

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Validación del Método para la Determinación de  
Clotrimazol por Cromatografía Líquida de Alto  
Desempeño en Tri-Clor Crema 20 g”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE MAESTRÍA EN ANÁLISIS QUÍMICO Y  
GESTIÓN DE LA CALIDAD

AUTOR: Lic. German Colindres Galindo

TUTORES: M. Sc. Ernesto Benítez Hechavarría

Ph. D. Gustavo Marcial Delgado

León, Nicaragua 2010

# *Dedicatoria*

*A nuestro Dios, por darme la oportunidad de vivir,  
así como de iluminarme y guiarme a través de la  
vida...*

*Gracias por permitirme llegar a este punto de mi vida  
y por brindarme la oportunidad de ser padre.*

# *Agradecimientos*

*A mi familia, especialmente a mi madre: Elsenora, mi padre: German, hermanos: Héctor y Alejandro, quienes son mi apoyo y soporte. A mi abuela, Alba, mis tíos: Miguel, Gloria, Sagrario. A mis primos: Cesar, Julio, Miguel, Alba, Geraldina, Guillermo, Gabriel, Marcela, Ernesto y a todos...*

*A mi esposa, Paola (te quiero mucho) y nuestro hijo, que está por nacer.*

*A mis amigos de toda la vida: Rene, Cesar, Edgar, Alejandro...*

*A Laboratorios Andifar, especialmente a su fundador: Dra. Abraham Andonie y su esposa Dra. Odissey Pinel, por su contribución al desarrollo de la Industria Farmacéutica en Honduras. A Jacobo Andonie, por permitirme continuar en mis aspiraciones académicas. A mis compañeros de trabajo: Juan Carlos, Ana María, Karen, Kselia, Josué, Wilfredo...*

*A todos los docentes, en especial al Dr. Gustavo Delgado, por brindarnos su guía y lo mejor de sus conocimientos para prepararnos a nuevos retos profesionales.*

*A usted que se ha interesado por este trabajo.*

*Y muy en especial a Ernesto Benítez, por orientarme en este trabajo, te agradezco mucho mi amigo.*

*Y a todas aquellas personas que de alguna y otra manera me ayudaron y apoyaron en esta aventura.*

## RESUMEN

A partir del año 2009, el Reglamento Técnico Centroamericano para la fabricación de medicamentos, adoptará las pautas y recomendaciones dadas en el informe 32 (1992) de la Organización Mundial Salud. Este informe incluye, en su anexo 5 la validación de los métodos analíticos. El Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Andifar, no tiene diseñada una metodología para la validación de los métodos analíticos; por lo que este trabajo persigue como objetivo el establecer una metodología para la validación de los métodos analíticos, en Laboratorios Andifar. Para esto, se realizó una investigación documental de las guías de varias organizaciones internacionales que orientan respecto a los temas de validación de métodos analíticos. Se estableció la normativa de validación métodos analíticos de la ICH y se utilizó como modelo la determinación de Clotrimazol por Cromatografía Líquida de Alto Desempeño en Tri-Clor Crema. Se evaluaron los parámetros: exactitud, precisión, especificidad, linealidad, rango, límite de detección, límite de cuantificación y robustez; así como la cuantificación de la incertidumbre del método. Los resultados de la validación del método de análisis fueron satisfactorios para todos los parámetros evaluados. El intervalo de confianza encontrado fue de  $(9.95 \pm 0.44)$  mg / g con un nivel de confianza de 95.45 %.

---

**INDICE**

<b>I. INTRODUCCION</b>	1.
<b>II. OBJETIVOS</b>	3.
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
<b>III. INVESTIGACION DOCUMENTAL</b>	4.
<b>3.1. GENERALIDADES</b>	4.
<b>3.2. VALIDACIÓN</b>	5.
<b>3.2.1. DEFINICIONES</b>	5.
3.2.1.1. Informe 32 de la OMS	5.
3.2.1.2. Guía ISO 5725.	5.
3.2.1.3. Guía Q2 (R1) ICH	6.
3.2.1.4. Instrucciones de la USP	6.
3.2.1.5. Guía de la EURACHEM	6.
<b>3.2.2. CLASIFICACION DE LOS MÉTODOS ANÁLITICOS</b>	6.
3.2.2.1. Informe 32 de la OMS	6.
3.2.2.2. Guía ISO 5725.	7.
3.2.2.3. Guía Q2 (R1) ICH	7.
3.2.2.4. Instrucciones de la USP	8.
3.2.2.5. Guía de la EURACHEM	9.
<b>3.2.3. PARAMETROS DE VALIDACIÓN</b>	9.
3.2.3.1. <u>EXACTITUD</u>	9.
3.2.3.1.1. Informe 32 de la OMS	9.
3.2.3.1.2. Guía ISO 5725	10.
3.2.3.1.3. Guía Q2 (R1) ICH	11.
3.2.3.1.4. Instrucciones de la USP	11.
3.2.3.1.5. Guía de la EURACHEM	12.
3.2.3.2. <u>PRECISION</u>	13.
3.2.3.2.1. Informe 32 de la OMS	13.

---

3.2.3.2.2. Guía ISO 5725.	14.
3.2.3.2.3. Guía Q2 (R1) ICH	14.
3.2.3.2.4. Instrucciones de la USP	15.
3.2.3.2.5. Guía de la EURACHEM	16.
3.2.3.3. <u>ESPECIFICIDAD</u>	16.
3.2.3.3.1. Informe 32 de la OMS	16.
3.2.3.3.2. Guía ISO 5725.	16.
3.2.3.3.3. Guía Q2 (R1) ICH	16.
3.2.3.3.4. Instrucciones de la USP	17.
3.2.3.3.5. Guía de la EURACHEM	18.
3.2.3.4. <u>LINEALIDAD</u>	18.
3.2.3.4.1. Informe 32 de la OMS	18.
3.2.3.4.2. Guía ISO 5725.	19.
3.2.3.4.3. Guía Q2 (R1) ICH	19.
3.2.3.4.4. Instrucciones de la USP	19.
3.2.3.4.5. Guía de la EURACHEM	20.
3.2.3.5. <u>RANGO</u>	21.
3.2.3.5.1. Informe 32 de la OMS	21.
3.2.3.5.2. Guía ISO 5725.	21.
3.2.3.5.3. Guía Q2 (R1) ICH	21.
3.2.3.5.4. Instrucciones de la USP	22.
3.2.3.5.5. Guía de la EURACHEM	23.
3.2.3.6. <u>LIMITE DE DETECCIÓN</u>	23.
3.2.3.6.1. Informe 32 de la OMS	23.
3.2.3.6.2. Guía ISO 5725.	23.
3.2.3.6.3. Guía Q2 (R1) ICH	23.
3.2.3.6.4. Instrucciones de la USP	24.
3.2.3.6.5. Guía de la EURACHEM	25.
3.2.3.7. <u>LIMITE DE CUANTIFICACIÓN</u>	25.
3.2.3.7.1. Informe 32 de la OMS	25.

---

3.2.3.7.2. Guía ISO 5725.	26.
3.2.3.7.3. Guía Q2 (R1) ICH	26.
3.2.3.7.4. Instrucciones de la USP	27.
3.2.3.7.5. Guía de la EURACHEM	27.
<b>3.2.3.8. <u>ROBUSTEZ</u></b>	<b>28.</b>
3.2.3.8.1. Informe 32 de la OMS	28.
3.2.3.8.2. Guía ISO 5725.	28.
3.2.3.8.3. Guía Q2 (R1) ICH	29.
3.2.3.8.4. Instrucciones de la USP	29.
3.2.3.8.5. Guía de la EURACHEM	30.
<b>3.3. INCERTIDUMBRE</b>	<b>30.</b>
3.3.1. APROXIMACIONES EXISTENTES. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE	30.
3.3.2. APROXIMACION ISO	31.
<b>3.4. CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL INSTRUMENTAL</b>	<b>32.</b>
<b>3.5. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN</b>	<b>32.</b>
<b>IV. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>33.</b>
<b>4.1. EQUIPOS</b>	<b>33.</b>
4.1.1. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 1100 Series	33.
4.1.2. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Perkin Elmer 200 Series	33.
4.1.3. pH-Metro Oakton pH 500	33.
4.1.4. Balanza analítica OHAUS EXPLORER	33.
4.1.5. Baño ultrasónico Cole-Parmer	34.
4.1.6. Agitador magnético con plancha calefactora Corning	34.
4.1.7. Equipo de filtración Schott Duran	34.
<b>4.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LOS EQUIPOS</b>	<b>34.</b>
4.2.1. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 100 Series y Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Perkin Elmer 200 Series	34.
a. Calificación del detector	34.
b. Calificación de la bomba	35.
c. Calificación de las columnas	35.
4.2.2. pH-Metro Oakton pH 500	35.

---

4.2.3. Balanza analítica OHAUS EXPLORER	36.
<b>4.3. MATERIALES</b>	<b>37.</b>
4.3.1. Cristalería y otros	37.
4.3.2. Reactivos	37.
4.3.3. Parámetros de calibración de la cristalería	38.
<b>4.4. PROCEDIMIENTO</b>	<b>38.</b>
<b>4.4.1. MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>38.</b>
4.4.1.1. Preparación de soluciones	38.
4.4.1.2. Preparación del estándar	38.
4.4.1.3. Preparación de valoración	39.
4.4.1.4. Sistema cromatográfico	39.
4.4.1.5. Procedimiento	40.
<b>4.4.2. DISEÑO METODOLÓGICO DE VALIDACIÓN</b>	<b>40.</b>
4.4.2.1. Desarrollo del Plan Maestro de Validación de Laboratorios Andifar	40.
4.4.2.2. Desarrollo del Plan Maestro de Validación del Laboratorio de Control de Calidad	40.
4.4.2.3. Desarrollo del Protocolo de Validación de la Determinación de Clotrimazol por HPLC en Tri-Clor Crema	40.
4.4.2.4. Parámetros evaluados, diseño experimental y criterios de aceptación	41.
4.4.2.4.1. Evaluación del Desempeño Instrumental	41.
4.4.2.4.2. Evaluación de la Exactitud	41.
a. Exactitud.	41.
b. Errores sistemáticos.	42.
c. Comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal.	43.
d. Estimación del recobrado.	43.
4.4.2.4.3. Evaluación de la Precisión	43.
a. Diseño anidado completo.	43.
b. Análisis de varianza para la precisión	45.
4.4.2.4.4. Evaluación de la Especificidad.	46.
a. Interferencias de excipientes.	46.
b. Capacidad del método de discernir entre el Clotrimazol y sus productos de degradación.	46.



---

4.4.2.4.5. Evaluación de la Linealidad.	47.
a. Muestras obtenidas por adición de estándar a un placebo de Tri-Clor Crema.	47.
b. Curva de calibrado.	47.
c. Ensayo estadístico de Bartlett.	47.
d. Regresión lineal simple no ponderada.	47.
d.1. Recta de regresión y sobre x. Coeficiente de correlación.	47.
d.2. Error residual, error del intercepto y de la pendiente	48.
d.3. Determinación del intervalo de confianza de la curva de regresión	48.
d.4. Determinación de los intervalos de confianza para la pendiente y para el intercepto.	49.
d.5. Cálculo del error aleatorio asociado a la determinación de una concentración.	49.
d.6. Gráfico de residuales.	50.
d.7. Comprobación del ajuste a un modelo lineal.	50.
d.8. Evaluación de la falta de ajuste en la Regresión Lineal	51.
4.4.2.4.6. Evaluación del Rango.	52.
4.4.2.4.7. Evaluación del Límite de Detección y de Cuantificación.	52.
4.4.2.4.8. Evaluación de la Robustez.	53.
4.4.2.4.9. Evaluación de la Incertidumbre.	55.
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	60.
5.1. Evaluación del Desempeño Instrumental	60.
5.2. Evaluación de la Exactitud.	61.
5.2.1. Resultados de la Exactitud.	61.
5.2.2. Errores sistemáticos.	63.
5.2.3. Resultados de la comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal.	63.
5.2.4. Estimación del Recobrado.	64.
5.3. Evaluación de la Precisión.	65.
5.3.1. Resultados del análisis de varianza para la precisión	65.
5.4. Evaluación de la Especificidad.	67.
5.4.1. Interferencias de excipientes.	67.
5.4.2. Capacidad del método para discernir entre el Clotrimazol y sus productos de Clotrimazol	68.

---

5.5. Evaluación de la Linealidad.	69.
5.5.1. Resultados del análisis de las muestras por adición de estándar a un placebo de Tri-Clor Crema.	69.
5.5.2. Curva de calibrado.	70.
5.5.3. Ensayo estadístico de Bartlett.	70.
5.5.4. Regresión lineal simple no ponderada.	72.
5.5.4.1. Cálculo de la recta de regresión y el coeficiente de correlación.	72.
5.5.4.2. Cálculo de los errores residuales, de la pendiente y del intercepto.	73.
5.5.4.3. Cálculo para la determinación del intervalo de confianza de la curva de regresión.	74.
5.5.4.4. Cálculo para la determinación de los intervalos de confianza para la pendiente y para el intercepto.	74.
5.5.4.4.1. Intervalo de confianza para la pendiente.	74.
5.5.4.4.2. Intervalo de confianza para el intercepto.	74.
5.5.4.5. Cálculo para la determinación del error aleatorio asociado a la determinación de una concentración.	75.
5.5.4.6. Gráfico de los residuales.	75.
5.5.4.7. Cálculo del ajuste a un modelo lineal.	76.
5.5.4.8. Cálculo para la evaluación de la falta de ajuste en la regresión lineal.	76.
5.6. Evaluación del Rango.	77.
5.7. Evaluación del Límite de Detección y de Cuantificación.	77.
5.8. Evaluación de la Robustez.	79.
5.9. Evaluación de la Incertidumbre.	81.
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	91.
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	92.
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	93.

---

## I. INTRODUCCION

La región centroamericana se encuentra en el proceso de implementación del Informe 32 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) <sup>[1]</sup>. Este informe, contiene recomendaciones y establece pautas para la producción de preparaciones farmacéuticas eficaces y seguras. A partir del año 2009, el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) <sup>[2]</sup> para la fabricación de medicamentos, adoptará las pautas y recomendaciones dadas en el informe 32 (1992) de la OMS. Este informe incluye, en su anexo 5 <sup>[3]</sup> la validación de los métodos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos, contenido que no estaba considerado en las pautas y recomendaciones seguidas hasta entonces por la RTCA: Informe 25 (1975) <sup>[4]</sup>.

En el anexo 5 del informe 32 <sup>[3]</sup>, explican en qué consiste la validación y exponen los parámetros de validación a evaluar en los métodos analíticos, también orientan sobre qué tipo de parámetros deben ser evaluados en dependencia del tipo de ensayo a realizar. Sin embargo en esta guía no se define una pauta clara de los experimentos a realizar para la evaluación de cada uno de los parámetros de validación, ni proporcionan las herramientas estadísticas necesarias para el análisis de dichos parámetros.

Existen varias guías de organizaciones internacionales que establecen las pautas para la evaluación de los parámetros de validación de métodos analíticos. Entre ellas se encuentran: Guía Q2 (R1) <sup>[5]</sup> de la Conferencia Internacional para la Armonización de los Requerimientos Técnicos para el Registro de Medicamentos de Uso Humano (ICH para sus siglas en inglés); Guía ISO 5725 <sup>[6, 7, 8, 9,10,11]</sup> de la Organización Internacional de Normalización, Guía de la EURACHEM <sup>[12]</sup> para la Validación de Métodos y las Instrucciones de la Farmacopea de los Estados Unidos <sup>[13]</sup> (USP, para sus siglas en inglés). Estas guías presentan definiciones similares para los diferentes parámetros de validación pero difieren en la manera de evaluar los mismos y en el modo de realizar el procesamiento estadístico de los resultados. Tampoco dan especificaciones exactas que indiquen que un determinado método analítico cumple con un determinado parámetro de validación.

El Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Andifar, no tiene diseñada una metodología para la validación de los métodos analíticos, por lo que no existe una evidencia experimental ni documentada que los procedimientos existentes para la valoración del contenido de los principios activos en las especialidades farmacéuticas producen en realidad el resultado previsto.

El encontrar estas evidencias permitirá cumplir con las nuevas exigencias legales de las Buenas Prácticas de Laboratorio y de Manufactura adoptadas por la RTCA <sup>[2]</sup>, permitiendo así trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados; lo cual minimizaría el número de fallos y repeticiones. Estas evidencias también proporcionarán bases sólidas para la realización de

los estudios de estabilidad de las especialidades farmacéuticas y la determinación de los verdaderos tiempos de vida útil de las mismas; además garantizarán que los métodos presenten buen desempeño a bajas concentraciones de sustancia, lo cual ayudaría de manera integral a la validación de la limpieza de las maquinarias y herramientas implicadas en los procesos productivos, evitando así la contaminación cruzada.

