mL, la cual se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL y se diluyó a volumen con solución diluyente. La solución se homogenizó, se filtró a través de una membrana RC de 0,22 µm de porosidad y finalmente se inyectó en el sistema cromatográfico.

Preparación de la solución muestra

Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente.

Se pesaron 160,0 mg de placebo y 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de la solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se enrasó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó.

De esta preparación, se tomó una alícuota de 3 mL, la cual se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Finalmente, la solución se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y se procedió a inyectar en el sistema cromatográfico.

Determinación de interferencia por reacciones inducidas

Con el propósito de evaluar la capacidad del método UPLC para discriminar el analito frente a posibles productos de degradación, se realizó el estudio de interferencia por reacciones inducidas, sometiendo las soluciones a condiciones controladas de estrés químico y térmico.

Se analizaron las soluciones de estándar, placebo y muestra fortificada, preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el método analítico.

Posteriormente, las soluciones fueron sometidas a las siguientes condiciones forzadas:

a) Degradación por termólisis

Las soluciones de estándar, placebo y muestra se sometieron a estufa a una temperatura de 80 °C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de exposición, las soluciones se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se homogenizaron y filtraron a través de una membrana de celulosa regenerada (RC) de 0,22 μm de porosidad. Finalmente, se inyectaron en el sistema cromatográfico bajo las mismas condiciones establecidas para el método.

b) Degradación por hidrólisis ácida

A cada una de las soluciones de estándar, placebo y muestra se le añadieron 1 mL de ácido clorhídrico 0,2 N. Las soluciones se colocaron en estufa a 80 °C durante 2 horas para inducir la degradación ácida. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se homogenizaron y filtraron a través de una membrana RC de 0,22 µm de porosidad y se inyectaron en el sistema UPLC.

c) Identificación por barrido espectral: Se sometieron la solución de estándar de Ketorolaco Trometamina, muestras de placebo y muestras de placebo más activo a un barrido espectral de arreglo de Diodos, UV 200 – 400 nm.

B. Linealidad

Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó en el intervalo comprendido entre el 60 % y el 140 % de la concentración nominal de trabajo (0,024 mg/mL), utilizando soluciones preparadas exclusivamente a partir del estándar de referencia de Ketorolaco Trometamina.

Tabla 3.2 Niveles de concentración para la linealidad del sistema

<i>Niveles de Concentración %</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>
60	0,0144
80	0,0192
100	0,0240
120	0,0288
140	0,0336

Preparación de la solución stock estándar

Concentración: 0,48 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente.

Se pesaron aproximadamente 12,0 mg de Ketorolaco Trometamina estándar de referencia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron aproximadamente 15 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó, obteniéndose una solución stock con una concentración aproximada de 0,48 mg/mL de Ketorolaco Trometamina.

Preparación de las concentraciones

A partir de la solución stock estándar, se prepararon las diferentes concentraciones correspondientes al 60 %, 80 %, 100 %, 120 % y 140 % de la concentración nominal

(0,024 mg/mL). Cada nivel se preparó por triplicado, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- **Concentración 60% (0,0144 mg/mL):** Se midieron 3,0 mL de la solución stock estándar utilizando una pipeta volumétrica y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución se filtró a través de una membrana de celulosa regenerada (RC) de 0,22 μm de porosidad y se inyectó en el sistema cromatográfico.
- **Concentración 80% (0,0192 mg/mL):** Se midió 1,0 mL de la solución stock estándar y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Posteriormente, la solución se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema UPLC.
- **Concentración 100% (0,0240 mg/mL):** Se midió 1,0 mL de la solución stock estándar y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución se filtró mediante membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.
- **Concentración 120% (0,0288 mg/mL):** Se midieron 3,0 mL de la solución stock estándar y se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Posteriormente, se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.
- **Concentración 140% (0,0336 mg/mL):** Se midieron 7,0 mL de la solución stock estándar y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Finalmente, la solución se filtró mediante membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema UPLC.

Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó en el intervalo comprendido entre el 80 % y el 120 % de la concentración nominal (0,024 mg/mL), mediante la preparación de muestras fortificadas con adición conocida de Ketorolaco Trometamina a la matriz placebo.

Tabla 3.3 Niveles de concentración para a linealidad del método

Niveles de Concentración %	Concentración (mg/mL)
80	0,0192
90	0,0216
100	0,0240
110	0,0264
120	0,0288

Preparación de las concentraciones

Cada nivel de concentración se preparó por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- **Concentración 80% (0,0192 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 164,0 mg de placebo y 16,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. De esta preparación, se midió una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.
- **Concentración 90% (0,0216 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 162,0 mg de placebo y 18,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. De esta preparación, se midió una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.

- **Concentración 100% (0,0240 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 160,0 mg de placebo y 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. De esta preparación, se midió una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.

- **Concentración 110% (0,0264 mg/mL):** Se preparó por triplicado. Se pesaron aproximadamente 158,0 mg de placebo y 22,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. De esta preparación, se midió una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.

- **Concentración 120% (0,0288 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 156,0 mg de placebo y 24,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. De esta preparación, se midió una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema cromatográfico.

C. Precisión

La precisión del método UPLC para la valoración de Ketorolaco Trometamina se evaluó mediante estudios de repetibilidad y precisión intermedia, conforme a los lineamientos establecidos en la USP <1226> e ICH Q2(R1).

Repetibilidad del sistema (Aptitud del sistema)

La repetibilidad instrumental se evaluó mediante inyecciones consecutivas de la solución estándar a la concentración nominal de trabajo (0,024 mg/mL), con el fin de verificar la estabilidad del sistema cromatográfico antes del análisis de muestras.

- **Preparación de solución estándar de Ketorolaco trometamina:** Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente. Se pesaron aproximadamente 12,0 mg de Ketorolaco Trometamina estándar de referencia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron aproximadamente 15 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó cuidadosamente.

A partir de esta solución madre, se tomó una alícuota de 1,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó, obteniéndose una solución final con concentración aproximada de 0,024 mg/mL.

La solución se filtró a través de una membrana de celulosa regenerada (RC) de 0,22 μ m de porosidad y se realizaron seis inyecciones consecutivas en el sistema UPLC.

Repetibilidad del método

- **Preparación de la solución estándar:** La solución estándar se preparó conforme al procedimiento descrito anteriormente para la repetibilidad del sistema, asegurando la misma concentración nominal (0,024 mg/mL).
- **Preparación de la solución muestra (n=10):** Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente. Para cada determinación se pesó una cantidad de polvo equivalente a 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina (aproximadamente 180 mg de polvo). Cada pesada se realizó de manera independiente. Cada porción pesada se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron aproximadamente 50 mL de

solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó cuidadosamente. A partir de cada preparación, se tomó una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Cada solución se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y se inyectó individualmente en el sistema cromatográfico.

Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó considerando la variabilidad introducida por diferentes analistas y diferentes días de análisis, manteniendo constantes el método, el equipo y las condiciones cromatográficas.

- **Preparación de la solución estándar:** Cada analista preparó de manera independiente la solución estándar. Se pesaron aproximadamente 12,0 mg de Ketorolaco Trometamina estándar de referencia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron 15 mL de solución diluyente, se sometió a ultrasonido hasta su completa disolución y se diluyó a volumen con el mismo diluyente. Posteriormente, se transfirió 1,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 20 mL, se diluyó a volumen con solución diluyente, se homogenizó y se filtró mediante membrana RC de 0,22 μm antes de la inyección.
- **Preparación de las soluciones muestra:** Cada analista preparó diez muestras independientes. Se pesaron una cantidad de polvo equivalente a 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina y se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente, se sometieron a ultrasonido hasta disolución completa, se diluyeron a volumen y se homogenizaron. Posteriormente, se transfirieron 3,0 mL a un matraz volumétrico actínico de 25 mL, se diluyó a volumen con solución diluyente, se homogenizaron y se filtraron a través de una membrana RC de 0,22 μm antes de la inyección.

D. Exactitud

La exactitud del método UPLC para la valoración de Ketorolaco Trometamina se evaluó mediante estudios de recuperación por adición conocida del principio activo a la matriz placebo, conforme a los lineamientos establecidos en la USP <1226> e ICH Q2(R1). El estudio se realizó en tres niveles de concentración: 80 %, 100 % y 120 % de la concentración nominal (0,024 mg/mL), preparándose cada nivel por triplicado.

Preparación de solución estándar de Ketorolaco trometamina: Concentración: 0,024 mg/mL de Ketorolaco Trometamina en diluyente. Se pesaron aproximadamente 12,0 mg de Ketorolaco Trometamina estándar de referencia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron aproximadamente 15 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó cuidadosamente, obteniéndose una solución madre.

A partir de esta solución, se tomó una alícuota de 1,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó, obteniéndose una solución estándar con concentración aproximada de 0,024 mg/mL. La solución se filtró a través de una membrana de celulosa regenerada (RC) de 0,22 µm de porosidad y se utilizó para el análisis cromatográfico.

Preparación de las concentraciones

Para cada nivel de concentración (80 %, 100 % y 120 %), se prepararon tres muestras independientes mediante la adición conocida de Ketorolaco Trometamina a la matriz placebo, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- **Nivel 80% (0,0192 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 164,0 mg de placebo y 16,0 mg de Ketorolaco Trometamina, los cuales se transfirieron conjuntamente a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron aproximadamente 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución del principio activo. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó. A partir de esta preparación, se

tomó una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL. Se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución obtenida se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y se inyectó en el sistema cromatográfico.

- **Nivel 100% (0,0240 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 160,0 mg de placebo y 20,0 mg de Ketorolaco Trometamina y se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta su completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. Se transfirieron 3,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico actínico de 25 mL, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó. La solución final se filtró mediante membrana RC de 0,22 μm y se inyectó en el sistema UPLC.
- **Nivel 120 % (0,0288 mg/mL):** Se pesaron aproximadamente 156,0 mg de placebo y 24,0 mg de Ketorolaco Trometamina y se transfirieron a un matraz volumétrico actínico de 100 mL. Se añadieron 50 mL de solución diluyente y la mezcla se sometió a ultrasonido hasta lograr la completa disolución. Posteriormente, se diluyó a volumen con la misma solución diluyente y se homogenizó cuidadosamente. Se tomó una alícuota de 3,0 mL y se transfirió a un matraz volumétrico actínico de 25 mL, se diluyó a volumen con solución diluyente y se homogenizó nuevamente. La solución se filtró a través de una membrana RC de 0,22 μm de porosidad y se inyectó en el sistema cromatográfico.

E. Cálculo de la incertidumbre de medida

La estimación de la incertidumbre de medición del método cromatográfico UPLC para la valoración de Ketorolaco Trometamina se realizó conforme a las directrices establecidas en la guía EURACHEM en cumplimiento de los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017, que establece la obligatoriedad de identificar, cuantificar y reportar la incertidumbre asociada a los resultados analíticos cuantitativos.

El mensurando se definió como el contenido de Ketorolaco Trometamina expresado en mg por comprimido recubierto, determinado a partir de la respuesta cromatográfica obtenida por UPLC y referida a un patrón de referencia certificado. El modelo matemático empleado considera las variables críticas del procedimiento analítico, incluyendo la

respuesta instrumental del analito y del estándar, el peso del patrón, su potencia certificada, los volúmenes de aforo y alícuotas, así como el peso promedio de la muestra analizada.

Las fuentes de incertidumbre fueron identificadas mediante un análisis causa-efecto (diagrama de Ishikawa), agrupándose en componentes de tipo A y tipo B. Las contribuciones de tipo A incluyeron la repetibilidad del método y la precisión intermedia, evaluadas estadísticamente a partir de los resultados experimentales. Las contribuciones de tipo B consideraron la incertidumbre asociada a la calibración de la balanza analítica, la exactitud del material volumétrico, la pureza y potencia del estándar de referencia y la estabilidad del sistema cromatográfico.

Cada componente fue cuantificado y convertido a incertidumbre estándar relativa. La incertidumbre combinada (u^c) se obtuvo mediante la suma cuadrática de todas las contribuciones individuales, de acuerdo con el modelo matemático definido. Finalmente, la incertidumbre expandida (U) se calculó aplicando un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 %, permitiendo expresar el resultado analítico de forma completa, trazable y técnicamente sustentada.