---

## II. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer una metodología para la validación de los métodos analíticos de Laboratorios Andifar.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Ensayar la metodología de validación propuesta utilizando el método de determinación de Clotrimazol en la Crema: Tri-Clor Crema 20 g<sup>[14]</sup>, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC).
- Evaluar los parámetros que caracterizan el desempeño del método analítico, tales como la especificidad, exactitud, precisión, linealidad y el rango, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.

---

### III. INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL

#### 3.1. GENERALIDADES

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) es un sistema para asegurar que los productos son consistentemente producidos y controlados conforme a estándares de calidad a fin de eliminar los riesgos involucrados en la producción de medicamentos, este principio ha sido promovido por la OMS y mediante el comité de expertos en especificaciones de preparaciones farmacéuticas ha desarrollado y actualizado la normativa de BPM. Esta normativa, presentada como una serie de documentos, representa las recomendaciones de un grupo internacional de expertos convocado por la OMS para que examine diversos asuntos relativos a la garantía de la calidad de los productos farmacéuticos y las especificaciones aplicables a sustancias y formas farmacéuticas.

Dentro de la normativa BPM se encuentran los informes de la OMS: Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. Estos informes se iniciaron en el año 1975 (informe 25) <sup>[15]</sup> y continuaron evolucionando a lo largo de los años con especificaciones más rigurosas: 1977 (informe 26) <sup>[16]</sup>, 1980 (informe 27) <sup>[17]</sup>, 1982 (informe 28) <sup>[18]</sup>, 1984 (informe 29) <sup>[19]</sup>, 1987 (informe 30) <sup>[20]</sup>, 1990 (informe 31) <sup>[21]</sup>, 1992 (informe 32) <sup>[1]</sup>, 1993 (informe 33) <sup>[22]</sup>, 1996 (informe 34) <sup>[23]</sup>, 1999 (informe 35) <sup>[24]</sup>. Los mismos contienen recomendaciones sobre las prácticas adecuadas de fabricación de productos farmacéuticos, y pautas provisionarias para la inspección de los fabricantes de productos farmacéuticos y para la aplicación del Sistema OMS de Certificación de la Calidad de los Productos Farmacéuticos Objeto de Comercio Internacional. Se examinan diversos temas relacionados con el progreso de la *Farmacopea Internacional*, como también cuestiones vinculadas a la estabilidad de las formas farmacéuticas, a las preparaciones extemporáneas, y a la capacitación de funcionarios encargados de la reglamentación farmacéutica. Se incluyen asimismo pautas para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos fabricados por tecnología recombinante del ADN y acerca de la comprobación de los procedimientos analíticos, como también listas de Sustancias Químicas Internacionales de Referencia y Espectros Infrarrojos Internacionales de Referencia.

Desde el punto de vista regional, los procesos de globalización y libre mercado promovidos por la Organización Mundial del Comercio (OMC) han favorecido la conformación de iniciativas de libre comercio entre países; entre ellas tenemos: Sistema de la Integración Centroamericana SICA <sup>[25]</sup> (Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana), CAN, Caribbean Community CARICOM <sup>[26]</sup>, Mercado Común del Sur MERCOSUR <sup>[27]</sup>, North American Free Trade Agreement NAFTA <sup>[28]</sup> y otros regionales como Asociación Latinoamericana de Integración ALADI. Las BPM constituyen uno de los temas

---

prioritarios de discusión en los subgrupos técnicos de estas asociaciones donde se han alcanzado diverso grado de avance o de armonización. Por ejemplo CAN, SICA y MERCOSUR han incluido discusiones sobre buenas prácticas de manufactura siendo hasta la fecha el progreso variado. El MERCOSUR posee las bases estructurales más firmes de las zonas latinoamericanas y ha logrado los mayores avances, en particular en los reglamentos de BPM. México, los países del Pacto Andino y los países de MERCOSUR ya cumplen con las especificaciones para las preparaciones farmacéuticas exigidas en el informe 32; sin embargo los países de la región centroamericana todavía se rigen por las especificaciones del informe 25 establecidas en el año 1975.

En el año 2009, el Reglamento Técnico Centroamericano <sup>[2]</sup> para la fabricación de medicamentos, adoptará las especificaciones para preparaciones farmacéuticas del informe 32 (1992) de la OMS <sup>[1]</sup>. Este informe incluye, en su anexo 5, la validación de los métodos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos, lo cual no estaba considerado en la reglamentación hasta entonces vigente: informe 25 (1975) <sup>[15]</sup>.

## **3.2. VALIDACIÓN**

A continuación se presenta un resumen de las guías de varias organizaciones internacionales que orientan respecto a los temas de validación de métodos analíticos. Se exponen definiciones, clasificaciones y los parámetros de validación abordados por cada una de estas guías así como la manera de evaluar los mismos. Se pretende brindar una idea clara de las diferentes aproximaciones que se pueden tener acerca de la validación. En los casos donde no se aborde un determinado tema en la guía en cuestión, se le colocará la leyenda “No definida”.

### **3.2.1. DEFINICIONES**

#### **3.2.1.1. Informe 32 de la OMS. <sup>[1]</sup>**

*Validación:* No definida.

*Objetivo de la validación analítica:* Asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. De ahí que sea necesario definir debidamente tanto las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse como el objetivo previsto para el mismo.

#### **3.2.1.2. Guía ISO 5725. <sup>[6, 7, 8, 9, 10, 11]</sup>**

*Validación:* Confirmación mediante el suministro de datos que respalden la veracidad de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

---

---

*Objetivo de la validación analítica:* No definida.

### **3.2.1.3. Guía Q2 (R1) ICH.** <sup>[5]</sup>

*Validación:* No definida

*Objetivo de la validación analítica:* Demostrar que método analítico es apropiado a los fines para los cuales fue concebido.

### **3.2.1.4. Instrucciones de la USP.** <sup>[13]</sup>

*Validación:* Es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

*Objetivo de la validación analítica:* No definida.

### **3.2.1.5. Guía de la EURACHEM.** <sup>[12]</sup>

*Validación:* Es el proceso de definir un requerimiento analítico y confirmar que el método bajo consideración tiene la capacidad de desempeñarse consistentemente de acuerdo a la aplicación requerida.

Esta implícito en el proceso de validación de métodos que los estudios para determinar los parámetros de desempeño del método son llevados a cabo utilizando equipos que se encuentren dentro de las especificaciones, trabajen correctamente y estén adecuadamente calibrados.

Así mismo, el operador que realice el estudio de validación debe ser competente en el campo de trabajo y tener el suficiente conocimiento para tomar decisiones apropiadas de acuerdo a las observaciones realizadas a medida que se realiza el estudio.

## **3.2.2. CLASIFICACION DE LOS MÉTODOS ANÁLITICOS**

### **3.2.2.1. Informe 32 de la OMS.** <sup>[1]</sup>

Clase A: Pruebas destinadas a establecer identidad, ya sea de sustancias farmacéuticas a granel o de un ingrediente en particular en una forma farmacéutica acabada.

Clase B: Métodos destinados a detectar y cuantificar impurezas en una sustancia farmacéutica a granel o en una forma farmacéutica acabada.

Clase C: Métodos empleados para determinar cuantitativamente la concentración de una sustancia farmacéutica a granel o de un ingrediente principal en una forma farmacéutica acabada.



Clase D: Métodos empleados para evaluar las características de las formas farmacéuticas acabadas, tales como perfiles de disolución y uniformidad de contenido.

Tabla 1. Parámetros de validación a evaluar en las diferentes categorías de métodos según la OMS.

PARAMETRO	CATEGORIA				
	CLASE A	CLASE B		CLASE C	CLASE D
		Prueba cuantitativa	Prueba de límite		
Exactitud	-	X	-	X	X
Precisión	-	X	-	X	X
Robustez	X	X	X	X	X
Linealidad y Alcance	-	X	-	X	X
Selectividad	X	X	X	X	X
Límite de detección	X	-	X	-	-
Límite de cuantificación	-	X	-	-	-

### 3.2.2.2. Guía ISO 5725. [6, 7, 8, 9, 10, 11]

No definida.

### 3.2.2.3. Guía Q2 (R1) ICH. [5]

Ensayos de identificación: Están destinados a asegurar la identidad de un analito en una muestra. Normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra contra la del estándar de referencia (p. ej. Espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.)

Ensayos para impurezas: Pueden ser ensayos cuantitativos o ensayos de límite de una impureza en una muestra. Ambos ensayos pretenden reflejar exactamente las características de pureza de la muestra. Se requieren características de validación diferentes para un ensayo cuantitativo y un ensayo de límites de impurezas.

Procedimientos de ensayo: Están destinados a medir la presencia del analito en una muestra dada. Para los productos, se aplican similares características de validación tanto para el principio activo como para cualquier otro componente seleccionado.

Tabla 2. Parámetros de validación a evaluar en las diferentes categorías de métodos según la ICH.

<b>Características</b>	<b>Tipo de Procedimiento Analítico</b>			
	<b>Identificación</b>	<b>Ensayo de Impurezas</b>		<b>Ensayo -disolución -contenido / potencia</b>
		<b>Cuantificación</b>	<b>Limite</b>	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+(1)	-	+(1)
Especificidad (2)	+	+	+	+
Limite de detección	-	- (3)	+	-
Limite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

(1) En casos donde se lleve a cabo la reproducibilidad, no se necesita la precisión intermedia

(2) La de especificidad en un procedimiento analítico se puede compensar por otro procedimiento analítico

(3) Puede requerirse en algunos casos

#### **3.2.2.4. Instrucciones de la USP.** <sup>[13]</sup>

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

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

Categoría III: Los procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño, por ejemplo la prueba de disolución, liberación del fármaco.

Categoría IV: pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.

Pruebas microbiológicas: aquellas que se realizan para asegurar la calidad microbiológica del medicamento.

Tabla 3. Parámetros de validación a evaluar en las diferentes categorías de métodos según la USP.

<b>Categoría de Prueba</b>	<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>		<b>Categoría III</b>	<b>Categoría IV</b>
<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Principios Activos</b>	<b>Prueba Límite Cuantitativa</b>	<b>Prueba Límite Cualitativa</b>	<b>Desempeño físico-químico</b>	<b>Identificación</b>
<b>Exactitud</b>	Si	Si	*	*	No
<b>Precisión</b>	Si	Si	No	Si	No
<b>Especificidad</b>	Si	Si	Si	*	Si
<b>Límite de Detección</b>	No	No	Si	*	No
<b>Límite de Cuantificación</b>	No	Si	No	*	No
<b>Linealidad</b>	Si	Si	No	*	No
<b>Intervalo</b>	Si	Si	*	*	No

\* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

### 3.2.2.5. Guía de la EURACHEM. <sup>[12]</sup>

No definida.

### 3.2.3. PARAMETROS DE VALIDACIÓN:

A continuación se detallarán las características de desempeño analítico que deben considerarse en la validación de los métodos analíticos, se presentarán las definiciones que proporcionan las diferentes guías y el modo que recomiendan para la determinación de estas características de desempeño.

#### **3.2.3.1. EXACTITUD:**

##### **3.2.3.1.1. Informe 32 de la OMS <sup>[1]</sup>, exactitud.**

*Definición:* La exactitud del procedimiento empleado consiste en la proximidad de los resultados obtenidos al valor real.

*Determinación:* La exactitud puede determinarse aplicando el procedimiento a las muestras del material a examinarse, cuando han sido preparadas con exactitud cuantitativa. Siempre que sea posible, esas muestras deben contener todos los componentes del material, incluyendo el analito. Deben prepararse también muestras en las que el analito haya sido incorporado en cantidades de aproximadamente 10,0 por encima y por debajo de la gama de valores prevista. También es

posible determinar la exactitud comparando los resultados con los obtenidos empleando otro procedimiento ya comprobado.

### 3.2.3.1.2. Guía ISO 5725<sup>[6]</sup>, exactitud.

*Definición:* La ISO utiliza los términos veracidad y precisión para describir la exactitud de un método de medición. Es así, que se define a la exactitud como la aproximación o cercanía entre el resultado obtenido en el ensayo y el valor de referencia aceptado. La precisión describe los errores aleatorios del ensayo y la veracidad los errores sistemáticos o sesgo.

*Determinación:*

*Determinación de la precisión:*

La Guía ISO 5725-3:1994<sup>[8]</sup> Mediciones intermedias de la precisión de un método de medición estándar, propone en su acápite 8, hacer un estimado de la desviación estándar en la precisión intermedia dentro de un laboratorio tomando una muestra y desarrollándole una serie de medidas  $n$  con cambios de uno o más factores dentro de cada medida. Recomiendan que  $n$  sea al menos 15. Es recomendada la determinación de “outliers” por la aplicación del test de Grubbs’ o por un gráfico de  $(y_k - \bar{y})$ . La estimación de la desviación estándar de la precisión intermedia con M

factor(es) diferentes es dada por: 
$$S_{I(i)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

En el acápite 9, la Guía ISO 5725-3:1994<sup>[8]</sup> Mediciones intermedias de la precisión de un método de medición estándar, propone estudios interlaboratoriales y análisis de la precisión intermedia de las medidas. Para llevar acabo dichos estudios, orienta tres aproximaciones:

1. Aproximación simplista.
2. Experimentos anidados completos.
3. Experimentos anidados escalonados.

*Determinación de la veracidad:*

Esta parte de la ISO 5725 provee métodos básicos para la estimación del “bias” de un método de medida y el “bias” del laboratorio cuando un método de medida es aplicado. Es así, que para aplicar esta parte de la ISO 5725 solamente si el valor de referencia aceptado se establece como el valor verdadero convencional.

---

La determinación del “*bias*” de un laboratorio utilizando un método de medición estándar, bajo condiciones de repetibilidad, consiste en las mediciones requeridas por un laboratorio en un experimento de precisión, con la restricción que es aplicable a un solo laboratorio y el requerimiento adicional de emplear un valor de referencia aceptado. Es así, que la Guía ISO 5725-4:1994 <sup>[9]</sup>, propone en su acápite 5, sustituir en las Guías ISO 5725-1:1994 <sup>[6]</sup> y 5725-2:1994 <sup>[7]</sup> la palabra “veracidad” en lugar de “precisión” o “repetibilidad y reproducibilidad” apropiadamente.

#### **3.2.3.1.3. Guía Q2 (R1) ICH <sup>[5]</sup>, exactitud.**

*Definición:* La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre el valor aceptado (ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia) y el valor encontrado.

*Determinación:* Son propuestas diversas metodologías para la determinación de la especificidad en productos:

- a. aplicación del procedimiento analítico a mezcla sintética de los componentes del producto a la cual ha sido añadido cantidades conocidas del principio activo a ser analizado.
- b. en casos donde no sea posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptado añadir cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con el método en cuestión contra los obtenidos con un segundo procedimiento bien caracterizado.
- c. la exactitud se puede inferir una vez que la precisión, linealidad y especificidad hayan sido establecidas.

La exactitud puede ensayarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones con un mínimo de 3 niveles de concentraciones, cubriendo el rango especificado por el método (por ejemplo: 3 concentraciones / 3 replicas). La exactitud debe reportarse como el por ciento del recobrado de la cantidad de analito añadido a la muestra obtenido en el ensayo o como la diferencia entre la media obtenida y el valor verdadero aceptado, junto con el intervalo de confianza.

#### **3.2.3.1.4. Instrucciones de la USP <sup>[13]</sup>, exactitud.**

*Definición:* La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.

*Determinación:* La exactitud en la valoración de un fármaco puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar

---

de referencia) o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a una mezcla sintética de los componentes del producto farmacéutico a la cual se ha añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico (“*spike*”) como la comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco, pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta relativo) debe ser utilizado siempre que se lo conozca.

La exactitud se evalúa utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentraciones, cubriendo el intervalo especificado, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración.

#### **3.2.3.1.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, exactitud.**

*Definición:* Es el grado de concordancia entre el resultado notificado y el valor de referencia aceptado. En esta guía se asume la definición de la guía ISO 3534-1. La validación de métodos busca cuantificar el grado de exactitud de los resultados evaluando los efectos aleatorios y sistemáticos en el resultado. Así como en la guía ISO 3534-1, en esta guía la exactitud es estudiada como efecto de dos componentes: precisión y veracidad. La precisión es una medida de cuan cercanos están los resultados unos de otros y son usualmente expresados midiendo su desviación estándar, la cual describe la dispersión de los resultados. La veracidad de un método es una expresión de cuan cerca está la media de una serie de resultados obtenidos por el método, del valor verdadero. La veracidad es expresada en términos de sesgos.