3.2.3.1.3. Recursos

Equipos:

- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UPLC) con arreglo de diodos
 - **Marca:** Waters
 - **Modelo:** UPLC H-CLASS
 - **Serie:** PUR-UPLCHACX-05

- Baño ultrasónico
 - **Marca:** COLE-PALMER
 - **Modelo:** 08895-76
 - **Serie:** ETO11335F0006

- Campana de extracción (Sorbona)
 - **Marca:** STE DIAMANLAB
 - **Serie:** 3751-00000100

- Balanza analítica
 - **Marca:** Sartorius
 - **Modelo:** MSA524S-100-DI
 - **Serie:** 32507876

- Microbalanza analítica
 - **Marca:** Sartorius
 - **Modelo:** MCA125S-2S00-I
 - **Serie:** 0043802675

Insumos y materiales:

- Pipetas:
 - 1mL
 - 3mL
 - 7mL

- Matraces volumétricos:
 - 20mL
 - 25mL
 - 100mL

- Filtros RC
 - **Marca:** FINETECH
 - **Diámetro:** 25mm
 - **Porosidad:** 0,2um

- Columna cromatográfica:
 - **Marca:** ACQUITY UPLC BEH SHIELD (RP18)
 - **Serie:** 1953117518305
 - **Lote:** 195311751
 - **Clasificación USP:** L1
 - **Tamaño de partícula:** 1,7 µm

- **Longitud:** 100 mm
- **Diámetro interno:** 2,1 mm

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC
 - **Marca:** J.T. BAKER
 - **Lote:** J33W61
 - **Pureza:** 99,990%

- Metanol grado HPLC
 - **Marca:** J.T. BAKER
 - **Lote:** J19W31
 - **Pureza:** 99,974%

- Ácido Acético Glacial
 - **Marca:** J.T. BAKER
 - **Lote:** J03W68
 - **Pureza:** 99,980%

- Agua tipo 1

- Estándar de referencia de Ketorolaco Trometamina
 - **Marca:** Sigma Aldrich
 - **Lote:** LRAD1038
 - **Pureza:** 99,7

Elementos de seguridad:

- Bata de laboratorio.
- Guantes de Nitrilo.
- Gafas de seguridad.

3.2.3.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante la verificación del método cromatográfico UPLC para la valoración de Ketorolaco Trometamina se realizó con el

objetivo de evaluar objetivamente el desempeño analítico del procedimiento bajo las condiciones reales del laboratorio. Los análisis se efectuaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en la USP <1226>, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Para el análisis descriptivo se calcularán la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para evaluar la precisión del método en los distintos niveles de concentración (bajo, medio y alto); adicionalmente, el porcentaje de recuperación (%R) y el porcentaje de error (%E) se emplearán para determinar la exactitud del método, valorando su cercanía al valor teórico esperado en cada condición evaluada.

Los parámetros evaluados mediante herramientas estadísticas incluyeron la linealidad, precisión (repetibilidad e intermedia) y exactitud, mientras que la especificidad se evaluó mediante criterios cualitativos y cromatográficos.

En la siguiente tabla se muestran los criterios de decisión que realizan en cada parámetro de verificación:

Tabla 3.4 Criterios de decisión a cada parámetro de verificación

Prueba	Criterio de decisión	Conclusión
Linealidad		
Coefficiente de correlación Pearson (r)	$r \geq 0.995$ Aceptamos H_0	Las variables si están correlacionadas
	$r < 0.995$ Rechazamos H_0	Las variables no presentan correlación
Coefficiente de determinación (R²)	$R^2 \geq 0.990$	El método es lineal en el rango de trabajo
	$R^2 < 0.990$	El método no es lineal en el rango de trabajo
Análisis de residuales	La distribución de los residuales es aleatoria	El método es lineal en el rango de trabajo
Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk	Si $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$)	Se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no son normales
	Si $p \geq \alpha$ ($\alpha = 0,05$)	Se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos son normales
	Si $p < \alpha$ ($\alpha = 0,05$)	

Análisis de varianza de regresión (ANOVA de significancia)	Rechazamos Ho	Ho: No existe relación lineal entre X y Y (la pendiente de la recta de regresión es cero) H1: Sí existe relación lineal entre X y Y (la pendiente es diferente de cero)
	Si $p \geq \alpha$ ($\alpha = 0,05$) Aceptamos Ho	
Especificidad		
Respuesta	Señal del analito no afectada por interferencias	El método es selectivo
Exactitud		
Recuperación	98-102% de recuperación	El método es exacto dentro de los límites aceptables
	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa $RSD \leq 2.00 \%$	Es aceptable
	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa $RSD > 2.00 \%$	No es aceptable
Precisión		
Análisis de desviación estándar relativa para la repetibilidad	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa $RSD \leq 2.00 \%$	Precisión aceptable.
	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa $RSD > 2.00 \%$	Precisión inadecuada.
ANOVA para precisión intermedia	Si $P < \alpha$ ($\alpha = 0,05$)	Se rechaza la hipótesis nula (Ho); al menos una media es diferente. La variabilidad es significativa, precisión inadecuada.
	Si $P \geq \alpha$ ($\alpha = 0,05$)	No hay evidencia suficiente para decir que las medias son distintas. La variabilidad está dentro de los límites aceptables, precisión adecuada.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

En el presente capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos durante la verificación del método analítico por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg.

Los resultados se evalúan en función de los criterios de aceptación establecidos en la farmacopea USP, específicamente en los capítulos generales <1226> y <621>, así como en la guía ICH Q2(R1) y los requisitos metrológicos de la norma ISO/IEC 17025:2017.

El análisis se estructura considerando la comparación de las condiciones analíticas del método UPLC respecto al método farmacopeico original, seguida de la evaluación de los parámetros de desempeño analítico: precisión (repetibilidad y precisión intermedia), linealidad, exactitud y especificidad, complementados con su interpretación estadística y técnica.

4.1. Equivalencia analítica del método UPLC frente a la USP: condiciones, preparación y criterios de aceptación

La adaptación del método farmacopeico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a tecnología UPLC se realizó considerando estrictamente los ajustes permitidos por el capítulo general USP <621>.

La USP establece que el cambio de equipo tecnológico es aceptable siempre que se mantenga la equivalencia analítica, la selectividad y la aptitud del sistema. En este estudio, la fase estacionaria utilizada corresponde a la clasificación USP L1, equivalente a la especificada en la monografía oficial, variando únicamente el tamaño de partícula, la longitud y el diámetro interno de la columna, dentro de los límites permitidos.

El método UPLC empleó una columna ACQUITY BEH Shield RP18 (100 mm × 2,1 mm; 1,7 µm), flujo de 0,250 mL/min y volumen de inyección de 3,0 µL, mientras que el método USP especifica columna 250 mm × 4,6 mm; 5 µm, flujo 1,2 mL/min y volumen de inyección de 100 µL.

El cálculo de la relación longitud/tamaño de partícula (L/dp) mostró que el valor obtenido (58,8) se encuentra dentro del rango de -25 % a +50 % permitido por la USP, garantizando que la eficiencia cromatográfica se mantiene equivalente al método original. Asimismo, el ajuste del flujo se realizó de acuerdo con la ecuación oficial de la USP para mantener la velocidad lineal constante, evitando alteraciones en la selectividad.

La reducción del volumen de inyección a 3,0 µL se consideró adecuada para columnas de diámetro reducido, evitando la sobrecarga de la columna y la distorsión de los picos cromatográficos. La longitud de onda de detección, el diluyente y los criterios de aceptación se mantuvieron sin modificaciones respecto al método farmacopeico.

La USP establece que la migración de HPLC a UPLC es aceptable siempre que se demuestre equivalencia cromatográfica mediante aptitud del sistema y mantenimiento de selectividad.

Además, Gupta et al. (2022) demostraron que la reducción del tamaño de partícula en UPLC incrementa la eficiencia sin alterar la selectividad cuando se conservan los parámetros geométricos equivalentes.

De forma similar, Pawar et al. (2022) reportaron que métodos RP-HPLC y UPLC para ketorolaco pueden considerarse equivalentes cuando la resolución y asimetría cumplen criterios regulatorios.

En conjunto, la comparación de condiciones analíticas demuestra que el método UPLC implementado cumple con los requisitos establecidos por la USP para considerarse un método equivalente al procedimiento oficial. Los resultados y cálculos detallados se especifican en el Apéndice A.

Tabla 4.1 Tabla de los cambios entre el método farmacopeico y el método verificado ajustado a los lineamientos farmacopeicos

ÍTEM	Método USP	Método para verificar	Dictamen
Equipo	HPLC	UPLC	
Fase móvil	Metanol, agua y ácido acético glacial (55:44:1)	Metanol: Ácido Acético 0,5% (55:45)	Aceptable
Diluyente	Metanol y agua (1:1)	Metanol y agua (1:1)	Aceptable
Longitud de onda	254 nm	254 nm	Aceptable
Columna	4,6 mm ×25 cm; relleno L1 de 5 µm	2,1 mm ×10 cm; relleno L1 de 1,7 µm	Aceptable
Velocidad de flujo	1,2 mL/min	0,250 mL/min.	Aceptable
Volumen de inyección	100 µL	3,0 µL	Aceptable
Solución estándar (Ketorolaco Trometamina)	24 µg/mL	24 ug/mL	Aceptable
Criterios de aceptación	90,0%–110,0%	90,0%–110,0%	Aceptable

4.2. Desempeño metrológico del método UPLC: precisión, exactitud, linealidad y especificidad

4.2.1. Especificidad

La especificidad es un parámetro crítico en la validación y verificación de métodos analíticos, ya que permite demostrar la capacidad del procedimiento para medir inequívocamente el analito de interés en presencia de otros componentes de la matriz, tales como excipientes, medios de disolución o posibles productos de degradación.

La especificidad del método se evaluó mediante el análisis de soluciones placebo, soluciones de estándar, muestras adicionadas y muestras sometidas a condiciones de estrés, con el objetivo de identificar posibles interferencias de excipientes o productos de degradación.

Los cromatogramas obtenidos mostraron ausencia de señales interferentes en el tiempo de retención del Ketorolaco Trometamina. Asimismo, se observó una adecuada separación entre el pico del analito y los posibles picos asociados a compuestos relacionados o productos de degradación, cumpliendo con los criterios de resolución establecidos por la USP <621>.

Resultados similares fueron reportados en la tesis de Hoyos Sánchez (2025), donde se validó un método espectrofotométrico UV/VIS para la cuantificación de captopril en perfiles de disolución. En dicho estudio, los espectros obtenidos para el estándar y la

matriz con principio activo mostraron máximos de absorción bien definidos (220 nm y 217 nm, según el pH), sin superposición significativa con las señales del placebo ni del medio de disolución. Además, los porcentajes de interferencia reportados fueron inferiores al 2 % en todos los medios evaluados (pH 1,2; 4,5 y 6,8), lo que respalda la capacidad del método para discriminar adecuadamente el analito en diferentes condiciones de pH. La concordancia entre ambos estudios sugiere que, tanto en métodos espectrofotométricos como cromatográficos, la evaluación de la especificidad frente a la matriz es un requisito indispensable para asegurar la confiabilidad de los resultados analíticos.

En consecuencia, el método UPLC es específico para la determinación de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg.

Tabla 4.2 Resultados del parámetro de selectividad del método UPLC

Evaluación	Descripción de la muestra	Resultado cromatográfico	Interferencia en tR del analito	Cumple / No cumple	Observación
Blanco (diluyente)	Diluyente sin analito	No se observan picos en el tiempo de retención del analito	No	Cumple	No existe señal interferente del sistema
Placebo	Excipientes sin principio activo	No se detectan picos en el tiempo de retención del Ketorolaco	No	Cumple	No hay interferencia de excipientes
Estándar	Ketorolaco Trometamina 0,024 mg/mL	Pico definido, simétrico y bien resuelto	No aplica	Cumple	Señal característica del analito
Muestra (placebo + activo)	Matriz con analito	Pico del analito claramente identificado	No	Cumple	Cuantificación sin interferencias
Estándar con impurezas	Estándar + compuestos relacionados A, B, C y D	Picos separados del analito. Resolución no menos de 1,5	No	Cumple	Adecuada separación de impurezas

Degradación térmica	Muestras a 80°C / 24 h	Posibles productos de degradación separados del analito	No	Cumple	Método estabilidad-indicativo
Degradación ácida	HCl 0,2 N / 80°C / 2 h	Picos de degradación no coeluyen con el analito	No	Cumple	No hay interferencia por degradación
Barrido espectral (DAD)	Ketorolaco Trometamina 0,024 mg/mL sometido a barrido espectral 200–400 nm	Espectro puro del analito sin superposición Purity angle < Purity threshold	No	Cumple	Confirmación de pureza espectral

4.2.2. Linealidad

4.2.2.1. Linealidad del Sistema

La linealidad del sistema se evaluó en un rango amplio de concentraciones, comprendido entre el 60 % y el 140 % de la concentración nominal.

El análisis de regresión lineal mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9987, indicando una excelente correlación entre la respuesta cromatográfica y la concentración del analito. El análisis de varianza de la regresión evidenció un valor $p < 0,05$, entonces la relación entre concentración y respuesta es estadísticamente significativa.

Adicionalmente, el análisis de residuos no mostró tendencias sistemáticas ni curvatura, lo que confirma la adecuación del modelo lineal en el rango evaluado. Por lo tanto, el sistema cromatográfico presenta una respuesta lineal adecuada.

Tabla 4.3 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del sistema.