*Determinación:*

Tabla 4. Determinación de la veracidad.

---

Análisis	No. de determinaciones	Calcular
a. Placebo y material de referencia utilizando el método indicado.	10	Restar el valor de la media del blanco al valor de la media del analito del material de referencia.  Comparar con el valor verdadero o aceptado para el material de referencia.
b. Placebo y material de referencia/ensayo utilizando el método candidato y un método de referencia (preferiblemente primario)	10	Da una medida del sesgo del método Restar el valor de la media del blanco al valor de la media del analito del material de referencia/ensayo.  Comparar las medidas realizadas utilizando el método candidato y el de referencia  Da una medida del sesgo del método relativo a métodos de referencias o primarios.

Tabla 5. Determinación de la precisión.

Análisis	Repeticiones (independientes)	Que calcular de los datos	Comentario
Estándares, material de referencia o muestras blancos fortificadas a varias concentraciones en el rango de trabajo			
a. mismo analista, equipo, laboratorio, tiempo de trabajo corto	10	Determinación de la desviación estándar a cada concentración	Determina la desviación estándar de la repetibilidad a cada concentración
b. diferentes analistas, equipos, mismo laboratorio, tiempo de trabajo largo	10	Determinación de la desviación estándar a cada concentración	Determina la desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio a cada concentración
c. diferentes analistas, equipos, laboratorios, tiempo de trabajo largo	10	Determinación de la desviación estándar a cada concentración	Determina la desviación estándar de la reproducibilidad inter-laboratorio a cada concentración. Requiere estudios colaborativos

### **3.2.3.2. PRECISION:**

#### **3.2.3.2.1. Informe 32 de la OMS <sup>[1]</sup>, precisión.**

*Definición:* La precisión del procedimiento es el grado de concordancia entre los resultados de los análisis individuales.

---

**Determinación:** Se mide por la dispersión de los resultados individuales de la media y usualmente se expresa como una desviación patrón o como el coeficiente de variación (desviación patrón relativa) cuando el procedimiento completo se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

**Repetibilidad** (variación dentro del laboratorio). Es la precisión del procedimiento cuando es repetido por el mismo analista bajo el mismo conjunto de condiciones (los mismos reactivos, equipos, graduaciones, y laboratorio) y dentro de un lapso breve. La repetibilidad de un procedimiento se evalúa efectuando determinaciones completas y separadas, con muestras separadas e idénticas del mismo lote de material homogéneo, y por lo tanto proporciona una medida de la precisión del procedimiento bajo condiciones normales de operación.

**Reproducibilidad.** Es la precisión del procedimiento cuando se efectúa bajo condiciones diferentes, usualmente en diferentes laboratorios, con muestras supuestamente idénticas obtenidas del mismo lote de material homogéneo. También se puede obtener información valiosa efectuando comparaciones de los resultados obtenidos por distintos analistas, mediante el uso de diferentes equipos, o llevando a cabo el análisis en diferentes momentos.

#### **3.2.3.2.2. Guía ISO 5725<sup>[8]</sup>, precisión.**

**Definición:** El grado de proximidad entre resultados de ensayos independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

**Determinación:** Ver acápite “3.2.3.1.2. Guía ISO 5725, exactitud”, página 10.

#### **3.2.3.2.3. Guía Q2 (R1) ICH<sup>[5]</sup>, precisión.**

**Definición:** expresión del grado de proximidad (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea, bajo las condiciones prescritas. La precisión debe considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

**Determinación:** La *repetibilidad* se puede evaluar:

- a. un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango especificado para el procedimiento (por ejemplo: 3 concentraciones / 3 replicas por cada uno);
- b. un mínimo de 6 determinaciones al 100 % de la concentración del ensayo

La *precisión intermedia*: la magnitud de este estudio depende de las circunstancias bajo las cuales el procedimiento será usado. El aplicante debe establecer los efectos de eventos aleatorios sobre

---



---

la precisión del método analítico. Las variaciones típicas a ser estudiadas incluyen el día, analista, equipo, etc. No se considera necesario estudiar estos efectos individualmente. Es recomendado el uso de diseño de experimentos (matrices).

La *reproducibilidad* es evaluada por medio de pruebas inter-laboratorios. La reproducibilidad debe considerarse en caso de la estandarización de un procedimiento analítico, por ejemplo, inclusión de un procedimiento en farmacopeas.

Deben reportarse: la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza para cada tipo de precisión investigada.

#### **3.2.3.2.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, precisión.**

*Definición:* grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o 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 equipo diferente dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

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

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

---

**3.2.3.2.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, precisión.**

*Definición:* Explicada en el acápite 3.2.3.1.5. “Guía de la EURACHEM, exactitud, definición,” página 12.

*Determinación:* Explicada en el acápite 3.2.3.1.5. “Guía de la EURACHEM, exactitud, Tabla 5. Determinación de la precisión,” página 13.

**3.2.3.3. ESPECIFICIDAD:****3.2.3.3.1. Informe 32 de la OMS<sup>[1]</sup>, especificidad.**

*Definición:* La selectividad o especificidad de un procedimiento es la posibilidad de que éste mida el analito en una forma que esté libre de interferencia de parte de otros componentes de la muestra que se está examinando (por ejemplo, impurezas provenientes de la fabricación o de la degradación, o bien ingredientes que no sean el analito, sean farmacológicamente activos o inertes).

*Determinación:* La selectividad (o la carencia de la misma) puede expresarse en relación con el sesgo de los resultados analíticos obtenidos cuando el procedimiento se aplica al analito en presencia de niveles previstos de otros componentes, comparado con los resultados obtenidos con el mismo analito sin sustancias agregadas. Cuando los demás componentes son todos conocidos y están disponibles, la selectividad puede determinarse mediante la comparación de los resultados analíticos obtenidos con el analito, con o sin la adición de los materiales que pueden interferir. Cuando dichos componentes no han sido identificados o no están disponibles, a menudo puede medirse la selectividad determinando la recuperación de una adición normal de analito puro a un material que contenga un nivel constante de los otros componentes.

**3.2.3.3.2. Guía ISO 5725, especificidad.**

No definida en la Guía ISO 5725.

**3.2.3.3.3. Guía Q2 (R1) ICH<sup>[5]</sup>, especificidad.**

*Definición:* Es la habilidad de valorar inequívocamente el analito en la presencia de componentes que se sospecha su presencia. Típicamente estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

*Determinación:* La ICH recomienda para la determinación de la especificidad en las valoraciones y los ensayos de impurezas lo siguiente: para los procedimientos cromatográficos se deben usar cromatogramas representativos para demostrar especificidad y los componentes individuales

---

---

deben rotularse apropiadamente. Similares consideraciones deben tomarse en cuenta para otras técnicas de separación. Separaciones críticas en cromatografía deben investigarse a un nivel apropiado. Para separaciones críticas, la especificidad puede demostrarse por la resolución de dos componentes que eluyan cerca el uno del otro. En el caso en donde se utilizan ensayos no-específicos, otros procedimientos analíticos deben utilizarse como soporte para demostrar la especificidad. Por ejemplo, cuando se adopta una valoración para el ensayo de una droga, puede utilizarse la combinación del ensayo y un ensayo apropiado de impurezas.

Cuando se dispone de impurezas: El ensayo de valoración debe discriminar al analito en la presencia de impurezas y/o excipientes; prácticamente esto se logra adicionando niveles apropiados de impurezas y/o excipientes a los principios activos o producto terminados y demostrando que el resultado del ensayo no se afecta por la presencia de estos materiales cuando se le compara con el resultado del ensayo obtenido con las muestras no adicionadas.

Cuando no se dispone de impurezas: Si los estándares de impurezas o productos de degradación no están disponibles, la especificidad se demuestra por comparación de los resultados obtenidos con las muestras que contienen impurezas o productos de degradación con los resultados obtenidos con estas mismas muestras pero con un segundo procedimiento bien caracterizado, por ejemplo: un método farmacopeico u otro procedimiento analítico validado (procedimiento independiente). Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones de stress: luz, calor, humedad, hidrólisis ácido / base y oxidación.

Pueden ser útiles ensayos de pureza de pico para demostrar que el pico cromatográfico del analito no es atribuible a más de un componente (por ejemplo: arreglo de diodo, espectrofotometría de masas).

#### **3.2.3.3.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, especificidad.**

*Definición:* Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

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

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

Otras autoridades internacionales han preferido el término “selectividad,” reservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente selectivos.

### **3.2.3.3.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, especificidad.**

*Definición:* La habilidad de un método de determinar con precisión y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en una muestra bajo las condiciones declaradas del ensayo.

*Determinación:*

Tabla 6. Determinación de la Especificidad.

<b>Que se hace</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Calcular / determinar</b>	<b>Comentarios</b>
Analizar muestras y materiales de referencias por el método en estudio y otros métodos independientes	1	Utilizar los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la habilidad del método de confirmar la identidad del analito y su habilidad de medir el analito aisladamente de otros interferentes.	Decidir cuanta evidencia es requerida para ofrecer suficiente confiabilidad
Analizar muestras que contengan varios supuestos interferentes en la presencia del analito de interés	1	Examinar el efecto de los interferentes – la presencia de interferentes aumenta o inhibe la detección o cuantificación del mensurando	Si la detección o cuantificación es aumentada o inhibida por los interferentes, será requerido un desarrollo de método adicional

### **3.2.3.4. LINEALIDAD:**

#### **3.2.3.4.1. Informe 32 de la OMS<sup>[1]</sup>, linealidad.**

*Definición:* La linealidad de un procedimiento analítico es la posibilidad de que este produzca resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

---

*Determinación:* mediante la aplicación del procedimiento a una serie de muestras que tienen concentraciones de analito que cubren el alcance atribuido al procedimiento. Cuando la relación entre la respuesta y la concentración no es lineal, se puede lograr la normalización por medio de una curva de calibración.

#### **3.2.3.4.2. Guía ISO 5725, linealidad.**

No definida en la Guía ISO 5725.

#### **3.2.3.4.3. Guía Q2 (R1) ICH<sup>[5]</sup>, linealidad.**

*Definición:* Habilidad (dentro de un determinado rango) de un procedimiento analítico de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.

*Determinación:* La relación lineal debe ser evaluada a través del rango del procedimiento analítico. Puede ser demostrado directamente en la sustancia activa (por dilución de una solución stock de estándar) y/o en pesadas separadas de mezclas sintéticas de los componentes del producto.

La linealidad debe evaluarse por inspección visual de un gráfico que esquematice la señal producida versus la cantidad o concentración de analito. En caso de parecer una relación lineal, los resultados deben evaluarse por métodos estadísticos apropiados; por ejemplo, calculando la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener linealidad, los datos del ensayo deben ser sujetos a una transformación matemática antes del análisis de regresión.

Se deben presentar: el coeficiente de correlación, el intercepto, la pendiente de la regresión lineal y la suma de cuadrados de los residuales. Debe incluirse un esquema de los resultados.

Para el establecimiento de la linealidad es recomendado un mínimo de 5 concentraciones. Otras aproximaciones deben justificarse.

#### **3.2.3.4.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, linealidad.**

*Definición:* Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

*Determinación:* La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los

---

resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo: mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

Para el parámetro de la linealidad, se recomienda se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. Para la valoración de un fármaco o de un producto terminado de 80,0 – 120,0 % de la concentración de prueba.

### 3.2.3.4.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, linealidad.

*Definición:* Habilidad de un método de obtener resultados de ensayos proporcionales a la concentración del analito.

*Determinación:*

Tabla 7. Determinación de la Linealidad.

Análisis	Cantidad	Que calcular de los datos	Comentarios
1. Blanco más materiales de referencia o blancos fortificados a varias concentraciones  Necesita al menos 6 concentraciones más el blanco	1	Graficar las respuesta de la medida (coordenadas y) contra concentración del mensurando (coordenadas x)  Evaluar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y las regiones superior e inferior que bordean el rango  Ir al paso 2	Idealmente las diferentes concentraciones deben prepararse de forma independiente y no de alícuotas de la solución madre.  Esto dará confirmación visual si el rango de trabajo es lineal o no. Este estado es necesario para estudiar un rango de trabajo que se piense que es lineal y donde se pretenda usar un solo punto de calibración
2. material de referencia o muestras de blancos fortificadas a por lo menos 6 diferentes concentraciones dentro del rango de trabajo	3	Graficar las respuesta de la medida (coordenadas y) contra concentración del mensurando (coordenadas x) Examinar visualmente por puntos <i>outliers</i> .  Calcular el coeficiente de regresión. Calcular y graficar los valores de las residuales. Una distribución al azar sobre la línea recta confirma	No es seguro retirar los puntos outliers sin antes realizar determinaciones a concentraciones cercanas a los mismos.  Si la varianza de los replicados es proporcional a la concentración, utilizar un calculo de regresión ponderado en lugar de una regresión simple

		linealidad. Tendencias sistemáticas indican no linealidad  Ir al paso 3	En ciertas circunstancias será mejor tratar de ajustar una curva de calibración no-lineal a los datos. No se aconsejan funciones superiores a las cuadráticas
3. Fortificar el blanco a varias concentraciones cercanas al límite de detección  Medir, una a la vez, 10 réplicas independientes a cada nivel de concentración		Calcular la desviación estándar “s” del valor del analito a cada nivel de concentración. Graficar s versus concentración y asignar el valor al límite de cuantificación por inspección  Expresar el límite de cuantificación como la menor concentración del analito la cual puede ser determinada con un nivel aceptable de incertidumbre	Normalmente el límite de cuantificación forma parte del estudio para determinar el rango de trabajo. No debe ser determinado por extrapolación por debajo de la menor concentración del blanco fortificado

### **3.2.3.5. RANGO:**

#### **3.2.3.5.1. Informe 32 de la OMS <sup>[1]</sup>, rango.**

*Definición:* Llamado alcance. El alcance del procedimiento es una expresión de los niveles más bajo y más alto de analito que, según se haya demostrado, pueden ser determinables con precisión, exactitud y linealidad aceptables.

*Determinación:* No definido pero se infiere de la definición.

#### **3.2.3.5.2. Guía ISO 5725, rango.**

No definida en la Guía ISO 5725.

#### **3.2.3.5.3. Guía Q2 (R1) ICH <sup>[5]</sup>, rango.**

*Definición:* El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración (cantidad) alta y baja de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para el cual ha sido demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel apropiado de precisión, exactitud y linealidad.

*Determinación:* El rango especificado se deriva normalmente del estudio de la linealidad y depende del plan de aplicación del procedimiento. Se establece mediante la confirmación que el procedimiento analítico provee un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión.

---

Deben ser considerados los siguientes rangos mínimos:

- a. para los ensayos de una sustancia activa o producto terminado: normalmente de 80% a 120% del criterio de aceptación.
- b. para uniformidad de contenido, cubrir un mínimo de 70% a 130% de la concentración del ensayo; a menos que se justifique un intervalo más amplio basado en la naturaleza de la forma farmacéutica (por ejemplo: inhaladores de dosis fija).
- c. para ensayos de disolución:  $\pm 20\%$  sobre el rango especificado. Por ejemplo si la especificación para un producto de liberación controlada a la hora es de 20 % de liberación y luego a las 24 horas es de 90 % de liberación, el rango validado tendría que ser de 0 a 110 % de la cantidad declarada.  $20-20= 0$  y  $90 +20 = 110$ .
- d. para la determinación de una impureza: desde el grado reportado de la impureza hasta 120% de la especificación. Para impurezas que se conozca que son inusualmente potentes o que producen efectos farmacológicos tóxicos o inesperados, el límite de detección / cuantificación debe ser suministrado conjunto con el nivel al cual las impurezas deben controlarse.

#### **3.2.3.5.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, rango.**

*Definición:* Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito.

*Determinación:*

- a. Valoración de un fármaco o de un producto terminado: de 80% a 120% de la concentración de prueba.
  - b. Determinación de una impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.
  - c. Para uniformidad del contenido: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (por ejemplo: inhaladores de dosis fija).
  - d. Para pruebas de disolución:  $\pm 20\%$  por encima del intervalo especificado (por ejemplo: si los criterios de aceptación de un producto de liberación controlada cubren una región que varía de 20% después de una hora a 90% después de 24 horas, en el intervalo validado sería de 0% a 110% del valor especificado en la etiqueta).
-



---

**3.2.3.5.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, rango.**

*Definición:* Conjunto de valores de mensurando para el cual el error de un instrumento de medición es pretendido que se contenga dentro de límites especificados.