LINEALIDAD DEL SISTEMA			
	Nivel	Concentración (mg/mL)	Areas
1	60%	0,014556	238309
2	80%	0,019408	268522

3	100%	0,024260	301862
4	120%	0,029112	329765
5	140%	0,033964	357418

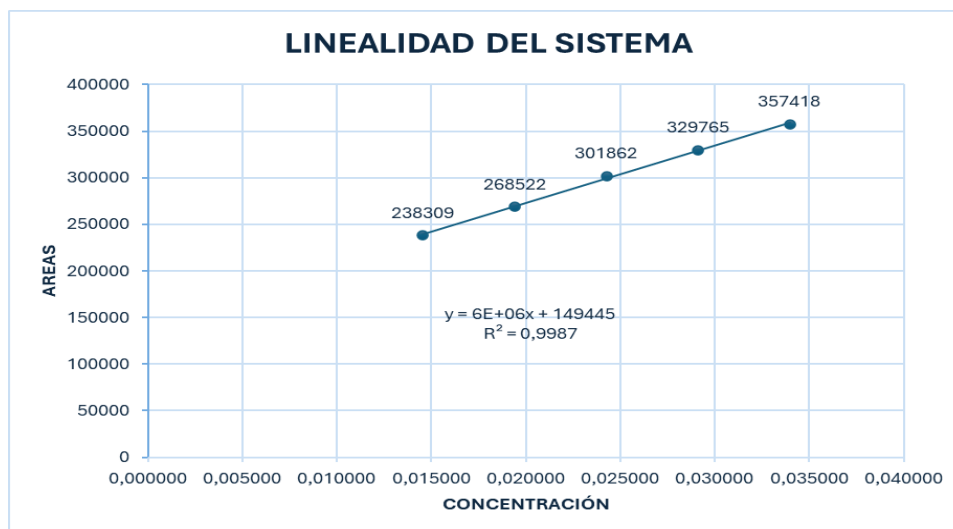


Figura 4.1 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del sistema.

Tabla 4.4 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la linealidad del sistema

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	8967649124	8967649124	2279,57	0,000
Error	3	11801739	3933913		
Total	4	8979450863			

4.2.2.2. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó en el rango comprendido entre el 80 % y el 120 % de la concentración de trabajo, utilizando muestras preparadas con adición del principio activo a la matriz placebo.

Tabla 4.5 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del método.

Nº	NIVEL %	AREAS	CONC REAL (mg/mL)
1	80	178546	0,01932
1	80	178166	0,01944
1	80	180927	0,01944
2	90	240794	0,02220

2	90	242101	0,02208
2	90	238397	0,02208
3	100	304006	0,02460
3	100	306307	0,02484
3	100	303975	0,02496
4	110	362308	0,02664
4	110	364261	0,02748
4	110	361512	0,02724
5	120	410875	0,02904
5	120	412442	0,02928
5	120	412045	0,02952

La ecuación de regresión obtenida presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9969, cumpliendo ampliamente con los criterios establecidos. Además, El análisis de varianza de la regresión evidenció un valor $p < 0,05$, entonces la relación entre concentración y respuesta es estadísticamente significativa.

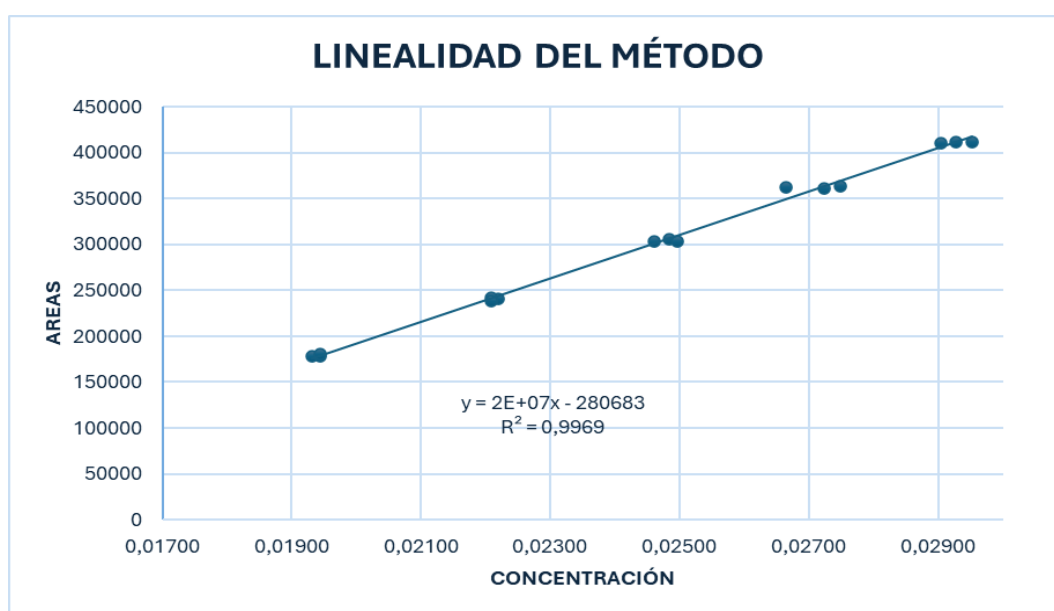


Figura 4.2 Resultados obtenidos de las áreas vs concentraciones obtenidas en el análisis para linealidad del método.

Tabla 4.6 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la linealidad del método.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	1,03461E+11	1,03461E+11	4179,77	0,000
Error	13	3,21785E+08	2,47527E+07		

Total	14	1,03782E+11
-------	----	-------------

4.2.2.3. Linealidad del sistema y la linealidad del método: análisis y contraste con estudios publicados

Los resultados obtenidos en la linealidad del sistema y la linealidad del método confirman que el método analítico por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) verificado para la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg presenta un comportamiento lineal adecuado dentro del rango de trabajo establecido. Los coeficientes de determinación obtenidos, superiores a 0,99 tanto para la linealidad del sistema como para la linealidad del método, evidencian una relación proporcional y estadísticamente significativa entre la concentración del analito y la respuesta cromatográfica, cumpliendo con los criterios exigidos por la USP y la guía ICH Q2.

Huerta León et al. (2024), obtuvieron curvas de calibración lineales dentro del rango de concentración evaluado, con coeficientes de determinación superiores a 0,99, lo que confirmó la idoneidad del método cromatográfico para la cuantificación precisa de nistatina en ungüento por cromatografía líquida. La similitud con los resultados obtenidos en el presente trabajo indica que la selección adecuada del rango de trabajo y la estabilidad del sistema analítico son factores clave para garantizar un comportamiento lineal reproducible.

Además, los resultados obtenidos en la linealidad para la determinación de Ketorolaco Trometamina son consistentes con lo reportado por Olivo et al. (2025), quienes validaron un método interno preciso mediante UHPLC/UV para la cuantificación de busulfán en plasma humano con fines de monitoreo terapéutico. En dicho estudio, las curvas de calibración construidas en un rango de concentración de 0,5 a 10 µg/mL mostraron coeficientes de determinación superiores a 0,99, demostrando una respuesta lineal del sistema cromatográfico incluso en una matriz biológica compleja como el plasma. Esta concordancia respalda que los sistemas UHPLC/UPLC, cuando se encuentran correctamente ajustados y verificados proporcionan respuestas lineales robustas y reproducibles en distintos rangos de concentración y tipos de matriz.

Así mismo, los resultados obtenidos en esta tesis se alinean con el estudio desarrollado por Grecco et al. (2019), quienes determinaron parabenos en muestras de leche materna mediante microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) acoplada a cromatografía líquida de ultra alto rendimiento. Los autores reportaron coeficientes de determinación superiores a 0,99, confirmando la linealidad del método propuesto. Cabe resaltar que, a pesar de tratarse de una matriz altamente compleja y de un procedimiento de preparación de muestra más exigente, la técnica UHPLC mantuvo un desempeño lineal adecuado, lo que evidencia la alta capacidad de estas tecnologías para conservar la proporcionalidad entre señal y concentración del analito.

Es decir, la adecuada linealidad obtenida en el método verificado respalda la validez del método UPLC para su aplicación rutinaria en el control de calidad farmacéutico, asegurando que pequeñas variaciones en la concentración del principio activo se reflejen de manera proporcional en la respuesta analítica. Esto es particularmente relevante para la valoración de Ketorolaco Trometamina, donde la exactitud del contenido declarado es crítica para garantizar la eficacia terapéutica y el cumplimiento de las especificaciones farmacopeicas.

4.2.3. Precisión

4.2.3.1. Repetibilidad del sistema

Se realizaron 6 inyecciones consecutivas de solución estándar de concentración 0,024 mg/mL y se evaluaron los requisitos de aptitud del sistema.

Tabla 4.6 Resultados obtenidos en las 6 inyecciones de estándar 0,024mg/mL y resultados de aptitud del sistema.

Inyección	Areas	Altura	Platos teóricos	Tailing
1	298190	48186	12969	1,1
2	299104	48117	13002	1,1
3	298174	48388	12962	1,1
4	299438	47993	12934	1,1
5	300307	48318	12852	1,1
6	300160	47928	12935	1,1
Promedio	299228,8333	48155	12942	1,1
DS	925,27799	179,46365		
%RSD	0,30922	0,37268		

4.2.3.2. Repetibilidad del método

La repetibilidad se evaluó mediante la realización de múltiples determinaciones independientes bajo condiciones idénticas de análisis. El valor promedio obtenido fue de 99,59% y los valores individuales se encuentran dentro del intervalo establecido de 90,0% - 110,0% de contenido de Ketorolaco Trometamina, con una desviación estándar relativa (%RSD) de 1,86 %, valor que se encuentra por debajo del límite máximo del 2,0 % establecido por la USP para ensayos de valoración.

Estos resultados evidencian una adecuada consistencia del método cuando se ejecuta en condiciones controladas, confirmando que la variabilidad es mínima y aceptable.

Tabla 4.7 Resultados de las recuperaciones obtenidas en el análisis de repetibilidad.

Repeticiones	Resultados
1	98,9%
2	98,6%
3	100,4%
4	99,6%
5	103,3%
6	99,6%
7	101,5%
8	99,6%
9	97,4%
10	97,0%
promedio	99,59%
DS	1,85679
% RSD	1,86443

4.2.3.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó considerando la variabilidad introducida por diferentes analistas y diferentes días de análisis, manteniendo constantes el método, el equipo y las condiciones cromatográficas.

Los resultados obtenidos mostraron valores promedio comprendidos entre 98,8 % y 100,0 %, con desviación estándar relativa (%RSD) inferiores al 2,0 % en todos los casos, cumpliendo con los criterios establecidos para ensayos de valoración según la USP.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los resultados arrojó un valor de p igual a 0,272, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). Este resultado indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas por los diferentes analistas y días de análisis, por lo que la variabilidad observada puede atribuirse al error experimental normal del método.

Con lo antes expuesto, el método UPLC presenta una precisión intermedia adecuada y reproducible bajo las condiciones reales del laboratorio.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en el análisis:

Tabla 4.8 Resultados de las recuperaciones obtenidas en el análisis de precisión intermedia entre analistas y en diferentes días.

	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
	ANALISTA		
DATOS	A	B	C
1	96,9	98,5	99,5
2	99,1	101,8	98,6
3	99,5	98,7	98,9
4	98,0	99,5	99,5
5	100,3	98,7	102,7
6	101,1	98,2	100,2
7	100,4	99,5	102,7
8	97,5	101,1	100,4
9	98,0	102,1	99,0
10	97,4	97,3	98,1
Promedio	98,8	99,5	100,0
DS	1,46120	1,61259	1,60014
% RSD	1,47865	1,62004	1,60078

Tabla 4.9 Resultados obtenidos en el análisis de varianza de la precisión intermedia.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Analista	2	6,648	3,324	1,37	0,272

Error	27	65,664	2,432
Total	29	72,312	

Se obtuvo un valor de $p = 0,272$ lo que significa que:

- No existen diferencias significativas entre analistas/días
- Precisión intermedia aceptable

Tabla 4.10 Resultados obtenidos en la prueba de normalidad de los analistas A, B y C.

Ítems	Analista A	Analista B	Analista C
Resultados p	0,421	0,234	0,085

4.2.3.4. Precisión: análisis y contraste con estudios publicados

La precisión del método UPLC verificado en la presente tesis fue evaluada mediante estudios de repetibilidad y precisión intermedia, de acuerdo con los lineamientos establecidos en la USP <1226> e ICH Q2(R1). Los resultados obtenidos mostraron valores de %RSD de 1,86 % para la repetibilidad y valores inferiores al 2,0 % para la precisión intermedia, sin diferencias estadísticamente significativas entre analistas y días de análisis (ANOVA, $p = 0,272$), lo que evidencia una variabilidad controlada y atribuible únicamente al error experimental normal del método.

Estos resultados son comparables con los reportados por Pawar et al. (2022), quienes desarrollaron y validaron un método RP-HPLC para la cuantificación de ketorolaco trometamina en materia prima y diversas formulaciones farmacéuticas. En dicho estudio, los autores informaron valores de %RSD intra-día entre 1,25 % y 1,58 % y %RSD inter-día entre 1,02 % y 1,52 %, todos dentro del criterio de aceptación de ICH Q2 (%RSD ≤ 2). Asimismo, la evaluación de la repetibilidad mediante cinco inyecciones consecutivas a 8 $\mu\text{g/mL}$ arrojó un %RSD de 0,22 %, reflejando una mínima variabilidad instrumental y una elevada estabilidad del sistema cromatográfico. Aunque este valor es inferior al observado en la presente tesis, la diferencia puede atribuirse a que Pawar et al. evaluaron únicamente la repetibilidad instrumental del estándar, mientras que en este estudio se evaluó la repetibilidad instrumental con 6 inyecciones de estándar y, además, se consideraron muestras de placebo más materia prima, incorporando variabilidad

asociada a la preparación de muestra y a la matriz farmacéutica, lo cual representa una evaluación más exigente y cercana a las condiciones reales de control de calidad.

Por otro lado, Chauhan, Bansal y Agrawar (2024) realizaron una validación de un método RP-HPLC estabilidad-indicativo para ketorolaco trometamina, en el cual los valores de %RSD para precisión intra-día e intermedia se mantuvieron por debajo del 2 % en todo el rango evaluado (5–30 µg/mL). Este estudio incorporó variaciones deliberadas de analista, equipo y condiciones cromatográficas (como por ejemplo el uso de una columna Inertsil ODS 3, 100mm X 2.1mm, 5µm), lo que refuerza la robustez de los resultados de precisión. En comparación, la presente tesis obtuvo resultados de precisión intermedia estadísticamente equivalentes, demostrando que el método UPLC verificado mantiene un desempeño reproducible incluso al migrar desde un método farmacopeico HPLC hacia una tecnología de mayor eficiencia analítica, sin comprometer la confiabilidad de los resultados (Chauhan, Bansal y Agrawal, 2024).

En un contexto metodológico distinto, Delgado et al. (2022) validaron tres métodos analíticos por espectrofotometría UV para la cuantificación de acetaminofén, evaluando la precisión a partir del Factor de Respuesta ($Fr = Abs/Conc$) y el Coeficiente de Variación porcentual (CV%) del sistema. Los autores establecieron como criterio de aceptación un $CV\% \leq 2\%$, obteniendo valores de 0,41 %, 1,00 % y 0,86 % para los tres métodos evaluados, respectivamente, concluyendo que todos presentan adecuada precisión tanto en términos de repetibilidad como de reproducibilidad. Aunque estos valores son numéricamente inferiores a los observados en métodos cromatográficos, es importante considerar que la espectrofotometría UV implica una menor complejidad instrumental y menor número de etapas críticas, lo que tiende a reducir la variabilidad global del sistema.

El contraste entre los estudios espectrofotométricos y cromatográficos pone de manifiesto que, si bien los valores absolutos de CV% o %RSD pueden variar en función de la técnica analítica empleada, del tipo de muestra y del diseño experimental, todos los métodos cumplen de manera consistente con los criterios regulatorios de precisión establecidos por ICH, USP y normativas oficiales. En este sentido, los resultados obtenidos en la verificación del método para la determinación de Ketorolaco Trometamina se encuentran plenamente alineados con la literatura científica y

demuestran que el método UPLC verificado presenta una precisión adecuada y confiable para su aplicación en el control de calidad farmacéutico, incluso bajo condiciones analíticas más exigentes y representativas del uso rutinario.

4.2.4. Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación por adición conocida del analito a la matriz placebo, en tres niveles de concentración: 80 %, 100 % y 120 % del valor nominal.

Las recuperaciones promedio obtenidas en los tres niveles se encontraron dentro del intervalo de 98,0 % a 102,0 %, con valores de %RSD inferiores al 2,0 %, cumpliendo con los criterios establecidos para ensayos de valoración de principios activos en formas farmacéuticas sólidas.

Estos resultados demuestran que el método no presenta sesgo sistemático y es capaz de cuantificar de manera veraz el contenido de Ketorolaco Trometamina en presencia de los excipientes de la formulación.

Tabla 4.11 Resultados obtenidos en el análisis de exactitud.

Ítems	80%	100%	120%
1	98,1%	98,4%	98,7%
2	100,3%	101,1%	98,0%
3	100,1%	99,7%	99,6%
PROMEDIO	99,5%	99,7%	98,8%
DS	1,20011	1,36650	0,79708
%RSD	1,20601	1,37008	0,80690

Las recuperaciones promedio obtenidas oscilaron entre 98,8 % y 99,7 %, con valores de %RSD inferiores al 2,0 %, cumpliendo con los criterios establecidos por la USP y la ICH Q2(R1) para ensayos de valoración.

Estos resultados son altamente concordantes con los reportados por Al Mamun et al. (2026), quienes informaron recuperaciones promedio de 99,96 % para esomeprazol y 99,934 % para ketorolaco trometamina en su método RP-HPLC validado. La similitud entre ambos estudios evidencia que, independientemente de la plataforma cromatográfica empleada (HPLC o UPLC), el procedimiento analítico permite cuantificar el principio activo sin sesgo sistemático significativo. la coincidencia en los valores de

recuperación indica que la adaptación del método farmacopeico a tecnología UPLC no introduce errores sistemáticos, manteniendo la trazabilidad del resultado analítico respecto al valor verdadero del mensurando. Esto es particularmente relevante en ensayos de valoración, donde la exactitud impacta directamente en la decisión de conformidad del lote.

Igualmente, Zavaleta Juárez et al. (2024) reportaron porcentajes de recuperación cercanos al 100 % en la validación de un método espectrofotométrico UV-visible para la cuantificación de alcaloides totales, con valores comprendidos dentro del rango aceptable de 98 % a 102 % y coeficientes de variación menores al 2 %. Aunque la técnica instrumental empleada difiere de la utilizada en el presente estudio, la coincidencia en los resultados de exactitud pone de manifiesto que la adecuada preparación de muestras y estándares, así como el control del procedimiento analítico, son determinantes para minimizar el error sistemático.

La exactitud demostrada por el método UPLC verificado confirma que el procedimiento es capaz de medir de manera veraz el contenido de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg, con un desempeño comparable al de métodos cromatográficos validados y reportados en la literatura científica, lo que respalda su aplicación en el control de calidad farmacéutico rutinario.

4.3. Incertidumbre de medición del procedimiento UPLC: fuentes de variabilidad y cuantificación

4.3.1. Cálculo de la incertidumbre de medición

4.3.1.1. Definición del mensurando

Contenido de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg (% del valor declarado).

Resultado promedio del método 99,59%.

4.3.1.2. Identificación de componentes de incertidumbre

Tabla 4.12 Tabla de Componentes y fuentes de incertidumbre

Componente	Fuente
u_1	Repetibilidad del método
u_2	Precisión intermedia

u_3	Balanza analítica
u_4	Material volumétrico
u_5	Potencia del estándar

4.3.1.3. Cálculo de cada componente

4.3.1.3.1. Incertidumbre por repetibilidad (Tipo A)

%RSD repetibilidad = 1,864%

n = 10

$$u_{rep} = \frac{1,864}{\sqrt{10}} = 0,589\% \quad (4.1)$$

4.3.1.3.2. Incertidumbre por precisión intermedia (Tipo A)

Desviación estándar agrupada del ANOVA:

s = 1,559 %

n = 30

$$u_{int} = \frac{1,559}{\sqrt{30}} = 0,285\% \quad (4.2)$$

4.3.1.3.3. Incertidumbre de la balanza (Tipo B)

Incertidumbre: $\pm 0,1$ mg

Distribución rectangular

$$u_{bal} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,058\% \quad (4.3)$$

4.3.1.3.4. Incertidumbre del material volumétrico (Tipo B)

Matraces clase A:

- Incertidumbre combinada: 0,12 %

$$u_{vol} = 0,12\% \quad (4.4)$$

4.3.1.3.5. Incertidumbre del material volumétrico (Tipo B)

Certificado del estándar:

Potencia: 99,7 %

Incertidumbre: $\pm 0,3$ %

$$u_{std} = \frac{0,3}{\sqrt{3}} = 0,173\% \quad (4.5)$$

4.3.1.3.6. Tabla de componentes de incertidumbre

Fuente de incertidumbre	Tipo	Valor (%)	u_i^2
Repetibilidad	A	0,589	0,347
Precisión intermedia	A	0,285	0,081
Balanza analítica	B	0,058	0,003
Material volumétrico	B	0,120	0,014
Estándar de referencia	B	0,173	0,030
Suma cuadrática			0,475

4.3.1.3.7. Incertidumbre combinada

$$u_c = \sqrt{0,475} = 0,689\% \quad (4.6)$$

4.3.1.3.8. Incertidumbre expandida (k = 2)

$$U = 2 \times 0,689 = 1,38\% \quad (4.7)$$

4.3.1.3.9. Expresión final del resultado

Contenido de Ketorolaco Trometamina = 99,59 % \pm 1,38 % (k = 2; 95 % IC)

4.3.2. Análisis de la incertidumbre de medición frente a investigaciones publicadas.

La incertidumbre de medición obtenida para el método UPLC verificado refleja de manera integral la variabilidad inherente al procedimiento analítico aplicado a la valoración de Ketorolaco Trometamina en comprimidos recubiertos de 20 mg. El análisis evidenció que las principales contribuciones a la incertidumbre total corresponden a la preparación de soluciones (pesadas y aforos), la precisión intermedia del método y la variabilidad instrumental asociada a la respuesta cromatográfica.

La incertidumbre combinada calculada permitió determinar una incertidumbre expandida que se mantiene dentro de valores aceptables para ensayos de valoración farmacéutica,

considerando los límites de especificación establecidos por la USP (90,0 % – 110,0 %). Este resultado indica que la variabilidad analítica no compromete la capacidad del método para discriminar adecuadamente entre resultados conformes y no conformes, incluso cuando los valores obtenidos se aproximan a los límites de aceptación.

Resultados similares han sido reportados por Toro (2024), quien estimó la incertidumbre en métodos cromatográficos HPLC aplicados a productos farmacéuticos, concluyendo que la mayor contribución proviene de la preparación de soluciones y de la precisión intermedia, mientras que la contribución del sistema cromatográfico resulta comparativamente menor cuando se cumplen los criterios de aptitud del sistema. De manera concordante, Ellison (2020) señalan que, en métodos cromatográficos cuantitativos, la incertidumbre global suele estar dominada por factores metrológicos previos a la inyección, más que por la respuesta instrumental propiamente dicha.

Asimismo, EURACHEM (2012) destaca que la inclusión de la incertidumbre de medición en métodos de control de calidad farmacéutico fortalece la toma de decisiones regulatorias, ya que permite evaluar la conformidad del producto considerando la variabilidad analítica real. En este sentido, la incertidumbre estimada en el presente estudio respalda la confiabilidad del método UPLC verificado y su idoneidad para su aplicación rutinaria en la liberación de lotes y estudios de estabilidad.

En consecuencia, la estimación de la incertidumbre de medición confirma que el método UPLC no solo cumple con los parámetros clásicos de verificación (precisión, exactitud, linealidad y especificidad), sino que también satisface los requisitos metrológicos exigidos por la norma ISO/IEC 17025, aportando solidez técnica y regulatoria a los resultados reportados.

CAPÍTULO 5

5.1. CONCLUSIONES

La comparación sistemática entre el método UPLC implementado y el procedimiento farmacopeico descrito en la USP demostró equivalencia analítica conforme a los ajustes permitidos por el capítulo general <621>. El cálculo de la relación longitud/tamaño de partícula (L/dp) evidenció que el valor obtenido para la columna UPLC (≈ 59) se mantiene dentro del intervalo de -25% a $+50\%$ respecto al método original (50), cumpliendo los criterios regulatorios establecidos. Asimismo, los ajustes en flujo y volumen de inyección se realizaron conforme a las ecuaciones oficiales de la USP para mantener la velocidad lineal y evitar sobrecarga de columna, preservando la selectividad y la eficiencia cromatográfica. Los criterios de aptitud del sistema ($\%RSD$ del estándar $\leq 2,0\%$, asimetría $\leq 2,0$ y número de platos ≥ 1700) fueron satisfechos, confirmando que la migración tecnológica de HPLC a UPLC mejoró la eficiencia analítica sin comprometer la confiabilidad del procedimiento. En consecuencia, el método UPLC es congruente con la monografía farmacopeica y apto para su aplicación rutinaria en el control de calidad de Ketorolaco Trometamina 20 mg.

El método UPLC verificado demostró un desempeño analítico robusto bajo las condiciones reales del laboratorio. La especificidad fue confirmada mediante la ausencia de interferencias del placebo y de productos de degradación en el tiempo de retención del analito, evidenciando adecuada resolución cromatográfica conforme a USP <621>. La linealidad del sistema ($R^2 = 0,9987$) y del método ($R^2 = 0,9969$) mostró una relación proporcional y estadísticamente significativa entre concentración y respuesta ($p < 0,05$), cumpliendo con ICH Q2. La precisión presentó $\%RSD$ de $1,86\%$ en repetibilidad y valores inferiores al $2,0\%$ en precisión intermedia, sin diferencias significativas entre analistas o días (ANOVA, $p = 0,272$), lo que confirma variabilidad controlada. La exactitud evidenció recuperaciones promedio entre $98,8\%$ y $99,7\%$, con $\%RSD < 2,0\%$, demostrando ausencia de sesgo sistemático. En conjunto, los resultados verifican que el método cumple los criterios de desempeño establecidos por USP <1226> e ICH Q2, garantizando respuesta proporcional, reproducibilidad y veracidad para la valoración rutinaria del producto terminado.