*Determinación:* Explicada en el acápite 3.2.3.4.5. “Guía de la EURACHEM, linealidad, Tabla 7. Determinación de la linealidad,” página 20.

**3.2.3.6. LIMITE DE DETECCION:****3.2.3.6.1. Informe 32 de la OMS<sup>[1]</sup>, límite de detección.**

*Definición:* El límite de detección es el nivel más bajo de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente determinado en forma cuantitativa, empleando un método específico bajo las condiciones experimentales exigidas. Dicho límite generalmente se expresa en términos de la concentración de analito (por ejemplo, en microgramos por litro) en la muestra. Cuando la medición final se basa en la lectura de un instrumento, se deberá tener en cuenta la respuesta de fondo (la proporción entre señal y ruido).

*Determinación:* No definida en el Informe 32 de la OMS.

**3.2.3.6.2. Guía ISO 5725, límite de detección.**

No definida en la Guía ISO 5725.

**3.2.3.6.3. Guía Q2 (R1) ICH<sup>[5]</sup>, límite de detección.**

*Definición:* El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

*Determinación:* Varias aproximaciones para determinar el límite de detección son posibles, dependiendo si el procedimiento es no-instrumental o instrumental. Aproximaciones distintas a las enumeradas a continuación podrían ser aceptadas.

1. Aproximación basada en evaluación visual: es utilizada para métodos no-instrumentales pero puede ser utilizada con métodos instrumentales. El límite de detección es determinado por el análisis de muestras con concentración conocida de analito y el establecimiento del nivel mínimo a la cual el analito puede ser consistentemente detectado.

2. Aproximación basada en Señal – Ruido: esta aproximación sólo puede ser aplicada a procedimientos analíticos que exhiben ruido en la línea base. La determinación de la relación

---

señal – ruido se lleva a cabo por comparación de la señal de muestras de analito de concentración baja con muestras blanco y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito consistentemente es detectado. Una relación señal – ruido entre 3 ó 2:1 es generalmente considerada aceptable para estimar el límite de detección.

3. Aproximación basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: el límite de detección puede ser expresado como:  $3.3 \sigma / s$ , en donde:

$\sigma$ : la desviación estándar de la respuesta

$s$ : la pendiente de la curva de calibración

La pendiente  $s$  puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito. La estimación de  $\sigma$  puede llevarse a cabo por un número variado de formas, por ejemplo:

3.1 Basados en la desviación estándar del blanco: llevado a cabo por análisis de un número apropiado de muestras blanco y calculando la desviación estándar de la respuesta.

3.2 Basados en la curva de calibración: realizar una curva de calibración del analito en el rango del límite de detección. La desviación estándar residual de la regresión lineal o la desviación estándar del intercepto de la regresión lineal pueden ser utilizados como la desviación estándar.

El límite de detección y el método utilizado para la determinación del límite de detección debe ser reportado. Si el límite de detección es determinado basándose en evaluación visual o en base a la relación señal – ruido, la presentación de los cromatogramas pertinentes es considerado aceptable como justificación.

#### **3.2.3.6.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, límite de detección.**

*Definición:* Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Es una característica de las prueba de límite.

*Determinación:* Para procedimientos instrumentales, se determina el límite de detección mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, se propone que el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.

**3.2.3.6.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, límite de detección.**

*Definición:* La EURACHEM adopta varias definiciones, entre ellas encontramos:

El mínimo contenido que puede ser determinado con razonable certeza estadística.

*Determinación:*

Tabla 8. Determinación del Límite de detección.

Que analizar	Que calcular a partir de los datos
a. 10 muestras blancos independientes, medidas por separado.  o  b. 10 muestras blanco, independientes fortificadas a concentraciones bajas aceptables, medidas por separado.	Desviación estándar de las muestras "s" de a.) Valores de las muestras del blanco u b.) Valores de las muestras del blanco fortificado  Expresar el límite de detección como la concentración del analito correspondiente a a.) Media del valor del blanco + 3s o b.) 0 + 3s.
Esta aproximación asume que una señal por arriba de 3s el valor del blanco solo puede se aumentada por el blanco en un 1% de la veces y por eso solo puede verse aumentada por otra señal, como la del mensurando. La aproximación a.) Es solo útil cuando la muestra del blanco da desviaciones estándares no-cero. Alcanzar una verdadera muestra de blanco puede ser difícil.	
c. 10 muestras blanco fortificadas independientes a concentraciones bajas, medidas por separado.	Desviación estándar de las muestras "s" de los valores del blanco fortificado.  Expresar el límite de detección como la concentración del analito correspondiente a el valor de las muestras del blanco + 4,65s.
La concentración mínima aceptable es tomada como la concentración mínima para la cual un grado aceptable de incertidumbre puede ser alcanzado.  Asume una práctica normal de evaluar las muestras y el blanco por separado y corrige para el blanco por sustracción de la concentración del analito correspondiente a la señal del blanco de la concentración correspondiente a la señal de la muestra.	

**3.2.3.7. LIMITE DE CUANTIFICACION:****3.2.3.7.1. Informe 32 de la OMS<sup>[1]</sup>, límite de cuantificación.**

*Definición:* El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en la muestra, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables cuando se emplea el procedimiento exigido.

---

*Determinación:* Se mide mediante el análisis de muestras que contengan cantidades decrecientes de analito y la determinación del nivel más bajo al cual pueden alcanzarse grados aceptables de exactitud y precisión. Cuando la evaluación final se basa en la lectura Instrumental, tal vez sea necesario evaluar y tener en cuenta la magnitud de la respuesta de fondo (la proporción entre Señal y ruido). En muchos casos el límite de cuantificación es aproximadamente el doble que el de detección.

#### **3.2.3.7.2. Guía ISO 5725, límite de cuantificación.**

No definida en la Guía ISO 5725.

#### **3.2.3.7.3. Guía Q2 (R1) ICH <sup>[5]</sup>, límite de cuantificación.**

*Definición:* El límite de cuantificación de un procedimiento analítico independiente es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una apropiada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices y es usado particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

*Determinación:* Varias aproximaciones para determinar el límite de cuantificación son posibles, dependiendo si el procedimiento es no-instrumental o instrumental. Aproximaciones distintas a las enumeradas a continuación podrían ser aceptadas.

1. Aproximación basada en evaluación visual: es utilizada para métodos no-instrumentales pero puede ser utilizada con métodos instrumentales. El límite de cuantificación es determinado por el análisis de muestras con concentración conocida de analito y el establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede ser cuantificado con aceptable exactitud y precisión.
2. Aproximación basada en señal – ruido: esta aproximación sólo puede ser aplicada a procedimientos analíticos que exhiben ruido en la línea base. La determinación de la relación señal – ruido se lleva a cabo por comparación de la señal de muestras de analito de concentración baja con muestras blanco y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito puede ser cuantificado consistentemente. Una relación señal – ruido de 10:1 es generalmente considerada aceptable para estimar el límite de cuantificación.
3. Aproximación basada en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: el límite de cuantificación puede ser expresado como:  $10 \sigma / s$ , en donde:

$\sigma$ : la desviación estándar de la respuesta

---

s: la pendiente de la curva de calibración

La pendiente  $s$  puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito. La estimación de  $\sigma$  puede llevarse a cabo por un número variado de formas, por ejemplo:

3.1 Basados en la desviación estándar del blanco: es llevado a cabo por análisis de un número apropiado de muestras blanco y calculando la desviación estándar de la respuesta.

3.2 Basados en la curva de calibración: debe realizarse una curva de calibración con muestras de analito en el rango del límite de cuantificación. La desviación estándar residual de la regresión lineal o la desviación estándar del intercepto de la regresión lineal pueden ser utilizados como la desviación estándar.

Debe ser reportado el límite de cuantificación y el método utilizado. El límite debe ser subsecuentemente validado por el análisis de un número apropiado de muestras conocidas a estar próximas o preparadas al límite de cuantificación.

#### **3.2.3.7.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, límite de cuantificación.**

*Definición:* Es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.

*Determinaciones:* Para procedimientos instrumentales, el límite cuantitativo se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

#### **3.2.3.7.5. Guía de la EURACHEM<sup>[12]</sup>, límite de cuantificación.**

*Definición:* También conocido como “límite de determinación.” El límite de cuantificación es estrictamente la menor concentración de analito que puedes ser determinado con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

*Determinación:*

Tabla 9. Determinación del Límite de cuantificación.

---

Que analizar	Que calcular a partir de los datos
a.) 10 muestras blanco independientes medidas por separado	desviación estándar de la muestras “s” de los valores del blanco  Expresar el límite de cuantificación como la concentración del analito correspondiente al valor de la muestra del blanco + ya sea: i. 5s, ii.6s ó iii. 10s
b.) Alícuotas fortificadas de muestras blanco a concentraciones variadas de analito cercanas al límite de cuantificación  Medir, por separado, 10 replicas independientes a cada nivel de concentración.	Calcular la desviación estándar “s” de los valores del analito a cada concentración. Graficar “s” versus concentración y asignar un valor al límite de cuantificación por inspección.  Expresar el límite de cuantificación como la minima concentración del analito que puede ser determinada con un grado aceptable de incertidumbre.
Normalmente el límite de cuantificación forma parte del estudio para determinar el rango de trabajo. No debe ser determinado por extrapolación por debajo de la menor concentración del blanco fortificado.	

### **3.2.3.8. ROBUSTEZ:**

#### **3.2.3.8.1. Informe 32 de la OMS<sup>[1]</sup>, robustez.**

*Definición:* La robustez, o dureza, es la capacidad del procedimiento de producir resultados analíticos de exactitud y precisión aceptables bajo variadas condiciones. Constituye una medida del grado en que los resultados obtenidos de muestras separadas y supuestamente idénticas del mismo lote de material homogéneo son influenciados por los cambios en las condiciones operacionales o ambientales, pero son concordantes con las especificaciones establecidas para el procedimiento.

*Determinación:* No definida en el Informe 32 de la OMS.

#### **3.2.3.8.2. Guía ISO 5725, robustez.**

No definida en la Guía ISO 5725.

---

**3.2.3.8.3. Guía Q2 (R1) ICH<sup>[5]</sup>, robustez.**

*Definición:* La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer inalterado por pequeñas, variaciones deliberadas en los parámetros del método y proveer indicaciones de su fiabilidad durante el uso normal.

*Determinación:* La evaluación de la robustez debe ser considerada durante la etapa de desarrollo y depende del tipo de procedimiento bajo estudio. Debe demostrar su fiabilidad en el análisis con respecto a variaciones deliberadas en los parámetros del método. Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, las condiciones analíticas deben ser controladas o una acción precaucionaría debe ser incluida en el procedimiento. La consecuencia de la evaluación de la robustez debe ser que una serie de parámetros del sistema (por ejemplo: resolución del ensayo) es establecido para asegurar que la validez de los procedimientos analíticos es mantenida durante su uso.

Ejemplos de variaciones típicas:

- estabilidad de soluciones analíticas
- tiempo de extracción

Ejemplos de variaciones típicas para el caso de cromatografía líquida:

- influencia de las variaciones de pH en la fase móvil
- influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil
- diferentes columnas (de diferentes lotes y/o proveedores)
- temperatura
- velocidad de flujo

**3.2.3.8.4. Instrucciones de la USP<sup>[13]</sup>, robustez.**

*Definición:* La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por variaciones pero deliberadas en los parámetros enumerados en la documentación del procedimiento, y a la vez, da una idea de su aptitud durante su uso normal.

*Determinación:* La robustez puede determinarse durante la etapa del desarrollo del procedimiento analítico. La USP no orienta sobre los estudios y/o cambios a llevar a cabo durante la etapa del desarrollo del procedimiento analítico.

---

**3.2.3.8.5. Guía EURACHEM<sup>[12]</sup>, robustez.**

*Definición:* La guía de la EURACHEM adopta la definición presentada por la guía de ICH Q2, mostrada en el acápite “3.2.3.8.3. Guía Q2 (R1) ICH”, de la página 29.

*Determinación:*

Tabla 10. Determinación de la robustez.

<b>Analizar</b>	<b>No. de determinaciones</b>	<b>Calcular</b>	<b>Comentarios</b>
Identificar variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método. Diseñar experimentos (analizando materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para monitorear los efectos en la exactitud y precisión de cambios sistemáticos en variables	Analizar cada conjunto de condiciones experimentales una vez	Determinar el efecto de cada cambio de condiciones en la media.  Clasificar las variables en orden ascendente de efecto en el desempeño del método	Diseñar el control de calidad que permita controlar las variables críticas  Concentrarse en dichas variables para la mejora del método

**3.3. INCERTIDUMBRE<sup>[29, 30, 31]</sup>**

La incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado, ya que indica cuanto puede alejarse un resultado del valor considerado verdadero. Por tanto, los resultados siempre deben ir acompañados de su incertidumbre para que se puedan tomar decisiones basadas en dichos resultados<sup>[32]</sup>.

La Guía ISO 3534-1<sup>[33]</sup> define incertidumbre como “una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro de las cuales se afirma que está el valor verdadero”.

**3.3.1. APROXIMACIONES EXISTENTES. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE.**

Se han propuesto varias aproximaciones para calcular la incertidumbre. En 1993 la ISO desarrolló una aproximación para calcular la incertidumbre en medidas físicas. Dos años después, la EURACHEM adaptó esta aproximación a medidas químicas. Esta adopción fue muy criticada ya que se hizo sin considerar las diferencias que hay entre los procesos de medidas químicas y



---

físicas, es decir, identificando y cuantificando cada uno de los componentes de incertidumbre en los procesos de medida químico. Esta metodología es muy costosa e inviable en mucho de los procedimientos analíticos. Se han ido imponiendo metodologías basados en calcular la incertidumbre más globalmente, es decir, agrupando términos de incertidumbre siempre que fuera posible. La primera de estas “*aproximaciones globales*” la propuso el Comité de Métodos Analíticos (para sus siglas en inglés, AMC) en 1995. Esta aproximación conocida también como “*top-down*” está basada en utilizar la información de ejercicios colaborativos. En 1997, el *Nordic Committee of Food Analysis* (NMKL) adoptó la aproximación “*top-down*” a un laboratorio individual. Se fueron proponiendo otras aproximaciones globales para calcular la incertidumbre de la validación de métodos analíticos. El debate y la crítica generada hicieron que EURACHEM incluyera la posibilidad de calcular la incertidumbre utilizando la información de la validación. Esta filosofía del cálculo integral de la incertidumbre se está imponiendo cada vez más.

### 3.3.2. APROXIMACIÓN ISO.

Este método recibe el nombre de “*bottom up*” debido a que divide el proceso de medida químico en sus partes fundamentales, cada una de las partes fundamentales se subdivide en contribuciones más pequeñas. Posteriormente, se calcula la incertidumbre de cada una de sus partes y se combinan para obtener la incertidumbre global del proceso de medida químico.

El proceso de cálculo de la incertidumbre, según la ISO GUM <sup>[30]</sup>, se pudiera dividir en las siguientes etapas:

- Definición del mensurando.
- Identificación de variables que influyen en el mensurando; se puede realizar a través de un flujograma del ensayo.
- Establecimiento del modelo matemático: relación entre mensurando y variables.
- Identificación de los componentes de la incertidumbre; se puede realizar a través de un diagrama de causa-efecto.
- Cálculo de la incertidumbres; evaluación de las incertidumbres estándares tipo A y B.
- Estimación de la incertidumbre combinada por la ley de propagación de la incertidumbre.
- Evaluación de las contribuciones que más influyen en la incertidumbre combinada; se puede realizar a través de un diagrama de Pareto.

- Reporte de resultados.

### **3.4. CALIBRACION Y VERIFICACIÓN DEL INSTRUMENTAL** <sup>[35]</sup>

La calificación de un instrumento analítico es la recopilación de evidencia documental de que un instrumento cumple con los fines para los cuales fue diseñado y se encuentra correctamente mantenido y calibrado. Es así, que dentro de la validación, la calificación de equipos forma parte de sus pre-requisitos.

### **3.5. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN** <sup>[12, 34]</sup>

Un protocolo de validación es un documento escrito y aprobado que detalla los requerimientos para la validación. El protocolo de validación debe definir, como mínimo: la tarea a lograr, la persona(s) que prepara(n) el protocolo bajo ensayo, las pruebas a realizar, las personas que autorizan el protocolo antes de la prueba y la fecha de autorización, las personas que aprobarán el protocolo antes de realizar las pruebas, etc. Una vez que el proceso de validación ha sido completado, es importante documentarlo para que el método pueda ser implementado sin ambigüedad. Las distintas evaluaciones a la metodología realizadas durante el proceso de validación asumen que, durante su uso, el método cada vez será utilizado bajo las mismas condiciones. Si en dado caso no fuera así, el procedimiento actual de la metodología no corresponderá al procedimiento predicho por los resultados de la validación. Consecuentemente la documentación debe limitar la capacidad de introducir variaciones accidentales a la metodología. Adicionalmente, la propia documentación es necesaria para procesos de auditorías y evaluación y puede ser requerida para efectos contractuales o regulatorios.