La estimación de la incertidumbre de medición, desarrollada conforme a las directrices de EURACHEM y en cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025:2017, permitió cuantificar de manera integral la variabilidad total del procedimiento del método UPLC. La incertidumbre combinada se obtuvo mediante la suma cuadrática de los componentes tipo A y tipo B, identificándose como principales contribuyentes la repetibilidad, la precisión intermedia y la preparación de soluciones (pesadas y aforos), mientras que la contribución instrumental resultó comparativamente menor. La incertidumbre expandida obtenida ($99,59 \% \pm 1,38 \%$, $k = 2$; 95 % de confianza) se mantiene dentro de límites aceptables para ensayos de valoración farmacéutica, sin comprometer la decisión de conformidad frente al intervalo farmacopeico de 90,0 % – 110,0 %. Este resultado refuerza la trazabilidad metrológica del resultado, la confiabilidad de la conformidad frente a los límites especificados y la idoneidad del método UPLC para sustentar decisiones técnicas relacionadas con liberación de lotes y estudios de estabilidad bajo condiciones reales de laboratorio.

5.2. RECOMENDACIONES

Incorporar de manera sistemática la estimación y revisión periódica de la incertidumbre de medición, especialmente ante cambios en equipos, columnas cromatográficas, analistas o condiciones operativas, para asegurar el cumplimiento continuo de la norma ISO/IEC 17025.

Realizar estudios complementarios de robustez, evaluando variaciones deliberadas en parámetros críticos (flujo, temperatura de columna, composición de la fase móvil), con el fin de fortalecer aún más la evidencia de estabilidad. Se recomienda incorporar la evaluación del efecto matriz como un estudio complementario dentro de la verificación del método analítico, con el fin de fortalecer la evidencia de que los excipientes no afectan la cuantificación del analito. Extender la aplicación del enfoque de verificación utilizado en este estudio a otros métodos farmacopeicos que sean migrados de HPLC a UPLC dentro del laboratorio, utilizando este trabajo como modelo técnico y documental.

Promover la capacitación continua del personal analítico en temas de verificación de métodos, análisis estadístico e incertidumbre de medición, fortaleciendo la competencia técnica del laboratorio y la confiabilidad de los resultados reportados.

6. Referencias

- Al Mamun, A., Badal, M. M. R., & Maniruzzaman, M. (2026). Development and validation of method for determination of esomeprazole and ketorolac tromethamine in combined drug by RP-HPLC. *BMC Chemistry*, 20, 20. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01705-w>
- Albuquerque, R. D. D. G. de, Ganoza-Yupanqui, M. L., León-Vargas, F. R., Ramos-Rivas, Y. V. S., Carrasco-Montañez, D., & Córdova-Horna, S. (2025). UPLC-MS/MS analysis and phenolic/flavonoid content of *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. rhizomes, an ethnomedicinal resource from American rain forests. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 163–170. <https://doi.org/10.7764/ijanr.v52i3.87374>
- Allen, L. V., Jr., & Ansel, H. C. (2020). *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems* (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. Obtenido de: *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 10th Ed.pdf* - Google Drive
- Alonso Cerda, M. J. (2021). Implementación de metodología analítica por UPLC-MS/MS y molecular por PCR y su aplicación en monitorización farmacocinética y farmacogenética de carbamazepina y topiramato. Estudio en pacientes con epilepsia [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7373>
- Andrade Acosta, G. A., Ostos Ramírez, L. N., Uzcátegui Bacco, M., & Bor, M. (2025). Desarrollo de formulaciones de tabletas de ketorolaco trometamina. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 88(2), 357–370. <https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.2.18>
- Aulton, M., y Taylor, K. (2017). *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines* (5th ed.). Elsevier.
- Basharat, R., Kotra, V., Loong, L. Y., Mathews, A., Kanakal, M. M., Praveena Devi, C. B., Nyamathulla, S., Varala, R., Ming, L. C., Sambasiva Rao, K. R. S., Babu, B. H., & Alam, M. M. (2021). Ultra performance liquid chromatography (Mini-review).

Oriental Journal of Chemistry, 37(4), 847–857.
<https://doi.org/10.13005/ojc/370411>

Bhongale, A., Kadam, P., Pansare, P., & Sapre, T. (2023). A review on drug ketorolac. International Journal of Creative Research Thoughts, 11(12). <https://www.ijcrt.org>

Caiza López, L. E. (2022). Validación de un método para la cuantificación simultánea de valsartán e hidroclorotiazida en tabletas mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento [Proyecto de titulación de maestría, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/57446>

Chaudhary, A. (21 de 08 de 2025). Columnas HPLC y su función en la separación de compuestos. Obtenido de EEPHRO: Columnas HPLC y su función en la separación de compuestos - Veeprho

Chauhan, A., Bansal, M. y Agrawal, D. (2024). Method Development and Validation for the estimation of Ketorolac Tromethamine by RP-HPLC and UV-Spectroscopy. Chemistry Research Journal, 9(3), 63-73. Obtenido de <https://chemrj.org/download/vol-9-iss-3-2024/chemrj-2024-09-03-63-73.pdf>

Delgado Gómez, B. S., López Espinosa, N. L., Castro Oso, V., y Zuñiga Lemus, O. (2022). Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry. *Ars Pharmaceutica*, 63(2), 152–165. <https://doi.org/10.30827/ars.v63i2.21983>

EURACHEM. (2012). *Quantifying uncertainty in analytical measurement* (3rd ed.). Eurachem.

Ellison, S. L. R. (2020). Measurement uncertainty and conformity assessment in analytical measurement—Considerations for the university curriculum. *Proceedings*, 55, 17. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020055017>

Grecco, C. F., Souza, I. D., Acquaro Junior, V. R., & Queiroz, M. E. C. (2019). Determination of parabens in breast milk samples by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(1), 48–59. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180151>

- Gupta, M. K., Ghuge, A., Parab, M., Al-Refaei, Y., Khandare, A., Dand, N., & Waghmare, N. (2022). A comparative review on high-performance liquid chromatography (HPLC), ultra performance liquid chromatography (UPLC) & high-performance thin layer chromatography (HPTLC) with current updates. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 35(4), 224–228. <https://doi.org/10.2478/cipms-2022-0039>
- Hoyos Sánchez, N. J. (2025). Validación de método Espectrofotométrico UV/VIS según lineamientos USP para captopril 25 mg a partir de perfiles de disolución. [Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Norbert Wiener]. <https://hdl.handle.net/20.500.13053/15072>
- Huerta León, J. R., Kanashiro Chinen, L., Quiroz Delgado, D., & Samaniego Joaquin, J. W. (2024). Validación de método por cromatografía de alta resolución para cuantificar nistatina en ungüento. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 53(2), e024021632. <https://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/e024021632>
- International Organization for Standardization & International Electrotechnical Commission. (2017). *ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* (3.^a ed., versión corregida 2018-03, traducción oficial). ISO. <https://www.iso.org/standard/66912.html>
- Joint Committee for Guides in Metrology. (2023). *Guide to the expression of uncertainty in measurement — Part 1: Introduction* (JCGM GUM-1:2023, 1st ed.). JCGM. <https://www.bipm.org>
- Moldoveanu, S. C., y David, V. (2025). *Method Development in Analytical HPLC*. Amsterdam: Elsevier.
- Mou, S. S., Afrin, S., Islam, R., Al-Mamun, E., & Fatema-Tuz-Zohora. (2024). In-vitro assessment of quality control specifications for ketorolac tromethamine tablets marketed in Bangladesh. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 12(6), 223–228. <https://doi.org/10.15406/ppij.2024.12.00457>
- Olivo, L. B., Corrêa, G. G., Dias, B. B., Corrêa, J. A. R. A., Schweinberger, B. M., Carmo, R. L., Daudt, L. E., Dalla Costa, T., & Araujo, B. V. (2025). Validation of an ultra-high performance liquid chromatography/UV method to quantify busulfan in

- plasma: Application to therapeutic drug monitoring. *einstein* (São Paulo), 23, eAO0964. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2025AO0964
- Organización Mundial de la Salud. (2011). *Control de calidad en laboratorios farmacéuticos* (Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957, Anexo 1). Organización Mundial de la Salud.
- Orosco Cepeda, A. V. (2022). *Identificación y cuantificación del ketorolaco como posible principio activo de un medicamento de identidad dudosa* [Examen complejo, Universidad Técnica de Machala]. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/18684>
- Otto, F., Propisnova, V., Urjasz, H., Lewandowski, K., Sarnowski, K., Szalek, E., & Karbownik, A. (2026). Development of a UPLC-MS/MS method and its application for the pharmacokinetic analysis of regorafenib in rats. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-026-38418-6>
- Patil, V. G., Patil, T. R., Dhankani, M. A., Dhankani, A. R., & Pawar, S. P. (2023). *A review on ultra high performance liquid chromatography method*. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*, 11(6). <https://doi.org/10.22214/ijraset.2023.53541>
- Pawar, S., Punekar, A., Gosavi, S., Gorde, P., & Harak, S. (2022). Development and validation of RP-HPLC method for determination of ketorolac tromethamine from bulk and pharmaceutical formulations. *International Journal of Health Sciences*, 6(S2), 14440–14447. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS2.8782>
- Kamal, S., & Sharad, W. (2018). Step-up in liquid chromatography from HPLC to UPLC: A comparative and comprehensive review. *The Pharma Innovation Journal*, 7(8), 342–347. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2018/vol7issue8/PartF/7-8-17-791.pdf>
- Shinde, V. (31 de mayo de 2024). Estándares farmacopeicos: garantizar la calidad y la seguridad en la atención sanitaria. <https://veeprho.com/es/estandares-farmacopeicos-garantizar-la-calidad-y-la-seguridad-en-la-atencion-sanitaria/>

Soto Coaquira, V. E. (2016). Estudio comparativo de la concentración de principio activo de ketorolaco 10 mg tableta en muestras genérica y comercial [Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica]. <https://hdl.handle.net/20.500.12990/1303>

Toro Mayorga, J. (2024). Desarrollo y validación del método analítico para cuantificación de acetaminofen, ácido acetilsalicílico y bromhexina en un producto farmacéutico en solución oral por cromatografía líquida HPLC. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/60174/T-110567%20FCNM%20-%20POSTG-012%20-%20Proyecto%20de%20%20%20Jimena%20Toro%20Mayorga.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

United States Pharmacopeial Convention. (2017). (1225) Validación de procedimientos farmacopeicos. En United States Pharmacopeia and National Formulary (USP–NF). https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_02

United States Pharmacopeial Convention. (2019). (1226) Verificación de procedimientos farmacopeicos. En United States Pharmacopeia and National Formulary (USP–NF). https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_02

United States Pharmacopeial Convention. (2025). (621) Cromatografía. En USP–NF. https://doi.org/10.31003/USPNF_M99380_09_02

World Health Organization WHO (2019). *Technical Report Series: Quality Assurance of Pharmaceuticals*. WHO Technical Report Series | WHO - Prequalification of Medical Products (IVDs, Medicines, Vaccines and Immunization Devices, Vector Control)

Zavaleta Juárez, Milagritos Elizabeth, Castillo Saavedra, Ericson Felix, La Cunza Méndez, Anthony Daniel, Noriega Oblitas, Julissa Marycarmen, y Reyes Alfaro, Cecilia Elizabeth. (2024). Validación (International Conference on Harmonisation, 2014) de un método analítico para la cuantificación de alcaloides totales. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 53(2), . Epub 25 de agosto de 2024. Recuperado en 09 de febrero de 2026, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572024000200011&lng=es&tlng=es

7. Apéndices y anexos

7.1. Apéndice A: Equivalencia del método UPLC con los lineamientos de la USP

Equipo

La USP establece que el sistema instrumental puede cambiar siempre que:

- La fase estacionaria siga siendo equivalente.
- Se mantenga la aptitud del sistema.
- Se mantenga la selectividad.

La USP no restringe el cambio de equipo tecnológico (HPLC → UPLC). Es uno de los cambios más comunes y totalmente permitidos.

Fase móvil

USP permite: “Ajustes de la composición de la fase móvil: $\pm 30\%$ relativo en componentes minoritarios y $\pm 10\%$ absoluto en cualquier componente.”

El ácido acético en el método USP es un componente minoritario ($< 1\%$). Sustituir 1% por $0,5\%$ NO cambia la naturaleza ácida

Tamaño de partícula y longitud

USP permite cambiar tamaño de partícula y longitud si:

“La relación L/dp permanece dentro del intervalo de -25% a $+50\%$.”

Se calcula:

Método USP

$$L/dp = 250 \text{ mm} / 5 \mu\text{m} = 50$$

Método UPLC

$$L/dp = 100 \text{ mm} / 1.7 \mu\text{m} \approx 59$$

Comparación:

59 está dentro del rango permitido (-25% a $+50\%$):

$$50 - 25\% = 37,5$$

$$50 + 50\% = 75$$

Diámetro interno

USP <621> permite explícitamente: “Se puede ajustar el diámetro interno incluso sin cambio de L o dp .” Por lo tanto, 4,6 mm \rightarrow 2,1 mm es totalmente aceptable.

Volumen de inyección

3 μ L está por debajo del volumen equivalente USP, por lo tanto:

- No genera sobrecarga de columna
- No distorsiona picos

Flujo

Método USP:

1.2 mL/min

Método UPLC

0.250 mL/min

Es aceptable porque está ajustado según la ecuación oficial USP para mantener la velocidad lineal:

$$F_2 = F_1 \frac{dc_2^2 dp_1}{dc_1^2 dp_2} \quad (7.1)$$

Cuando se aplica esta fórmula a la tabla, el flujo de 0,25 mL/min es razonable y dentro de USP.

Además, USP permite ± 50 % de ajuste en flujo luego del ajuste geométrico.

7.2. Apéndice B: Cromatogramas pertenecientes a solución estándar y solución placebo (sin activo)

Especificidad

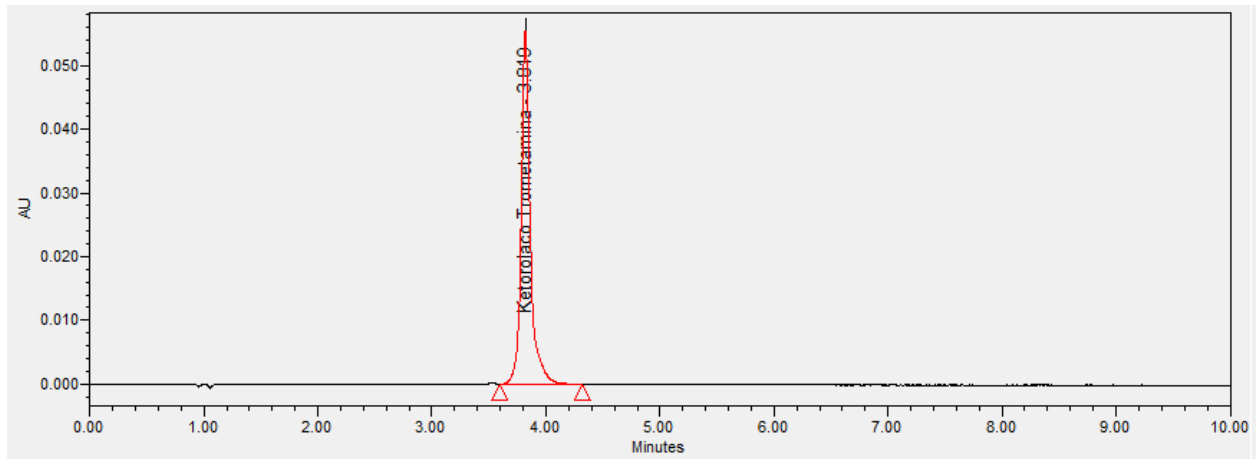


Figura B.1 Cromatograma del estándar de Ketolaco Trometamina 0,024mg/mL

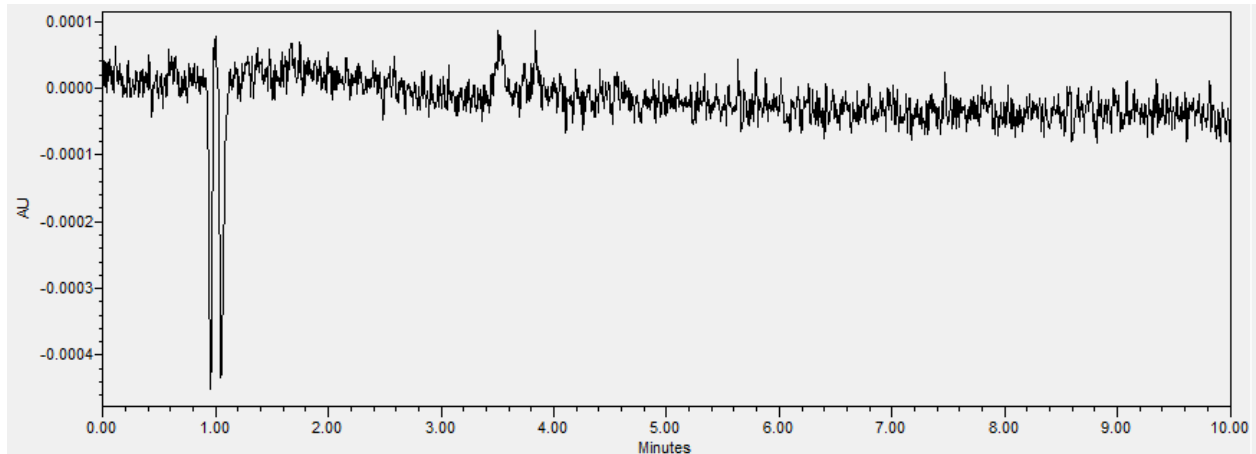


Figura B.2 Cromatograma de placebo sin activo

7.3. Apéndice C: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la linealidad del sistema

Linealidad del sistema

Análisis de regresión lineal

La ecuación de regresión es

$$\text{Areas} = 149445 + 149730 \text{ Nivel}$$

Tabla 7.1 Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)
1983,41	99,87%	99,82%

Tabla 7.2 Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	8967649124	8967649124	2279,57	0,000
Error	3	11801739	3933913		
Total	4	8979450863			

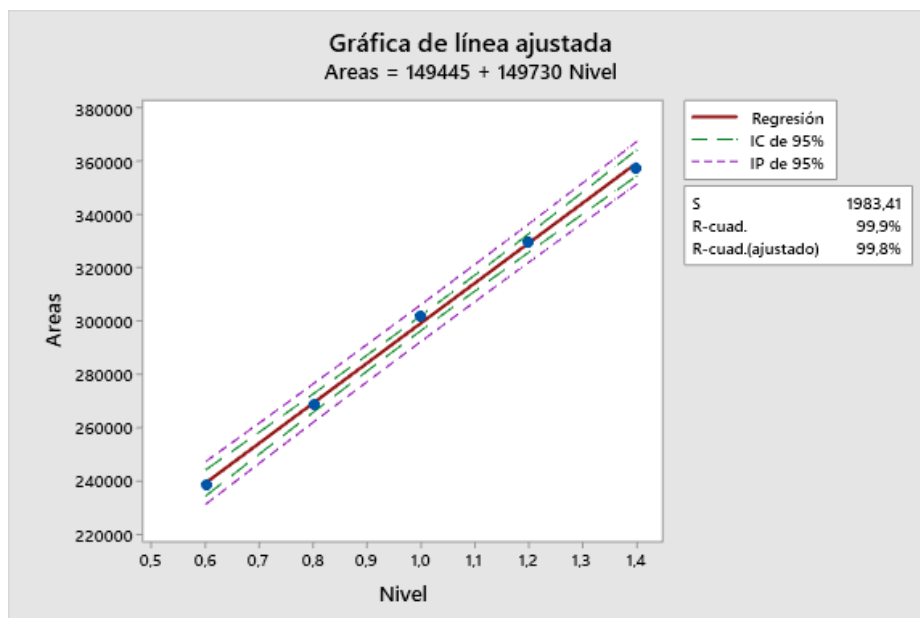


Figura C.1 Gráfica de regresión lineal de la linealidad del sistema.

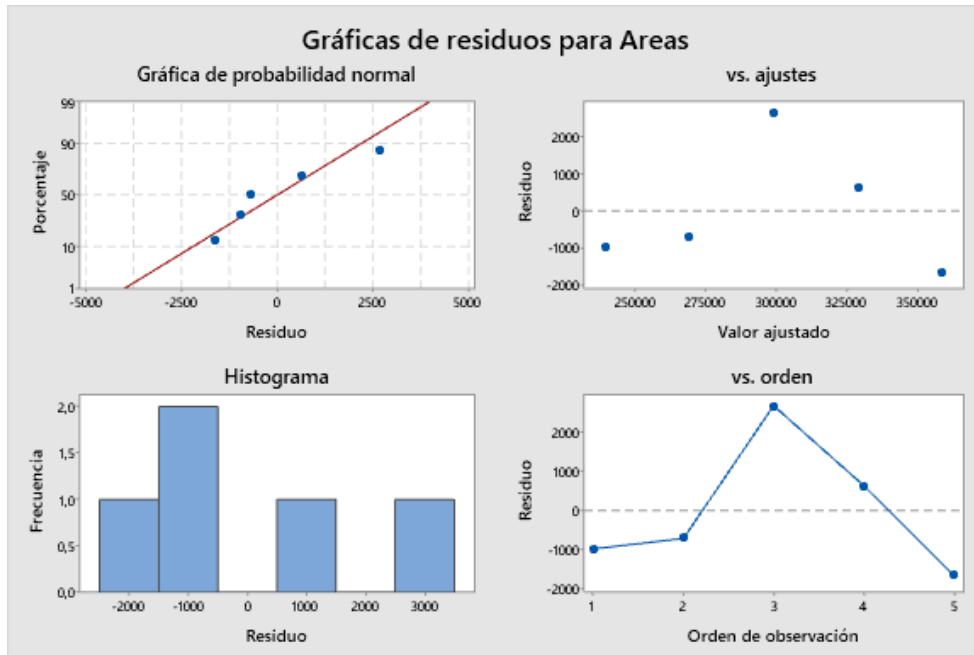


Figura C.2 Gráfica de residuos para las áreas obtenidas en la linealidad del sistema.

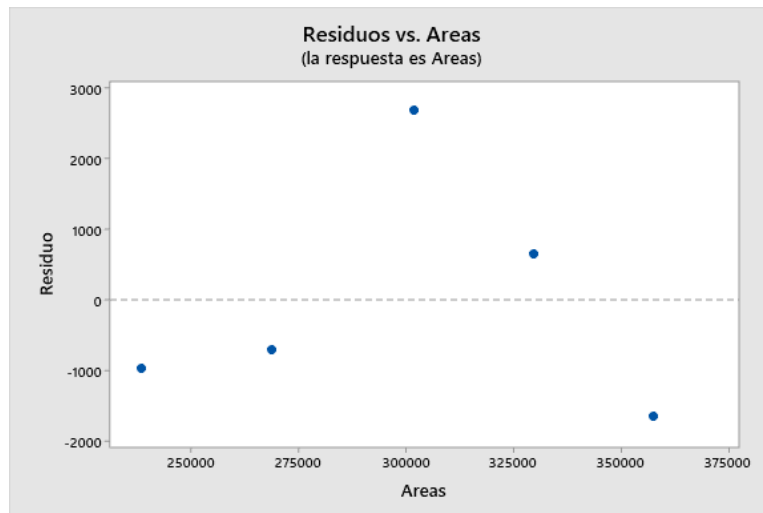


Figura C.3 Residuos vs áreas

Normalidad de los residuos

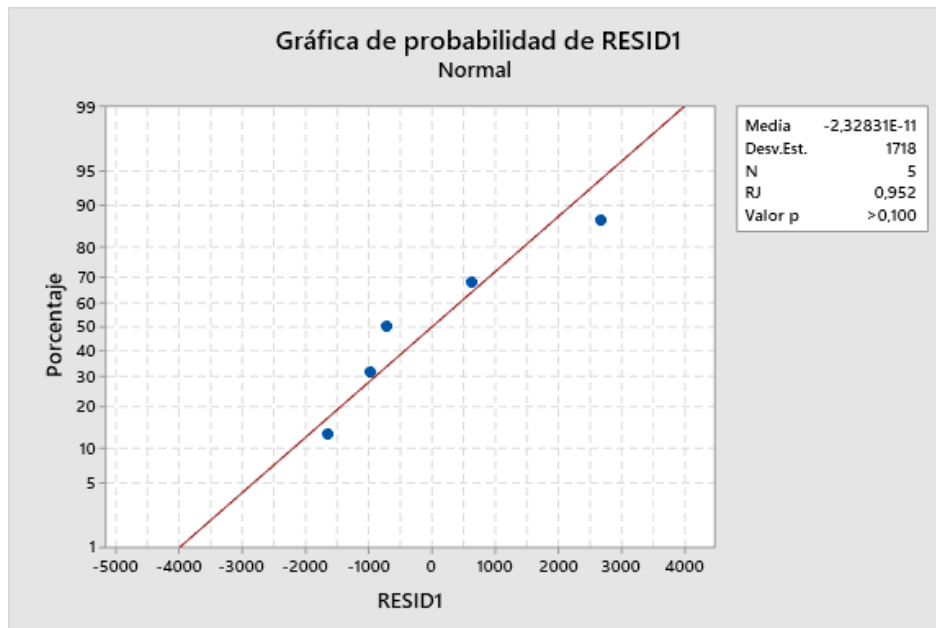


Figura C.4 Gráfica de probabilidad de residuos

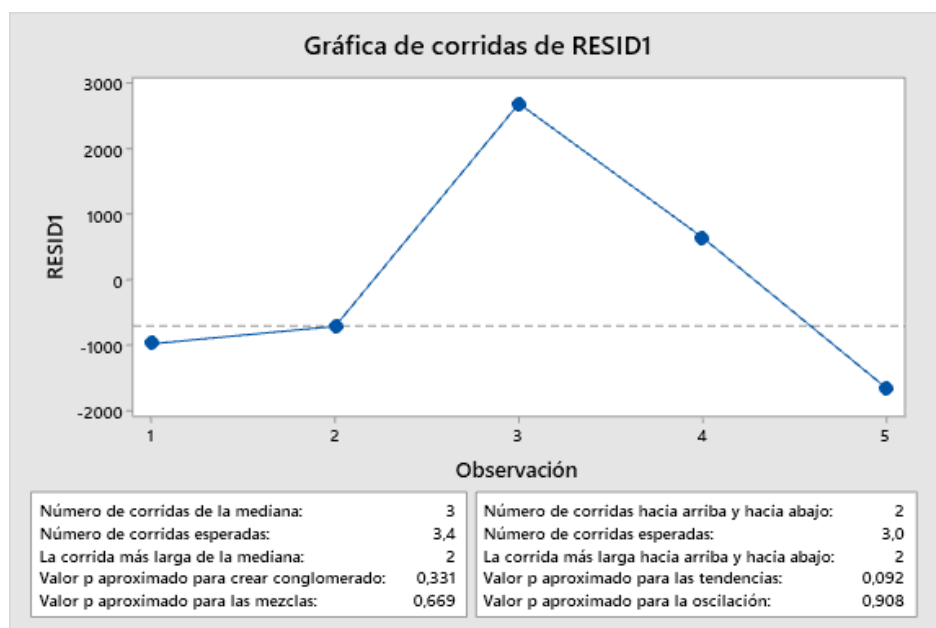


Figura C.5 Gráfica de corrida de residuos

7.4. Apéndice D: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la linealidad del método

Tabla 7.3 Tabla de resultados Linealidad del método

	Nivel	80%	90%	100%	110%	120%
LINEALIDAD	1	178546	240794	304006	362338	410875
	2	178166	242101	306307	364261	412442
	3	180927	238397	303975	361512	412045
	PROMEDIO	179213	240430,667	304762,667	362703,667	411787,333
	DS	1496,4782	1878,53995	1337,52171	1410,50854	814,657188
	% RSD	0,8350277	0,78132294	0,43887321	0,38888731	0,19783445