---

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. EQUIPOS

#### 4.1.1. *Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 100 Series.* <sup>[36]</sup>

*Características:* El equipo cuenta con una bomba isocrática Agilent 1100, con escala de 0.001 mL/min hasta 10 mL/min y rango presión de operación de 0-40 MPa (0-400 bar, 0-5880 psi). El sistema hidráulico cuenta con dos pistones en serie, pistones flotantes y válvula de entrada activa.

El equipo cuenta con detector de múltiples longitudes de onda (MWD): 1024 elementos de arreglo de Diodo, lámparas de Deuterio y Tungsteno, ruido de  $\pm 1 \times 10^{-5}$  AU a 254 nm y a 270 nm, intervalo de longitud de onda de 190-950 nm, ancho de banda programable (1, 2, 4, 8, 16). La precisión de la longitud de onda es de  $\pm 1$  nm, con autocalibración con las líneas de Deuterio después de haberse verificado con el filtro de Óxido de Holmio.

#### 4.1.2. *Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Perkin Elmer 200 Series.* <sup>[37]</sup>

*Características:* El equipo cuenta con una bomba (series 200) y un detector UV-Visible (series 200). La bomba provee estabilidad y compensación de la compresibilidad. Está diseñada con sellos de pistones de larga vida y mantiene velocidades de flujo precisas (menor de 0,1 %). Ofrece seguridad en la composición de la fase móvil ( $\pm 0,50$  %) y la precisión del tiempo de retención es menor de 0,1 %, tanto para separación isocrática como para la separación por gradiente. El detector UV-Visible (series 200) con diseño óptico de doble rayo presenta alta sensibilidad y estabilidad.

#### 4.1.3. *pH-Metro Oakton pH 500.* <sup>[38]</sup>

*Características:* Es un pH metro de mesa que permite lecturas de pH, milivoltios y temperatura. Con entrada ATC que permite la compensación automática de la temperatura (0-100 °C, resolución 0.1 °C y precisión relativa de 0,5 °C). Presenta una resolución para la medida del pH de 0,01 y una precisión relativa de  $\pm 0,01$  pH. Presenta una precisión de 1 mV y una precisión relativa de 2 mV para la lectura de los milivolt.

El electrodo es OAKTON WD-35801-72 (todo en uno: electrodo de lectura y referencia y sensor de temperatura) con doble empalme que permite su utilización en la mayoría de las aplicaciones (agua sucia, orgánicos, metales pesados, etc.).

#### 4.1.4. *Balanza analítica OHAUS EXPLORER.* <sup>[39]</sup>

---

**Características:** Es una balanza con capacidad de 210 g, con una capacidad de lectura de 0,001 g, una repetibilidad (desviación estándar) de 0,0005 g y una linealidad de  $\pm 0,002$  g.

#### **4.1.5. Baño ultrasónico Cole-Parmer.** <sup>[40]</sup>

**Características:** Baño ultrasónico serie 8891, con cronómetro mecánico y capacidad para tres matraces volumétricos de 100 mL.

#### **4.1.6. Agitador magnético con plancha calefactor Corning.** <sup>[41]</sup>

**Características:** Plato de cerámica de 4" x 5" con un rango de velocidad de 60 a 1100 r.p.m. y con máximo de capacidad para agitación de 2 L. Temperatura variable.

#### **4.1.7. Equipo de Filtración Schott Duran (S & S).**

**Características:** Embudo Schott Duran (S&S) de 450 mL de capacidad, Kitasato Schott Duran (S&S) de 1000 mL de capacidad, Bomba de vacío Gast (Michigan, USA) con un máximo de presión de 4.08 bar y membranas de filtración para las soluciones de nylon de 47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de Agilent Technologies.

### **4.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LOS EQUIPOS.**

#### **4.2.1. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 100 Series y Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Perkin Elmer 200 Series** <sup>[36,37]</sup>.

Se realiza una calificación de la operación, con una frecuencia semestral, de los equipos y una calificación del desempeño de los mismos con una frecuencia mensual siguiendo el procedimiento de trabajo descrito en PET- CC047/I-004 <sup>[42]</sup>.

En la calificación de la operación se verifican los siguientes parámetros:

##### **a. Calificación del Detector:**

**a.1. Re-calibración de la longitud de onda:** líneas de emisión alfa (656,1 nm) y beta (486 nm) de la lámpara de deuterio para la calibración de la longitud de onda.

**a.2. Ensayo de óxido de holmio:** Utiliza tres máximos característicos de absorbancia del filtro instalado en el detector, se utiliza para verificar la exactitud de la longitud de onda.

**a.3. Ensayo de intensidad:** Mide la intensidad de las lámparas de deuterio y wolframio en el rango completo de longitud de onda (190-950). Se utilizan 4 rangos espectrales para evaluar el espectro de intensidad. Se utiliza para determinar el rendimiento de las lámparas y la óptica.

---

**a.4. Ensayo de celda:** Permite determinar la intensidad de las lámparas de deuterio y wolframio en el rango completo de longitud de onda (190-250), alternativamente con y sin celda de flujo instalada. Se usa para comprobar si las ventanas de la celda están sucias o contaminadas.

**a.5. Ensayo de corriente oscura (sólo para el equipo agilent):** Mide la fuga de corriente de cada diodo, mide la fuga de los diodos, que podría causar no linealidad a ciertas longitudes de onda.

**a.6. Ensayo del filtro:** Comprueba la operación correcta del montaje del filtro de óxido de holmio.

**b. Calificación de la Bomba:**

**b.1. Exactitud y precisión del flujo:** Verificar el flujo del instrumento.

**b.2. Ensayo de Presión:** Verificar la caída de Presión.

**b.3. Ensayo Automático de fugas:** Verificar el ajuste de los componentes de la bomba.

**b.4. Ensayo de Gradiente:** (Sólo para el equipo Perkin Elmer), Verificar el funcionamiento de la cámara de mezclado, las entradas de solventes, reservorios y bomba.

**b.5. Ensayo de la precisión de: áreas y tiempos de retención:** Verificar el buen funcionamiento de la bomba.

**c. Calificación de las Columnas:** Se utiliza la muestra Universal LC Test Mix (Supelco), Catálogo número: 861365. Con los 5 compuestos presentes en este Kit se estudian: la eficiencia de las columnas, naturaleza hidrofóbica y selectividad y la presencia y actividad de los grupos silanoles libres.

En la calificación del desempeño se verifican los siguientes parámetros:

Utilizando la muestra Universal LC Test Mix (Supelco), Catálogo número: 861365, se evalúa mensualmente los siguientes parámetros:

- a. Precisión en las áreas y los tiempos de retención
- b. Eficiencia de la columna (platos teóricos para cada pico)
- c. Resolución entre los picos.

**4.2.2. pH-Metro Oakton pH 500<sup>[38]</sup>.**

---

Se realiza una calificación de la operación (con una frecuencia cuatrimestral) del pH-Metro *Oakton* pH 500 siguiendo el procedimiento de trabajo descrito en: PET-CC048/I-002 <sup>[43]</sup>. Para la calibración se utilizan las siguientes soluciones tampón: solución tampón biftalato pH 4, solución tampón fosfato pH 7 y solución tampón borato pH 10, todas de la firma J.T. Baker. Estas soluciones fueron verificadas por el proveedor, con soluciones tampón estándar NIST. En esta calificación se verifican los siguientes parámetros:

**a. Verificación del Potenciómetro:** Lectura en mV de las soluciones tampón estándar pH 4,00, 7,00 y 10,00 y comprobación de que las mismas se encuentren dentro de las especificaciones.

**b. Porcentaje de Tiempo de Respuesta:** Para comprobar si el electrodo está sucio.

**c. Calibración de Sistema Potenciométrico:** Se calcula la eficacia del potenciómetro dividiendo la pendiente obtenida (potencial (mv) versus pH) entre la pendiente teórico (-59.16) y multiplicando la fracción por 100.

**d. Verificación de la Calibración:** Comprobar si se cumple la siguiente condición:  $b_0 = \beta_0 = 0$  (intercepto) y  $b = \beta = 1$  (pendiente) en la curva: valores de pH obtenido versus valores de pH teóricos.

**e. Prueba de Repetibilidad:** Se comprueba la repetibilidad de las mediciones de pH de 3 soluciones de referencia: pH 4.00, 7.00 y 10.00 a una temperatura de 25° C durante 5 días consecutivos y por analistas diferentes <sup>[44]</sup>.

#### 4.2.3. Balanza analítica OHAUS EXPLORER <sup>[39]</sup>.

Se realiza una calibración de la operación de la balanza externa cada 6 meses. La calibración la realiza el ente calibrador: *Infarma*, el cuál reporta la siguiente cadena de trazabilidad: patrones de trabajo con certificados N° 20060515-3C y N° 20060531-16J de junio-06 de *Infarma*, trazados a los patrones de referencia con número de serie 13728247 de *SCM Metrología y Laboratorios S.A.*, los cuales están trazados a los patrones de referencia con el certificado *LACOMET* 13720305 del Laboratorio Costarricense de Metrología, pesas patrón *TROEMNER* de: 20 g con certificado de calibración N° 422032B-1, 50 g con certificado de calibración N° 422032A-1 y 100 g con certificado de calibración N° 422032-1.

En cada calibración se realizan las siguientes pruebas a la balanza:

- a. Prueba de linealidad

- b. Prueba de Repetibilidad
- c. Prueba de Excentricidad

Semanalmente se realiza una verificación de la deriva de la balanza.

#### **4.3. MATERIALES:**

##### **4.3.1. Cristalería y otros:**

Matraz volumétrico  $50 \pm 0.06$  mL Clase A

Matraz volumétrico  $50 \pm 0.10$  mL Clase B

Matraz volumétrico  $100 \pm 0.08$  mL Clase A

Matraz volumétrico  $100 \pm 0.16$  mL Clase B

Pipeta volumétrica  $1,0 \pm 0.006$  mL Clase A

Pera pipeta

*Beaker* 100,0 mL

Espátula de acero

Embudo de plástico

Papel aluminio

Jeringas descartables

Papel filtro: No. 2 ó 4

Probeta: 50, 100, 500 mL

Filtros tipo acrodiscos de 0.45 micras

##### **4.3.2. Reactivos:**

Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) grado reactivo

Acido fosfórico concentrado grado reactivo

Estándar de Clotrimazol USP. Número de lote vigente K0C282.

---

Muestra de referencia interna de Tri-Clor Crema. Muestras preparadas a cinco niveles de concentración de Clotrimazol: 50, 80, 100, 120 y 150 % de la cantidad declarada de Clotrimazol en Tri-Clor Crema

Placebo Tri-Clor Crema

Agua destilada. Características: pH: 5.0-7.0; negativa a las siguientes pruebas: cloruros, sulfatos, nitratos y amoníaco, calcio, anhídrido carbónico, metales pesados, materia orgánica y conductividad menor 0.5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Metanol grado HPLC

Etanol 95 % grado reactivo

Todos los reactivos utilizados son de la marca MERCK. Vigentes y de calidad reactivo. El Metanol a utilizar es de calidad HPLC. El Etanol a utilizar es de calidad reactivo.

#### **4.3.3. Parámetros de calibración de la cristalería.**

Se realiza una comprobación cada dos años del material volumétrico de medición. A cada material se le determina el volumen de agua, medido por el mismo, a una temperatura de 20° C (tanto el material como el agua). Se realizan 10 determinaciones por cada material y el valor promedio de volumen obtenido debe de encontrarse dentro de la tolerancia especificada por el material. El procedimiento de verificación de la cristalería se encuentra descrito en PET-CC049 <sup>[45]</sup>.

### **4.4. PROCEDIMIENTO**

Debido a que las normativas para la validación de métodos analíticos que rigen a la industria farmacéutica son la de la ICH <sup>[5]</sup> y la de la USP, se estableció la normativa de la ICH <sup>[5]</sup> para la validación de los métodos analíticos de Laboratorios Andifar. Para cumplir la evaluación de los diferentes parámetros de validación, se utilizaron herramientas que no están descritos en esta guía. Como modelo se utilizó la validación de la determinación de Clotrimazol por HPLC en Tri-Clor Crema, la cual se presenta a continuación:

#### **4.4.1. MÉTODO DE ENSAYO** <sup>[46, 47, 48]</sup>

##### **4.4.1.1. Preparación de soluciones.**

- Solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (29.0 mM, pH 2.5). Se disolvió 0.394 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 90 mL de agua destilada. Una vez disuelto se ajustó a pH 2.5 con ácido fosfórico concentrado. Se llevó a matraz volumétrico de 100 mL y se enrasó con agua destilada.



- 
- Fase móvil. Se mezcló 150 mL de metanol con 50 mL de solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  29 mM, pH 2.5; proporción (75:25). Se pasó a través de filtro de membrana de 0.2 micras y se desgasificó. Se midieron los volúmenes de forma individual y después se mezclaron.

#### **4.4.1.2. Preparación del estándar.**

Se transfirieron 125.0 mg de Clotrimazol USP, pesados con exactitud, a *beaker* de 100 mL. Se añadió al *beaker* 20 mL de etanol y se aplicó ultrasonido durante 5 minutos. Auxiliándose de un embudo, se transfirió el contenido del *beaker* hacia matraz aforado de 50 mL. Se realizaron lavados al *beaker* en tres ocasiones con 5,0 mL de etanol cada vez, de forma tal que todo el contenido se trasvasó al matraz (no se viró el *beaker* hasta realizar los tres lavados). Se cerró el matraz volumétrico y se esperó a que alcance temperatura ambiente. Una vez alcanzada, se enrasó con etanol, se cerró y agitó vigorosamente (solución madre del estándar). Se tomó 1 mL de la solución madre del estándar y se transfirió a matraz volumétrico de 25 mL, se llevó a marca de aforo con fase móvil y se mezcló. Se filtró a través de filtro de 0.45 micras o con menor tamaño de poro.

#### **4.4.1.3. Preparación de valoración.**

Se pesó con exactitud en *beaker* de 100 mL una cantidad de Tri-Clor Crema equivalente a 5,0 mg de Clotrimazol (0,500 g de Tri-Clor Crema). Se calentó moderadamente la crema hasta que se fundió (regulador de la plancha calefactora entre 3 – 4). Se añadieron 10,0 mL de etanol al *beaker*, se calentó hasta ebullición de manera que se disolviera toda la crema (solo hasta inicio de ebullición). Auxiliándose de un embudo, se transfirió el contenido del *beaker* hacia matraz volumétrico de 50,0 mL. Se recuperó lo que quedó en las paredes del *beaker* con tres lavados de 2,0 – 3,0 mL con fase móvil (no se viro el mismo hasta realizar el lavado de las paredes). Se añadieron 10,0 mL de fase móvil al *beaker* y se calentó nuevamente hasta ebullición para disolver los restos de crema adheridos a las paredes y el fondo del *beaker*. Se trasvasó el contenido del *beaker* al matraz volumétrico de 50,0 mL, auxiliándose del embudo. Se recuperó lo que quedó en las paredes del *beaker* con tres lavados de 2,0 – 3,0 mL con fase móvil. Se llevó a marca de aforo con fase móvil. Se espero que alcance la temperatura ambiente durante 15 minutos y se enrasó nuevamente. Se aplicó ultrasonido durante 30 minutos. Se agitó de forma manual y vigorosa a los 10,0 minutos de haber iniciado la aplicación del ultrasonido y al final de la aplicación del mismo. Se dejó en reposo el matraz volumétrico durante 30,0 minutos. Se filtró utilizando papel whatman No. 2 – 4 (se desechó el primer filtrado). Finalmente se tomó una alícuota de este filtrado y se filtró a través de filtro de 0.45 micras o con menor tamaño de poro.

#### **4.4.1.4. Sistema cromatográfico.**

---

Se equipó un cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm, con una columna de 4.6 mm x 15 cm rellena de material L1 (C18) de 10 µm y temperatura de la misma a condiciones ambientales (Temperatura ambiental del laboratorio: 20 – 28° C). La velocidad de flujo fue de 1,0 mL por minuto.

#### 4.4.1.5. Procedimiento.

Se inyectó por separado en el cromatógrafo, volúmenes iguales (20 µL) de la Preparación del estándar y la Preparación de valoración. Se registraron los cromatogramas y se midieron las respuestas correspondientes a los picos principales. Se calculó la cantidad, en mg, de Clotrimazol ( $C_{22}H_{17}ClN_2$ ) por g de crema, utilizando la fórmula:

$$f : \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{A_{STD} W V_{DSTD1} V_{DSTD2} R}$$

En donde, f: mg de clotrimazol por g de crema;  $A_{MTA}$ : Área de la muestra;  $A_{STD}$ : Área del estándar;  $V_{DMTA}$ : Volumen dilución de la muestra (50 mL);  $\text{Peso}_{STD}$ : peso del estándar;  $P_{STD}$ : Pureza del estándar;  $V_{ASTD1}$ : Volumen alícuota del estándar (1 mL); W: Peso de la muestra;  $V_{DSTD1}$ : Volumen dilución No. 1 del estándar (50 mL);  $V_{DSTD2}$ : Volumen dilución No. 2 del estándar (25 mL) y R: Recobrado.

#### 4.4.2. DISEÑO METODOLÓGICO DE VALIDACIÓN

##### 4.4.2.1. Desarrollo del Plan Maestro de Validación de Laboratorios Andifar<sup>[34, 45]</sup>.

Se desarrolló el *Plan Maestro de Validación de Laboratorios Andifar*, el cual incluye: validación de procesos productivos, validación de procedimientos de limpieza, validación de sistemas de aire y aguas y validación de métodos analíticos. El plan maestro de validación se planificó en varias etapas a ser implementadas en un periodo de 8 años.

##### 4.4.2.2. Desarrollo del Plan Maestro de Validación del Laboratorio de Control de Calidad<sup>[34, 49, 50]</sup>.

Este *Plan Maestro* se supedita al *Plan Maestro de Validación de Laboratorios Andifar*, se incluyó la calificación del instrumental, calificación del personal y la validación de métodos analíticos, planificado en etapas que deben cumplimentarse en un periodo de 2 años.

##### 4.4.2.3. Desarrollo del Protocolo de Validación de la Determinación de Clotrimazol por HPLC en Tri-Clor Crema<sup>[34, 49, 51]</sup>.

---

En este documento se incluyó el título, la fecha a partir de la cual está vigente, el número de revisión, la fecha de la próxima revisión, el personal que lo confeccionó, lo revisó y aprobó. También se incluyó el objetivo, el alcance del método, una justificación del porqué la metodología utilizada es la apropiada, la responsabilidades del personal involucrada en la validación del método, la cualificación del instrumental y su funcionamiento, el muestreo y su procedimiento de muestreo, la descripción del método, las fuentes de incertidumbre y los factores críticos del ensayo. Por último se incluyó la relación de parámetros a evaluar, el diseño experimental y los criterios de aceptación por parámetros.

#### **4.4.2.4. Parámetros evaluados, diseño experimental y criterios de aceptación.**

##### **4.4.2.4.1. Evaluación del Desempeño Instrumental.**

Se evaluó el desempeño cromatográfico de los equipos Agilent <sup>[36]</sup> y Perkin Elmer <sup>[37]</sup>, para ello se realizaron inyecciones repetidas de una muestra de Tri-Clor Crema al 100 % de la cantidad declarada de Clotrimazol (6 réplicas) preparado según acápite: “4.4.1.3. Preparación de valoración”, página 39. Los criterios de aceptación para el pico de Clotrimazol y la precisión del sistema para ambos equipos cromatográficos:

*Eficacia, N:* Se recomienda que sea superior a 2,000.

*Factor de Simetría, T:* Preferiblemente valores entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0

*Capacidad, K:* Preferiblemente superiores a 2.

*Repetibilidad del Sistema, Sr:* desviación estándar relativa menor que 2 %.

Estos criterios fueron obtenidos de la bibliografía consultada <sup>[46, 47, 48]</sup>.

##### **4.4.2.4.2. Evaluación de la Exactitud.**

###### **a. Exactitud.**

Para la determinación de la exactitud se utilizó el procedimiento recomendado por la Guía Q2 (R1) <sup>[5]</sup> descrito en la página 11, ver: “3.2.3.1.3. Guía Q” (R1) ICH <sup>[5]</sup>, exactitud”. A partir de un placebo de Tri-Clor Crema y adicionando cantidades fijas de Clotrimazol, se prepararon 3 muestras que contenían 3 niveles de concentración de Clotrimazol (80%, 100% y 120% de la cantidad declarada de este principio activo en la Crema). Siguiendo el procedimiento descrito en: “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38, se realizaron 3 determinaciones de Clotrimazol para cada nivel de

concentración (9 determinaciones). Para cada análisis se determinó el recobrado: dividiendo el valor observado entre el valor esperado y multiplicándolo por 100.

Se realizó una prueba estadística t para determinar si el recobrado promedio difería del 100 %, el cálculo experimental del estadístico t se realizó utilizando la siguiente fórmula <sup>[52]</sup>:

$$t_c = \frac{|100 - \text{Recuperación Promedio}| \times \sqrt{n}}{\text{C.V.}}$$

Criterio de Aceptación: Se comparó el valor de t experimental con el tabulado: t (P=0.05; grados de libertad: n-1)=2.306, donde se rechazaría la hipótesis nula ( $H_0$ ) (Recobrado = 100%), si el valor de t experimental era mayor que el tabulado.

### **Calculo del intervalo de confianza de la recuperación.**

El intervalo de confianza se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Intervalo} = R \pm 2u_R$$

En donde  $R$  se calculó como se indica en el acápite “5.2.4. *Estimación del recobrado*”, página 64 y  $u_R$  se calculó como se indica en el inciso j. del acápite “5.9.5. *Cálculo de las incertidumbres*”, página 86.

### **b. Errores sistemáticos.**

Para corroborar la no existencia de errores sistemáticos, se procedió de la siguiente manera: A partir de un placebo de Tri-Clor Crema y adicionando cantidades fijas de Clotrimazol, se prepararon 5 muestras que contenían 5 niveles de concentración de Clotrimazol (50%, 80%, 100%, 120% y 150% de la cantidad declarada de este principio activo en la Crema). Siguiendo el procedimiento descrito en: “4.4.1. *Método de Ensayo*”, página 38, se realizaron 3 determinaciones de Clotrimazol para cada nivel de concentración (15 determinaciones desde la pesada). Para realizar la calibración del equipo se utilizó una curva de 5 niveles de concentración del estándar de Clotrimazol. Se graficaron los valores esperados (*eje x*) versus valores obtenidos (*eje y*).

Se determinaron la pendiente ( $b_1$ ) y el intercepto ( $b_0$ ), para realizar estas determinaciones se procedió como se indica más adelante en: “4.4.2.4.5. *Evaluación de la Linealidad*”, página 47. Se comprobó que el intercepto no difiriera de cero y la pendiente de uno mediante la comparación del valor de t crítico con el t tabulado ( $t_{\alpha,0.05, n-2} = 3.182$ ). Los valores de t crítico se calcularon de la siguiente manera:

---


$$\text{Para el intercepto: } t_c = \frac{b_o - 0}{S_{b_o}}$$

$$\text{Para la pendiente: } t_c = \frac{b_i - 1}{S_{b_i}}$$

Los errores de la pendiente y del intercepto se calcularon como se indica en el acápite “4.4.2.4.5. Evaluación de la Linealidad”, página 47.

**c. Comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal** <sup>[53]</sup>.

La curva de muestras adicionadas obtenida en el acápite anterior “b. errores sistemáticos” se comparó con la obtenida con el estándar de Clotrimazol puro (5 niveles de concentración). Se determinó si las variancias eran homogéneas mediante una prueba F y mediante una prueba t se compararon si las pendientes eran iguales.

El valor de  $F$  crítico se calculó de la siguiente manera:

$$F_c = \frac{AP S_{x/y}^2}{CCN S_{x/y}^2}; \text{ Los valores de } S_{x/y}^2 \text{ se calcularon como se indica en “d.2. Error residual”, página 48.}$$

Este valor se comparó con el valor de  $F$  tabulado:  $F_{(0,975, \text{gl numerador: } n1-1, \text{gl denominador: } n2-1)} = 9.605$ .

Y el valor de  $t$  crítico se calculó como se describe a continuación:

$$t_c = \frac{|b_i^{CAP} - b_i^{CCN}|}{\sqrt{AP S_{b_i}^2 - CCN S_{b_i}^2}}$$

Este valor se comparó con el valor de  $t$  tabulado,  $t_{(0,95, n1+n2-2)} = 2.306$ .

**d. Estimación del recobrado** <sup>[54]</sup>.

Para la determinación del recobrado se utilizó la ecuación siguiente:

$$Rc = \frac{b_{ICPA}}{b_{ICCN}} \times 100$$

**4.4.2.4.3. Evaluación de la Precisión.** <sup>[5, 8, 32]</sup>

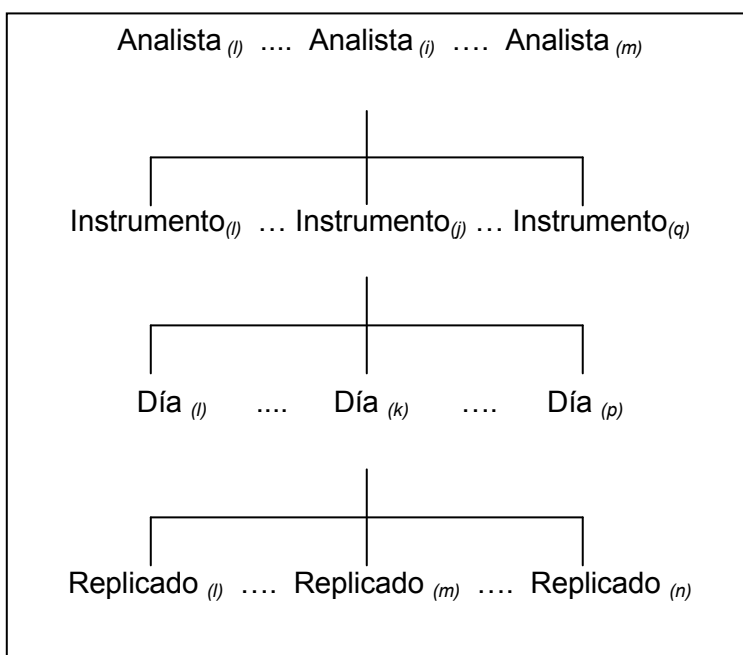
---

### a. Diseño anidado completo.

Para la determinación de la precisión intermedia, se utilizó el diseño anidado, propuesto por Maroto, A. <sup>[32]</sup> en el cual se analizó una muestra homogénea, utilizando el procedimiento analítico, un número  $n$  de veces y variando entre cada ensayo todos aquellos factores que se pensaba, afectaban a los resultados. El tipo de diseño anidado utilizado fue el completo, “*fully-nested designs*”.

Los factores que se variaron para obtener la precisión intermedia de series diferentes fueron: analistas, instrumentos, días y replicados. La *Figura 1.* muestra como se ordenaron estos factores en el diseño anidado.

Figura 1. Factores del diseño anidado.



Siguiendo el diseño de la *Figura 1.*, se analizó una muestra homogénea y estable de Tri-Clor Crema por 2 analistas  $(m)$ . A su vez, cada analista analizó dicha muestra en 2 instrumentos  $(q)$  diferentes. En cada uno de esos instrumentos se analizó la muestra en 2 días  $(p)$  diferentes y cada uno de esos días, se hicieron 3 replicados de la muestra. Para evitar infraestimar el efecto del día sobre la variabilidad de los resultados, las medidas obtenidas con los diferentes instrumentos se realizaron en diferentes días, es decir no se analizaron las muestras en un mismo día con dos instrumentos.

El análisis de Clotrimazol en la muestra de Tri-Clor Crema se realizó como se describe en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38, y como se representa en la siguiente tabla.

Tabla 11. Representación del diseño anidado.

<b><u>Analista 1</u></b>				<b><u>Analista 2</u></b>			
<b><i>Instrumento 1</i></b>		<b><i>Instrumento 2</i></b>		<b><i>Instrumento 1</i></b>		<b><i>Instrumento 2</i></b>	
<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>
Replica 1	Replica 1	Replica 1	Replica 1	Replica 1	Replica 1	Replica 1	Replica 1
Replica 2	Replica 2	Replica 2	Replica 2	Replica 2	Replica 2	Replica 2	Replica 2
Replica 3	Replica 3	Replica 3	Replica 3	Replica 3	Replica 3	Replica 3	Replica 3

**b. Análisis de varianza para la precisión.**

Una vez obtenidos los resultados de la aplicación del diseño anidado se procedió a realizar un análisis de varianza para determinar cómo afectan los diferentes factores la variabilidad del método. La manera que se procedió para realizar los cálculos de la varianza de los diferentes factores se muestra en la *Figura 2*.

Figura 2. ANOVA para un experimento anidado completo de cuatro factores.

Fuente	Cuadrados medios	g.l.	Cuadrados medios esperados
Analista	$MS_A = \frac{q \cdot p \cdot n \cdot \sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{m-1}$	$m-1$	$q \cdot p \cdot n \cdot \sigma_A^2 + p \cdot n \cdot \sigma_m^2 + n \cdot \sigma_D^2 + \sigma_r^2$
Instrumento	$MS_{In} = \frac{p \cdot n \cdot \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{m \cdot (q-1)}$	$m \cdot (q-1)$	$p \cdot n \cdot \sigma_m^2 + n \cdot \sigma_D^2 + \sigma_r^2$
Día	$MS_D = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^p (\bar{x}_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2}{m \cdot q \cdot (p-1)}$	$m \cdot q \cdot (p-1)$	$n \cdot \sigma_D^2 + \sigma_r^2$
Replicado	$MS_E = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^n (x_{ijkl} - \bar{x}_{ijk})^2}{m \cdot q \cdot p \cdot (n-1)}$	$m \cdot q \cdot p \cdot (n-1)$	$\sigma_r^2$

---

#### **4.4.2.4.4. Evaluación de la Especificidad.**

La ICH <sup>[6]</sup> recomienda realizar la evaluación del fármaco o producto farmacéutico en la presencia de impurezas y excipientes.

##### **a. Interferencia de excipientes.**

Para evaluar si los excipientes interferían en la determinación del Clotrimazol, se preparó un placebo del producto Tri-Clor Crema y se analizó según la metodología propuesta en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38.

Se evaluó la presencia o ausencia de señal en la zona correspondiente el tiempo de retención del Clotrimazol. Como criterio de una buena especificidad se utilizó que de existir una señal en la zona correspondiente al pico de Clotrimazol, esta debía ser inferior al 1.0 % de la señal de una muestra de Tri-Clor Crema preparada a una concentración igual al 100 % de la cantidad declarada de Clotrimazol (10 mg / mL).

##### **b. Capacidad del método de discernir entre el Clotrimazol y sus productos de degradación.**

Los principales productos de degradación del Clotrimazol son los producidos por la hidrólisis ácida de esta molécula <sup>[46]</sup>. Los productos formados por esta hidrólisis son el Imidazol y el Compuesto Relacionado A de Clotrimazol <sup>[46]</sup>. En el Laboratorio no se contaba con los mismos por lo que se realizó una degradación artificial de la molécula de Clotrimazol. Para estos fines se utilizó el procedimiento que se describe a continuación.

La degradación artificial de la materia prima constó de lo siguiente:

##### **b.1. Hidrólisis ácida:**

En “*beaker*” de 100 mL se pesaron 50 mg de Clotrimazol y se disolvieron en 40 mL de HCl 0.1 N utilizando un baño ultrasónico Cole-Parmer <sup>[40]</sup>. Se trasvasó el contenido del “*beaker*” a matraz aforado de 50 mL y se enrasó con HCl 0.1 N. Posteriormente a esta solución se le realizó calentamiento con reflujo durante 20 minutos (temperatura a 100 °C). Se formó un precipitado de color amarillo, el cual se separó de la solución de HCl 0.1 N utilizando filtración al vacío (filtro de 0.45 micras). El precipitado se disolvió en 50 mL de metanol, luego se tomó una alícuota de 1,0 mL de esta solución se trasvaso a matraz volumétrico de 20 mL y se enrasó con fase móvil. Al filtrado también se le realizó una dilución de 1 mL en 10 mL de fase móvil. Tanto el precipitado como el filtrado se analizaron utilizando el método descrito en los acápites correspondientes de “4.4. Procedimiento”, página 38.



**b.2. Hidrólisis básica:** se procedió como se indica en hidrólisis ácida pero en lugar de utilizar 0.1 N de HCl, se utilizó 0.1 N de Hidróxido de sodio.