La ecuación de regresión es

$$\text{AREAS} = - 280683 + 23649774 \text{ CONC REAL (mg/mL)}$$

Tabla 7.4 Tabla de Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)
4975,21	99,69%	99,67%

Tabla 7.5 Tabla de Resultados Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	1,03461E+11	1,03461E+11	4179,77	0,000
Error	13	3,21785E+08	2,47527E+07		
Total	14	1,03782E+11			

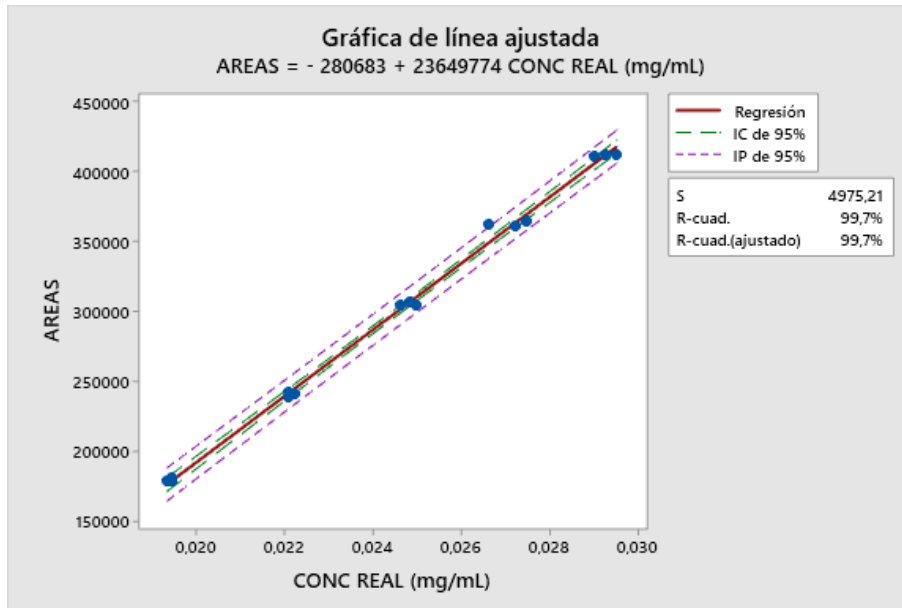


Figura D.1 Gráfica de regresión lineal de la linealidad del método

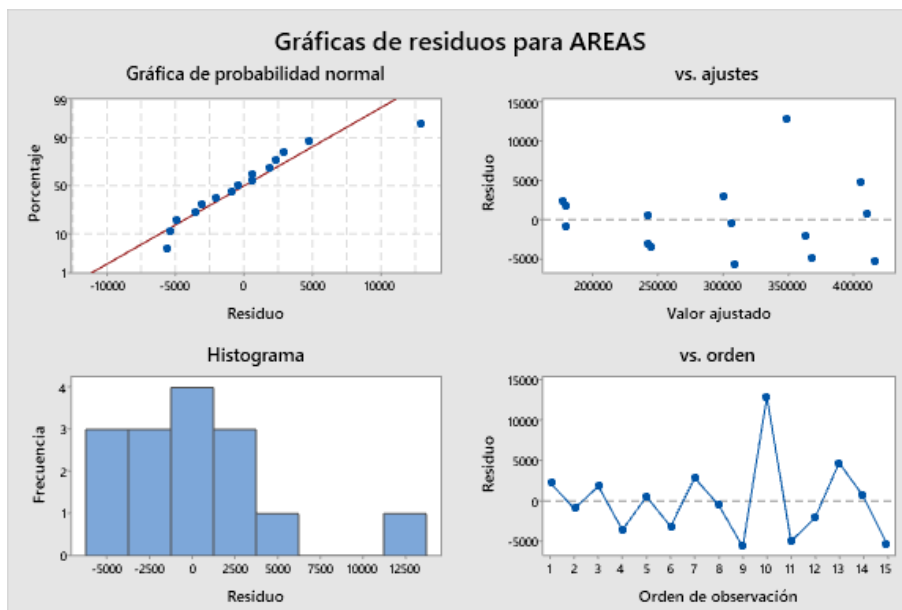


Figura D.2 Gráfica de residuos para las áreas obtenidas en la linealidad del método

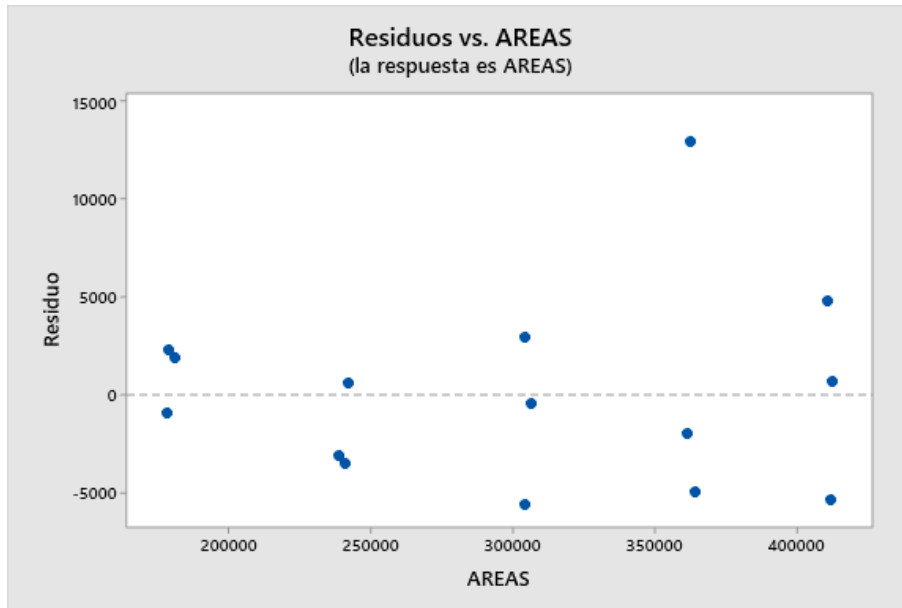


Figura D.3 Residuos vs áreas

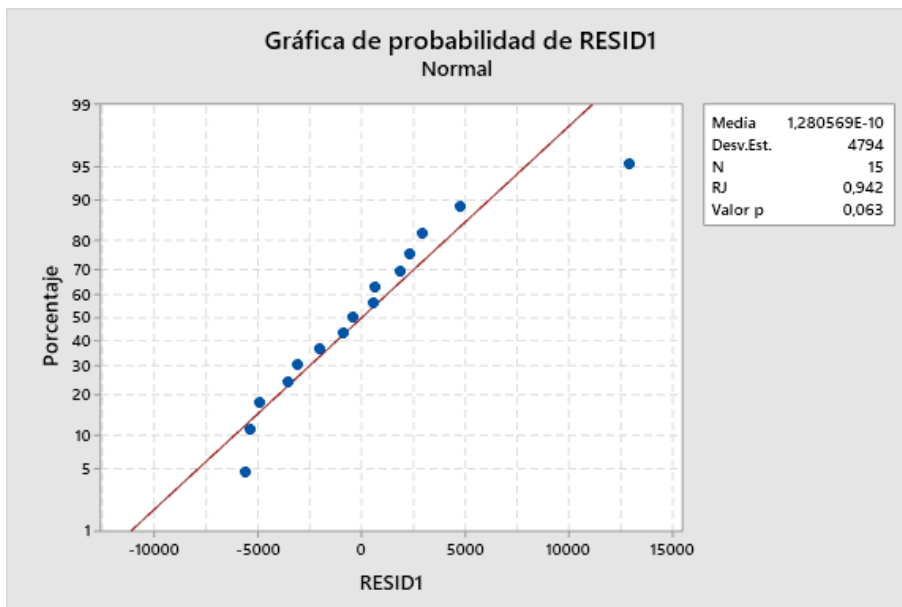


Figura D.4 Gráfica de probabilidad de residuos

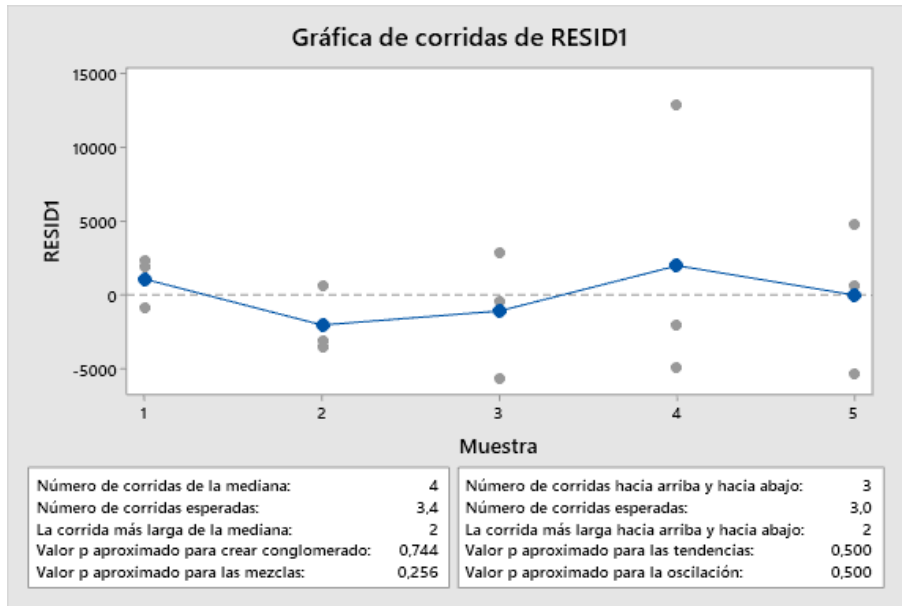


Figura D.5 Gráfica de corridas de residuos

7.5. Apéndice E: Resultados y gráficas de los análisis estadísticos de la precisión intermedia

Precisión Intermedia

Tabla 7.6 Tabla de Resultados de Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ANALISTA	2	6,648	3,324	1,37	0,272
Error	27	65,664	2,432		
Total	29	72,312			

Tabla 7.7 Tabla de Medias obtenidas de la precisión intermedia

ANALISTA	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
A	10	98,820	1,461	(97,808; 99,832)
B	10	99,540	1,613	(98,528; 100,552)
C	10	99,960	1,600	(98,948; 100,972)

Tabla 7.8 Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,55949	9,19%	2,47%	0,00%

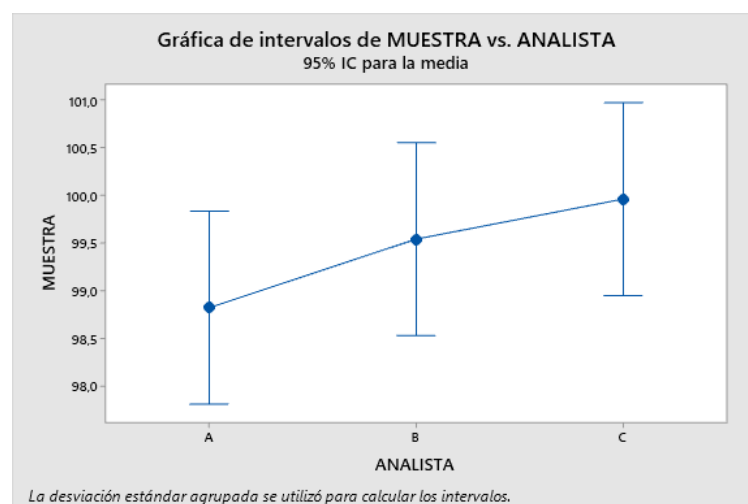


Figura E. 1 Gráfica de intervalos de muestra vs analista.