#### 4.4.2.4.5. Evaluación de la Linealidad.

La evaluación de la linealidad se realizó utilizando el procedimiento de la ICH<sup>[6]</sup> donde recomienda al menos 5 niveles de concentración.

##### a. Muestras obtenidas por adición de estándar a un placebo de Tri-Clor Crema.

A partir de un placebo de la crema Tri-Clor, preparado internamente, se prepararon 5 niveles de concentración de Clotrimazol por adición del mismo al placebo (50, 80, 100, 120 y 150 % de la cantidad declarada de Clotrimazol). Cada nivel de concentración se le realizó un análisis (por triplicado) de Clotrimazol utilizando el procedimiento descrito en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38. El 100 % de la cantidad declarada de Clotrimazol es de 10 mg por g de crema. Como las muestras se prepararon a nivel de laboratorio las concentraciones reales fueron (50.322, 80.550, 100.320, 120.598, 150.301).

##### b. Curva de calibrado.

Se representó la curva de calibrado utilizando el programa de computadora *Microsoft Excel 2003*<sup>[55]</sup>, para comprobar a simple vista si las variables estaban correlacionadas linealmente.

##### c. Ensayo estadístico de Bartlett.

Para determinar si la magnitud de los errores en los valores de y son independientes de la concentración de analito se realizó el test de Bartlett de homogeneidad de varianzas. Se calculó el parámetro M utilizando las siguientes expresiones:

$$M = \frac{1}{C} \left[ \left( \sum_{i=1}^k v_i \right) \ln S^2 - \sum_{i=1}^k v_i \ln S_i^2 \right] \quad S^2 = \frac{\sum v_i S_i^2}{\sum v_i} \quad C = 1 + \frac{\sum \left( \frac{1}{v_i} \right) - \left( \frac{1}{\sum v_i} \right)}{3(k-1)}$$

Como criterio se utilizó que si  $M < \chi^2$  las varianzas son homogéneas. Para la determinación del valor crítico de  $\chi^2$  se utilizó n-1 grados de libertad = 9.488.

##### d. Regresión lineal simple no ponderada.

###### d.1. Recta de regresión y sobre x. Coeficiente de correlación.<sup>[56]</sup>

Aquí se determinó la recta de regresión de y sobre x utilizando las siguientes expresiones:

$$\text{Pendiente}(b_i) = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad \text{Intercepto}(b_o) = \bar{y} - b_i \bar{x}$$

En donde:

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \quad S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Así mismo, para determinar el coeficiente de correlación lineal  $r$  se utilizó la siguiente expresión:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}}$$

En donde:

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

Para comprobar la significación de la regresión se tomo como parámetro que el coeficiente de correlación deberá ser  $\geq 0.990$ .

#### **d.2. Error residual, error del intercepto y de la pendiente** <sup>[56, 57]</sup>

Aquí se determinaron los errores para la pendiente, el intercepto y la residual utilizando las siguientes expresiones:

$$\text{Error de los residuos } (S_{x/y}) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad \text{En donde } \hat{y} = b_i(x_i) + b_o$$

$$\text{Error de la pendiente } (S_{b_i}) = \frac{S_{x/y}}{\sqrt{S_{xx}}} \quad \text{Error del intercepto } (S_{b_o}) = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n S_{xx}}}$$

#### **d.3. Determinación del intervalo de confianza de la curva de regresión.** <sup>[56]</sup>

Para la determinación del intervalo de confianza se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{Intervalo de confianza} = \hat{y} \pm t_{\alpha/2} S_{x/y} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

---


$$\text{En donde : } S_{x/y} = \sqrt{\frac{SSE}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n-2}}$$

Para la determinación del valor de  $t$  en el intervalo de confianza de la curva de regresión se utilizó  $n-2$  grados de libertad con un nivel de confianza de 95.0 %.

**d.4. Determinación de los intervalos de confianza para la pendiente y para el intercepto.** <sup>[56]</sup>

Para la determinación de los intervalos de confianza se utilizaron las siguientes expresiones:

$$\text{Intervalo de confianza para la pendiente } (b_i) = b_i \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{b_i}$$

$$\text{Intervalo de confianza para el intercepto } (b_o) = b_o \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{b_o}$$

En donde:

$$S_{b_i} = \frac{S_{x/y}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad S_{b_o} = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

En el intervalo de confianza para la pendiente no debe estar incluido el valor cero (0) y en el intervalo de confianza del intercepto debe estar incluido el valor cero (0).

Para la determinación del valor de  $t$  en el intervalo de confianza para la pendiente y el intercepto se utilizó  $n-2$  grados de libertad con un nivel de confianza de 0.95. El valor de  $t$  para estas condiciones es de 3.128.

**d.5. Cálculo del error aleatorio asociado a la determinación de una concentración.** <sup>[56]</sup>

Se preparó una muestra de Tri-Clor Crema (por duplicado) utilizando el método para la cuantificación de Clotrimazol descrito en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38. A partir de las áreas obtenidas (valores de  $y$ ) y utilizando la recta de regresión obtenida en “d.1. Recta de regresión y sobre  $x$ . Coeficiente de correlación”, se calculó la concentración de Clotrimazol en la Crema.

Para el cálculo del error aleatorio asociado a la determinación de la concentración de Clotrimazol en la Crema, se utilizó la siguiente expresión:

$$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (X_i - \bar{X})^2}}$$

En esta ecuación,  $y_0$  es el valor experimental de  $y$  a partir del cual se determina el valor de la concentración  $x_0$ ,  $S_{x_0}$  es la desviación estimada de  $x_0$ , los otros símbolos tienen su significado habitual. En este caso se realizaron dos lecturas para obtener el valor de  $y_0$ , por lo que el valor de  $m$  fue igual a 2 y como fueron 5 niveles de concentración, el valor de  $n$  fue 5.

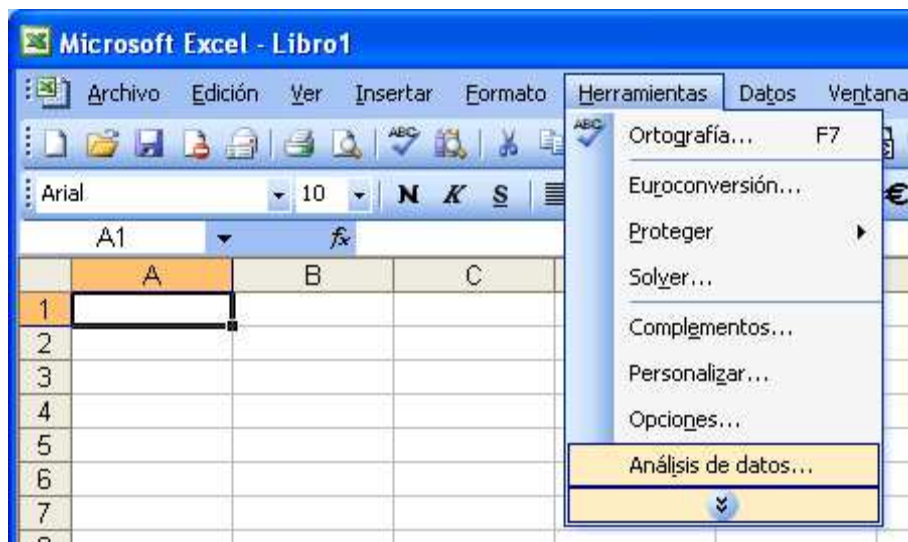
#### **d.6. Gráfico de residuales.**

Para examinar la falta de ajuste del modelo, se graficaron los valores de los residuales ( $y_i - \hat{y}$ ) versus los valores predichos de  $y_i$  por el modelo de regresión lineal. Se comprobó la tendencia de los residuales.

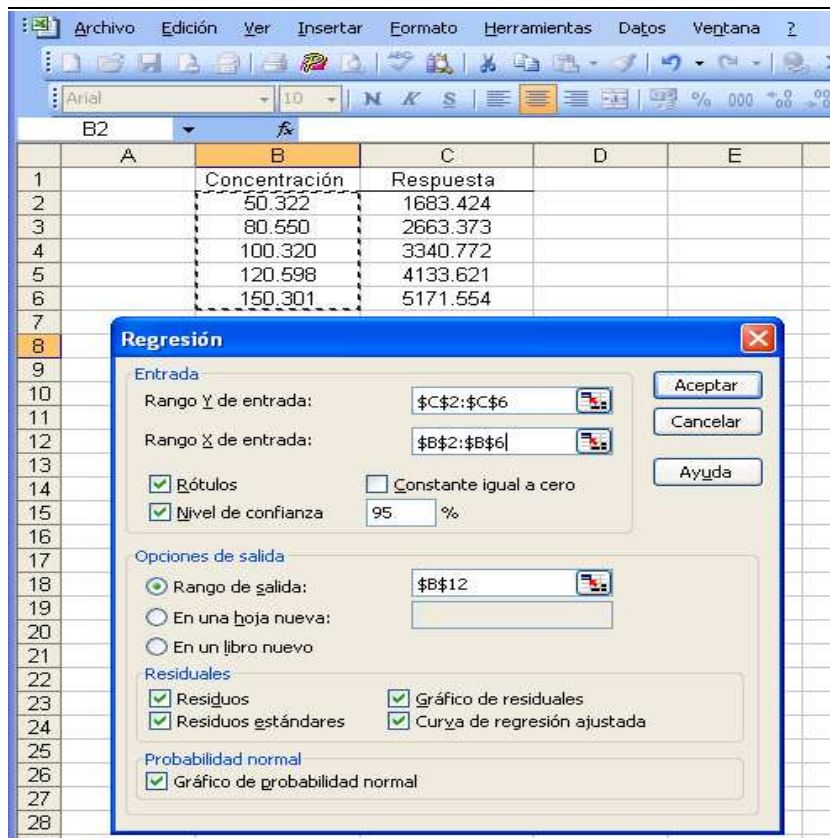
#### **d.7. Comprobación del ajuste a un modelo lineal.**

Para la comprobación del ajuste de los datos al modelo lineal se utilizó el programa *Microsoft Excel 2003* <sup>[55]</sup>.

Se localizó el “Análisis de datos” dentro de “Herramientas” en la barra de Herramientas de Microsoft Excel. Anteriormente se tuvo que activar esta función, la forma en que se procedió se describe en la ayuda de Microsoft Office.



Dentro de la Herramienta “Análisis de Datos” se escogió la función “Regresión”.



Criterio de aceptación: el valor de F calculado en la regresión debe ser mucho mayor que el F tabulado = 18.51 (grados de libertad numerador, 1; grados de libertad denominador, 2).

#### **d.8. Evaluación de la falta de ajuste en la Regresión Lineal.** <sup>[57]</sup>

Cuando se tiene más de una observación por nivel de la variable independiente, se puede realizar un ensayo para la falta de ajuste del modelo ajustado, dividiendo la suma de cuadrados del error residual ( $SSE$ ) en dos fragmentos:

d.8.1. error experimental puro ( $SSP_{exp}$ ) y

d.8.2. falta de ajuste ( $SS_{Falta}$ )

Es decir, que matemáticamente la falta de ajuste ( $SSE$ ) se representó de la siguiente forma:

$$SSE = SSP_{exp} + SS_{Falta}$$

Para la comprobación si el modelo de regresión lineal es apropiado, se procedió de la siguiente manera:

Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se planteó que el modelo de regresión lineal es apropiado y como hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que el modelo de regresión lineal no es apropiado.

Se determinaron los cuadrados medios utilizando las siguientes expresiones:

$$MS_{\text{exp}} = \frac{SSP_{\text{exp}}}{\sum (n_i - 1)} = \frac{\sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{\sum_i (n_i - 1)}$$

$$MS_{\text{Falta}} = \frac{SSE - SSP_{\text{exp}}}{n - 2 - \sum (n_i - 1)}$$

Se calculó el valor de F:

$$F = \frac{MS_{\text{Falta}}}{MS_{\text{exp}}}$$

Como criterio de aceptación de la hipótesis nula, se utilizó que el valor de F calculado debe ser menor que el valor de F tabulado, con grados de libertad del numerador:  $n - 2 - \sum (n_i - 1) = 3$ , grados de libertad del denominador:  $\sum (n_i - 1) = 10$  y un valor de  $\alpha$  de 0.05. El valor de F tabulado fue de 3.71.

#### **4.4.2.4.6. Evaluación del Rango.**

Para la evaluación del rango, se tomó los resultados de la linealidad, precisión y exactitud.

#### **4.4.2.4.7. Evaluación del Límite de Detección y de Cuantificación.**

##### **a. Evaluación de parámetros.**

Los ensayos para los parámetros límite de detección y de cuantificación se realizaron en el equipo cromatográfico Agilent 1100 Series. Para la determinación del límite de detección se utilizó el método basado en la relación señal – ruido, propuesto por la ICH y para el cálculo se utilizaron las fórmulas propuestas por la IUPAC [58]. La determinación de la relación señal – ruido se llevó a cabo por comparación de la señal de muestras de analito de concentraciones bajas con muestras blanco y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito es consistentemente detectado. Para esto, se procedió a analizar una muestra Placebo de Tri-Clor Crema (10 veces), utilizando el método para la cuantificación de Clotrimazol descrito en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38. A cada corrida del placebo se le determinó el ruido, auxiliándose con el manual del Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 1100 Series, por el método del ASTM [55]. Se calculó el promedio ( $y_b$ ) y la desviación estándar ( $S_{y_b}$ ) de estos ruidos, el resultado promedio se expresó en mAU. Posteriormente se prepararon 10 muestras del analito Clotrimazol a una concentración de 0.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , se les realizaron corridas cromatográficas utilizando el mismo procedimiento para la cuantificación de Clotrimazol. Para cada corrida se tomó el dato de la altura

(correspondiente al pico de Clotrimazol) y se calculó el valor promedio ( $y_D$ ) y la desviación estándar de estas alturas ( $S_{Y_D}$ ). Se calculó el valor de  $y_A$  utilizando la siguiente expresión:

$$y_A = y_D - \bar{y}_b$$

Los límites de detección y cuantificación se calcularon usando las siguientes expresiones:

$$\text{Límite de detección (LD)} = \frac{3.29 S_{y_b}}{y_A} C_A$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = \frac{10 S_{y_b}}{y_A} C_A$$

### **b. Comprobación de parámetros.**

Se prepararon muestras a las concentraciones encontradas del límite de detección y cuantificación para comprobar los valores.

#### **b.1. Comprobación del Límite de Detección.**

Se prepararon dos muestras de Tri-Clor Crema a concentraciones de Clotrimazol de 0.050  $\mu\text{g} / \text{mL}$  y 0.100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Se comprobó que a estas concentraciones pudiera detectarse la molécula de Clotrimazol.

#### **b.2. Comprobación del Límite de Cuantificación.**

Se preparó una muestra de Tri-Clor Crema a una concentración de Clotrimazol de 0.150  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (concentración cercana al límite de cuantificación calculado). Se cuantificó la concentración de Clotrimazol utilizando el procedimiento descrito en el acápite "4.4.1. Método de Ensayo", página 38, con la diferencia que el estándar de Clotrimazol se preparó a una concentración de 0.150  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

#### **4.4.2.4.8. Evaluación de la Robustez.** <sup>[60]</sup>

Para la determinación de la robustez, se utilizó el diseño factorial de Youden-Steiner <sup>[60]</sup>, el cual es una de las metodologías utilizadas para estudiar la robustez.

El método de Youden-Steiner <sup>[60]</sup> permite estudiar la influencia o efecto resultante de la modificación de 7 factores descritos en el método mediante 8 experimentos. Las variables seleccionadas se indican con letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F). Los valores alternativos o modificados están indicados por letras minúsculas (a, b, c, d, e, f). En los ocho experimentos a

realizar tiene que haber 4 parámetros en mayúsculas (valores nominales) y 4 en minúsculas (valores alternativos) no tratándose de evaluar un intervalo simétrico de variabilidad sino un valor concreto.

Tabla 12. Matriz resultante para el diseño factorial de Younden-Steiner <sup>[60]</sup>

<b>Factor</b>	<b>Ensayo</b>							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>A/a</b>	A	A	A	A	a	a	a	a
<b>B/b</b>	B	B	b	b	B	B	b	b
<b>C/c</b>	C	c	C	c	C	c	C	c
<b>D/d</b>	D	D	d	d	d	d	D	D
<b>E/e</b>	E	e	E	e	e	E	e	E
<b>F/f</b>	F	f	f	F	F	f	f	F
<b>G/g</b>	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Resultado</b>	s	t	u	v	w	x	y	z

Para cada factor se calcula el efecto que supone utilizar el valor indicado en el método ( $V_D$ ) y el alternativo ( $V_d$ ). Dicho efecto se calcula como la media de los resultados obtenidos en los experimentos en los que ha utilizado. Por ejemplo, el efecto de cambiar el valor “D” por “d” se calcula:

$$V_D - V_d = \frac{(s + t + y + z)}{4} - \frac{(u + v + w + x)}{4}$$

Las diferencias más elevadas indicarán que los factores correspondientes tienen mayor influencia que el resto sobre la precisión del método. Estadísticamente una forma de decidir si la influencia de un factor es relevante consiste en comparar el valor del efecto con la expresión  $s\sqrt{2}$ , donde  $s$  es la desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad del método. Las diferencias superiores en valor absoluto al resultado de esta expresión se consideran significativas.