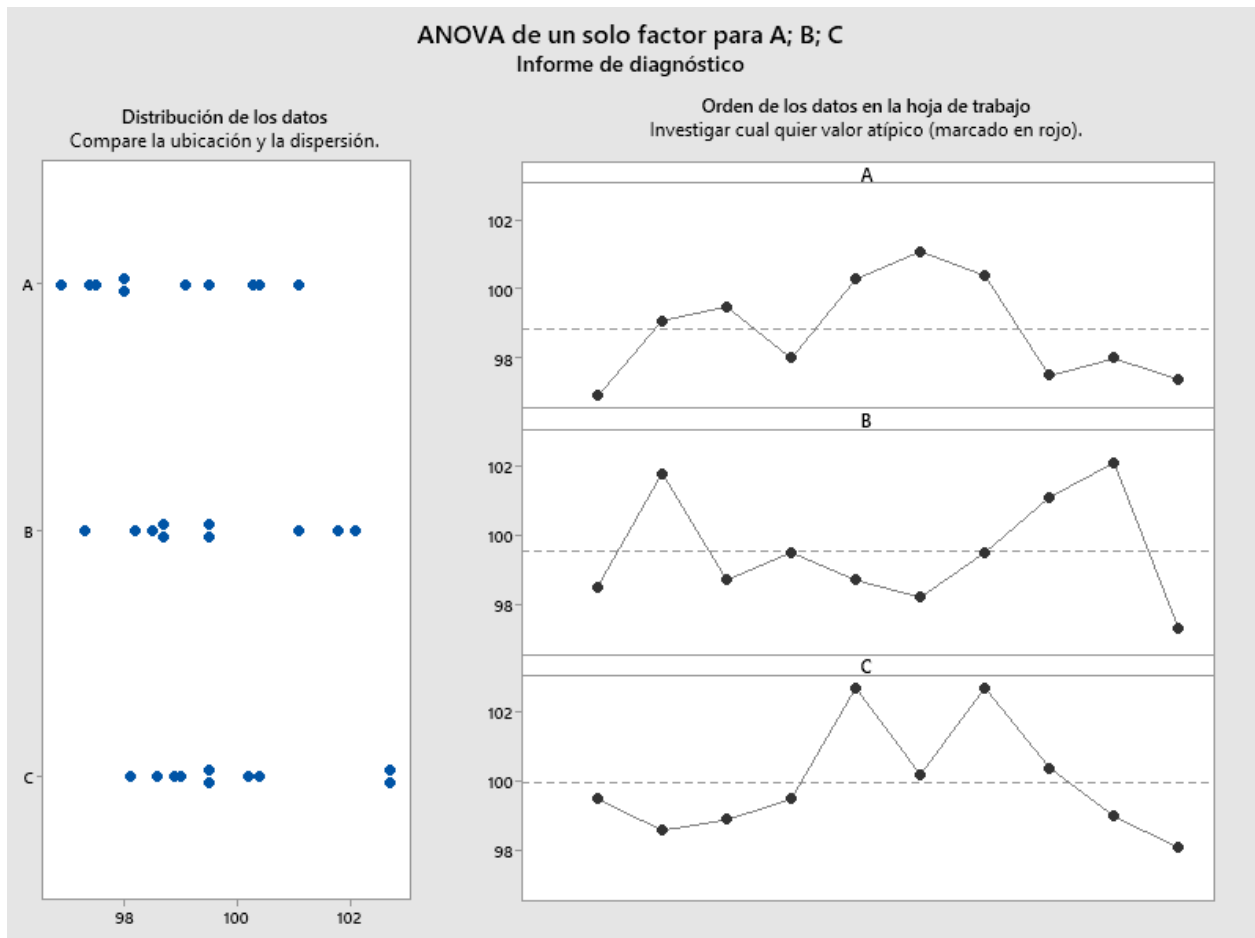


Figura E.2 Gráfica de ANOVA de un solo factor para analista A, B y C.

Pruebas de normalidad

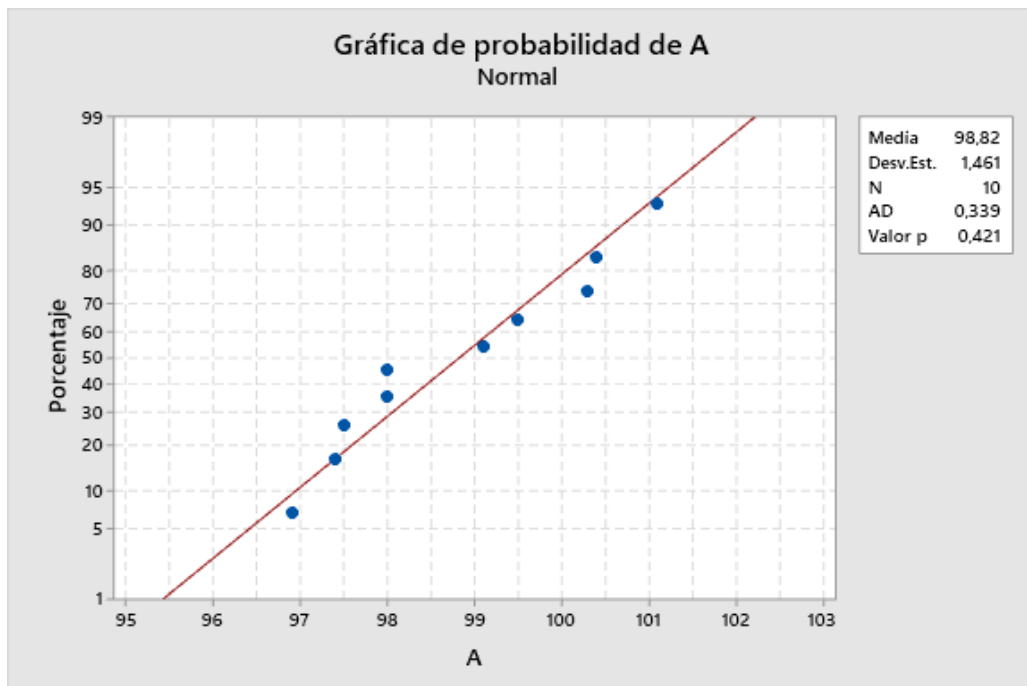


Figura E.3 Gráfica de probabilidad de analista A

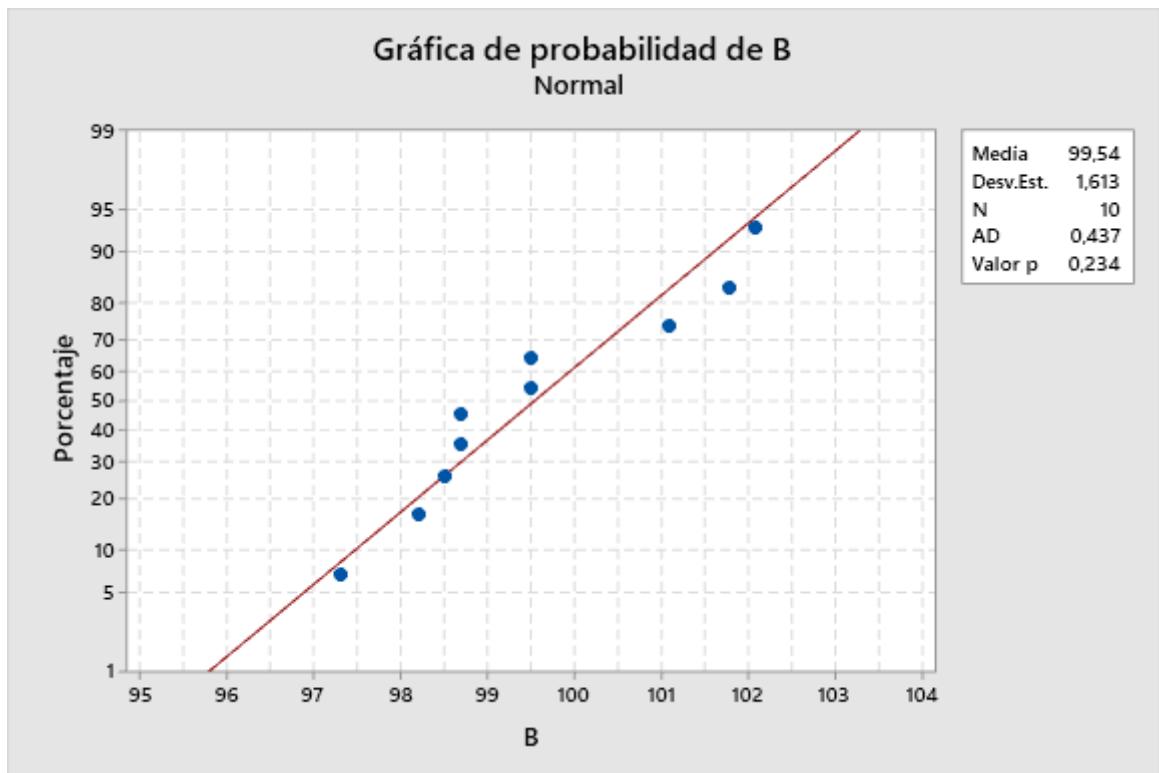


Figura E.4 Gráfica de probabilidad de analista B

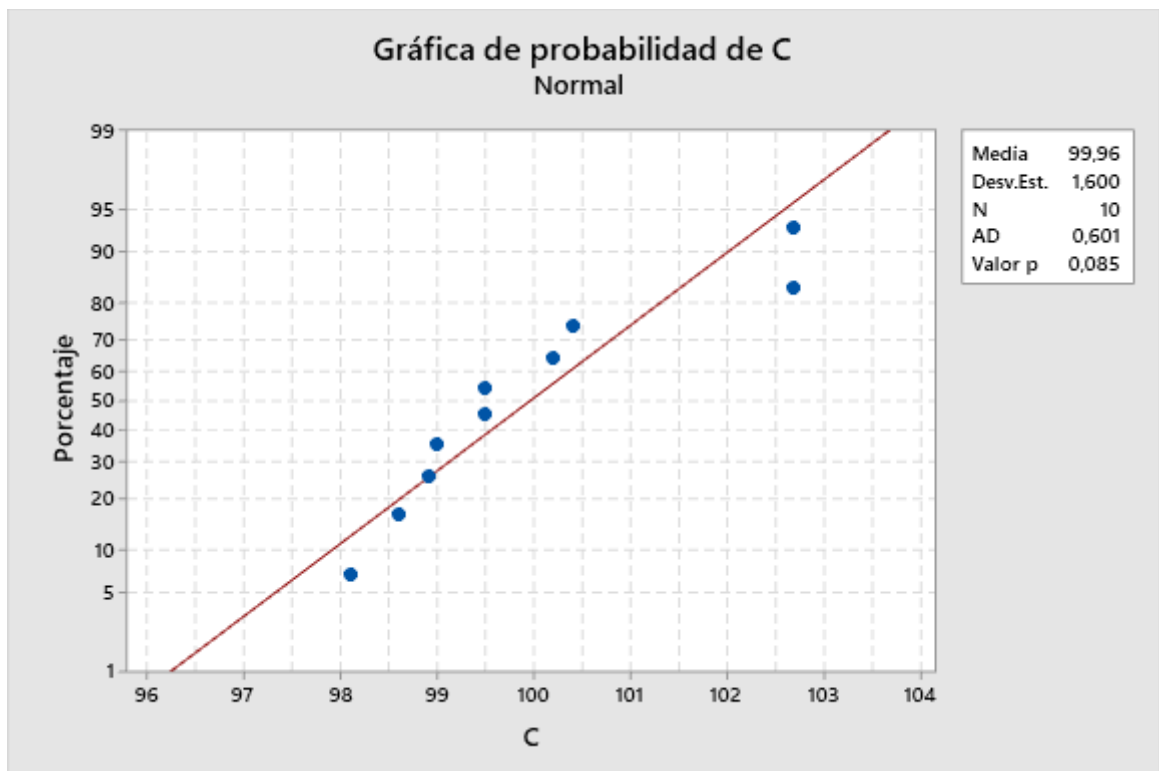


Figura E.5 Gráfica de probabilidad de analista C

7.6. Apéndice F: Incertidumbre de la medición



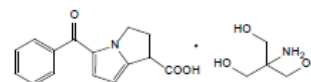
Figura F.1 Diagrama Ishikawa de las fuentes que afectan a la incertidumbre de medición en el análisis de determinación de Ketorolaco trometamina

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

Ketorolac Trometamol

(KETOROLAC TROMETHAMINE)

Product no.:	PHR1140-500MG
Lot no.:	LRAD1038
Description of CRM:	White Solid
Expiry date:	30 April 2026
Storage:	Room Temperature/Protect from Light
Certificate version:	LRAD1038.02 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.)
Chemical formula:	$C_{15}H_{13}NO_3 \cdot C_4H_{11}NO_3$
Molecular mass:	376.4
CAS No.:	74103-07-4



Analyte	Certified Purity \pm associated uncertainty U , $U = k \cdot u$ ($k =$) (Mass Balance/basis)
Ketorolac Trometamol	99.7 % $U_{crm} = \pm 0.3 \%$, $k = 2.0$ (as is basis)

Figura F.2 Certificado de análisis del estándar de Ketorolaco trometamina