El sistema de Youden-Steiner <sup>[60]</sup> puede aplicarse cuando el número de factores es inferior a siete. En este caso a los factores que quedarán sin variables se les debe asignar una operación sin influencia analítica. Lógicamente, la diferencia para estas variables debe ser irrelevante.



Para la evaluación de la robustez del método, se realizó una clasificación de las variables que en su momento se pensó que pudieron afectar en los resultados de la determinación de Clotrimazol en Tri-Clor Crema, a las variables seleccionadas se le asignó las letras mayúsculas y las variables modificadas las letras minúsculas. Así mismo, a las variables libres se le asignó la expresión “sin sentido”. Posteriormente se procedieron a realizar las ocho muestras con las variables asignadas utilizando el método para la cuantificación de Clotrimazol descrito en el acápite “4.4.1. Método de Ensayo”, página 38 y como lo ejemplifica la Tabla 12. Matriz resultante para el diseño factorial de Younden-Steiner <sup>[60]</sup>.

Una vez obtenido los resultados de los ocho análisis se tabulan los mismos como lo muestra la Tabla 12. Matriz resultante para el diseño factorial de Younden-Steiner <sup>[60]</sup>. Posteriormente se procedió a calcular para cada variable las diferencias de medias para cada parámetro de forma individual, como lo muestra la tabla siguiente.

Tabla 13. Cálculo de la diferencia de respuestas para cada variable.

<b>Parámetros</b>	<b>Diferencia</b>
A-a	$V_A = 1/4 (s+t+u+v) - 1/4 (w+x+y+z)$
B-b	$V_B = 1/4 (s+t+w+x) - 1/4 (u+v+y+z)$
C-c	$V_C = 1/4 (s+u+w+y) - 1/4 (t+v+x+z)$
D-d	$V_D = 1/4 (s+t+y+z) - 1/4 (u+v+w+x)$
E-e	$V_E = 1/4 (s+u+x+z) - 1/4 (t+v+w+y)$
F-f	$V_F = 1/4 (s+v+w+z) - 1/4 (t+u+x+y)$
G-g	$V_G = 1/4 (s+v+x+y) - 1/4 (t+u+w+z)$

Como criterio de aceptación para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado o no, se comparó la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de  $s$  (desviación estándar del estudio de repetibilidad del método) y raíz de 2. Por ejemplo, Si  $[V_B] > S \sqrt{2}$  existe diferencia significativa. El valor crítico de aceptación es de  $0.902 \times \sqrt{2} = 1.276$ .

#### **4.4.2.4.9. Evaluación de la Incertidumbre.** <sup>[61, 62, 63]</sup>

La determinación de la Incertidumbre del método para la cuantificación de Clotrimazol en Tri-Clor Crema se realizó de acuerdo a los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2005 <sup>[63]</sup>, numeral 5.4.6., siguiendo las directrices generales de la guía GUM ISO <sup>[64]</sup>, como se describe en el acápite “3.3.2.

*Aproximación ISO*”, página 31, utilizando como herramienta de cálculo el programa de cálculo simbólico MAPLE [65].

#### **a. Evaluación del mensurando.**

El mensurando en este trabajo se definió como el contenido de Clotrimazol en unidades de mg / g determinada por cromatografía HPLC en la porción tomada de crema.

#### **b. Identificación de los componentes de la incertidumbre.**

La identificación de los componentes de las incertidumbres para cada variable se mostraron en un diagrama de causa – efecto. Se identificaron 10 variables del modelo matemático que influyen en la incertidumbre asociada a la cuantificación de Clotrimazol en la Crema.

#### **c. Cuantificación de los componentes de la incertidumbre.**

Se realizaron los cálculos de las incertidumbres de las variables del modelo.

c.1. Incertidumbre asociada al volumen de dilución No. 1 del estándar ( $V_{DSTD1}$ ), de dilución de la muestra ( $V_{DMTA}$ ), de dilución No. 2 del estándar ( $V_{DSTD2}$ ) y de la alícuota ( $V_{ASTD1}$ ):

La incertidumbre en la medición de volumen a partir de volúmenes calibrados, se calculó tomando en cuenta tres componentes: la incertidumbre del fabricante ( $U_f^2$ ), la desviación estándar de calibración ( $U_r$ ) y la incertidumbre debido al efecto que tiene la variación de la temperatura ambiental sobre la expansión de los líquidos ( $U_{\Delta t}^2$ ). La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$\sqrt{(u_f^2 + u_r^2 + u_{\Delta t}^2)} = \sqrt{\frac{a^2}{6} + \frac{S_r^2}{n} + \frac{(V\alpha\Delta t)^2}{3}}$$

En donde  $\alpha$  es el coeficiente de expansión para la mezcla de solventes de la fase móvil.

c.2. Incertidumbre asociada al peso del estándar ( $Peso_{STD}$ ) y peso de la muestra ( $W$ ):

La incertidumbre en el peso se calculó a partir de los datos del certificado de calibración de la balanza utilizada en el ensayo. Los componentes involucrados fueron: la incertidumbre debido a la resolución de la balanza ( $u_d$ ), incertidumbre debido a la repetibilidad de las mediciones ( $u_r$ ) y la incertidumbre de la linealidad de la calibración ( $u_L$ ) (Como las pesadas fueron realizadas por diferencia, ajustando el cero del recipiente de pesada, la incertidumbre de la linealidad se multiplicó por 2). Las ecuaciones utilizadas fueron:

$$\sqrt{(u_d^2 + u_r^2 + 2u_L^2)} = \sqrt{\left(\frac{d/2}{3}\right)^2 + u_r^2 + 2\left(\frac{L}{3}\right)^2}$$

c.3. Incertidumbre asociada al área del pico cromatográfico de la muestra ( $A_{MTA}$ ) y del estándar ( $A_{STD}$ ):

Para calcular la incertidumbre de las mediciones en las áreas de pico es necesario tener en cuenta tres componentes de la precisión intermedia: las lecturas del área de pico cromatográfico, las del ruido y las de la deriva. El cálculo de la incertidumbre se realizó utilizando la ecuación:

$$U_{xi} = \sqrt{\frac{u_{rep}^2}{n_{rep}} + \frac{u_d^2}{n_d} + \frac{u_r^2}{n_r}}$$

En donde:

$U_{xi}$  es igual a la incertidumbre del área del pico de Clotrimazol de la muestra de Tri-Clor Crema ( $U_{AMTA}$ ) o del área del pico de l estándar de Clotrimazol ( $U_{ASTD}$ )

$u_{rep}^2$  es la desviación estándar de las áreas de los picos de la muestra de Tri-Clor Crema y del estándar de Clotrimazol, leídas en condiciones de repetición intermedia,  $n_{rep} = 3$  mediciones realizadas durante 8 días, por dos analistas.

$u_d^2$  es la desviación estándar de la deriva calculada en una lectura diaria ( $n_d$ ) durante 8 días, por dos analistas.

$u_r^2$  es la desviación estándar del ruido tomando la señal del ruido de pico a pico usando la técnica de ASTM a intervalos cortos de tiempo, calculada en una lectura diaria ( $n_r$ ) durante 8 días, por dos analistas.

c.4. Incertidumbre asociada a la pureza del estándar ( $P_{STD}$ )

El estándar USP con No. K0C282 <sup>[66]</sup> reporta una concentración de 100% sin ninguna incertidumbre asociada. Se asumirá una pureza de  $99.99 \pm 0.01$  %. La incertidumbre estándar de la concentración de la solución de referencia se obtiene dividiendo 0.01 entre la raíz cuadrada de tres.

c.5. Incertidumbre asociada al recobrado ( $R$ ) <sup>[67]</sup>

La incertidumbre en el porcentaje del recobrado ( $u_R$ ) se cálculo a partir de los resultados de la comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal utilizando la siguiente expresión:

$$U_R = R \sqrt{\left( \frac{S_{biCAP}^2}{n_{CAP} b_{CAP}^2} \right) + \left( \frac{S_{biCCN}^2}{n_{CCN} b_{CCN}^2} \right)}$$

#### d. Balance o presupuesto de la incertidumbre.

Para completar la tabla que muestra el presupuesto de las incertidumbres y el índice de contribución de cada variable a la incertidumbre combinada es necesario calcular los coeficientes de sensibilidad.

Estos coeficientes se calculan a partir de la derivada parcial de la función del modelo  $f$  con respecto a cada una de las variables  $x_i$  representadas en la ecuación del modelo matemático. Para el cálculo de estos coeficientes se utilizó el programa de cálculo simbólico MAPLE [65].

$$c_{xi} = \frac{\partial f}{\partial x_i}$$

#### e. Cálculo de la incertidumbre.

Para calcular la incertidumbre en la determinación de Clotrimazol en la muestra de Tri-Clor Crema se aplica la ley de propagación de la incertidumbre. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$u_f = \sqrt{\sum (c_{xi} \times u_{xi})^2}$$

#### f. Índice de contribución de los componentes y diagrama de Pareto.

La contribución de cada variable a la incertidumbre asociada a la determinación del contenido de Clotrimazol en la muestra de Tri-Clor Crema se evalúa con el índice de contribución expresado en porcentaje según se expresa en la ecuación siguiente:

$$Ind \% = \frac{|c_{xi} u_{xi}|}{\sum |c_{xi} u_{xi}|} \times 100$$

Los resultados del cálculo realizado se presentan en forma de tabla. En esta tabla se presentan también los resultados de los índices acumulativos. A partir de estos datos se construye el diagrama de Pareto, en el cual se puede apreciar con mayor claridad las variables que contribuyen significativamente en la incertidumbre.

---

**g. Estimación del intervalo de confianza.**

El intervalo de confianza del contenido de Clotrimazol en la muestra de Tri-Clor Crema del presente trabajo, considerado un factor de cobertura  $k = 2$ , probabilidad del 95,45 %, se calcula de la siguiente manera:

$$Y = y \pm U$$

En donde U es la incertidumbre expandida. ( $U = 2 \times u_y$ ).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el “Capítulo III. Investigación Documental” se hizo referencia a varias de las metodologías existentes para realizar la validación de los métodos analíticos, así como la manera de evaluar de forma experimental cada uno de los parámetros de validación. Se pudo constatar las diferencias existentes entre las diferentes metodologías al momento de realizar la evaluación a estos parámetros.

Como se indico en la parte experimental, se estableció la metodología propuesta por la ICH <sup>[5]</sup> para la validación de los métodos analíticos de Laboratorios Andifar. Las normas de la ICH <sup>[5]</sup> armonizan las normas establecidas en la farmacopea de los Estados Unidos, Europa y Japón. El anexo 5 del Informe 32 de la OMS <sup>[3]</sup> es congruente con la normativa ICH <sup>[5]</sup> para la validación de los métodos analíticos.

### 5.1. Evaluación del Desempeño Instrumental.

Los cromatogramas característicos del análisis de Clotrimazol por HPLC en una muestra de Tri-Clor Crema, obtenidos en los equipos Agilent <sup>[36]</sup> y Perkin Elmer <sup>[37]</sup>, se muestran a continuación.

Figura 3. Cromatograma típico obtenido por el Cromatógrafo Perkin-Elmer.

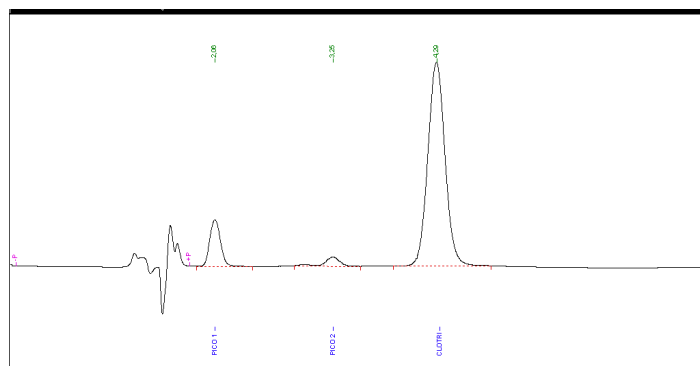
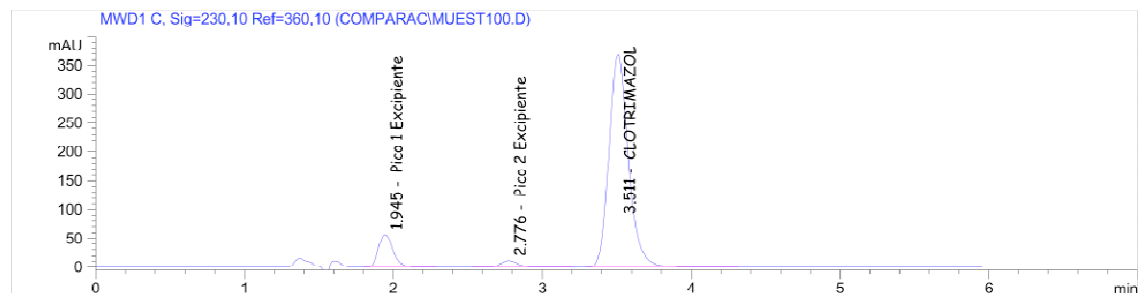


Figura 4. Cromatograma típico obtenido por el Cromatógrafo Agilent.



La tabla 14 muestra los parámetros cromatográficos obtenidos por ambos equipos para el pico de Clotrimazol y la precisión obtenida con ambos equipos.

Tabla 14. Datos de la evaluación de desempeño cromatográfico.

<b>Parámetro</b>	<b>Equipo Agilent<sup>[36]</sup></b>	<b>Equipo Perkin-Elmer<sup>[37]</sup></b>	<b>Valores de Referencia</b>
<b>Eficiencia, N</b>	3,584 (Tan)	2,895.50 (Tan)	> 2,000. Especificaciones Internas <sup>[46, 47, 48]</sup>
<b>Factor de simetría, T</b>	1.193 (USP Tailing)	1.05 (USP Tailing)	$0.8 \leq T \leq 1.5$ <sup>[52]</sup>
<b>Capacidad, K</b>	2.79	2.86	$2 < K < 10$ <sup>[52]</sup>
<b>Repetibilidad del Sistema, RSD</b>	0.85 %	0.63 %	2 % para muestras inyectadas consecutivamente
<b>Tiempo de retención, min.</b>	3.511 min.	4.29 min.	3.2 – 3.7 y 4.0 – 4.5
<b>Área</b>	3343.097 mAUxs	3,205,058.51 (uVxsec)	-

Se observa como todos los parámetros analizados cumplieron con las especificaciones establecidas, lo cual indicó que las columnas y los sistemas se encontraban aptos para realizar el proceso de validación de método.

## 5.2. Evaluación de la Exactitud.

Los resultados del estudio del parámetro exactitud se muestran a continuación.

### 5.2.1. Resultados de la Exactitud.

Tabla 15. Parámetros y Resultados del Recobrado.

<b>Porcentaje Teórico (%)</b>	<b>Concentración Estipulada (teórico)</b>	<b>Concentración Experimental</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<b>80%</b>	80.550	81.088	100.667
		80.128	99.476
		80.086	99.424
<b>100%</b>	100.320	100.060	99.741
		99.997	99.678
		99.073	98.757
<b>120%</b>	120.598	118.056	97.892
		118.202	98.013
		118.321	98.112

Tabla 16. Resultado de t de student para la exactitud.

<b><u>Promedio (%)</u></b>	99,085
<b><u>Varianza</u></b>	0,898
<b><u>Desviación Estándar</u></b>	0,947
<b><u>Coefficiente de Variación (%)</u></b>	0,956
<b><u>Valor de t experimental</u></b>	2,872
<b><u>Valor de t tabulado</u></b>	$t_{(P=0,05; n-1)} = 2,306$

En el “*Capítulo III de Investigación Documental*” se hizo referencia a las dos maneras de abordar el parámetro de la exactitud, por parte de las normativas de la ISO <sup>[6-11]</sup> y de la EURACHEM <sup>[12]</sup> incluyen dentro de la exactitud, los parámetros precisión y veracidad. Es decir, la precisión brinda una medida de la dispersión de los resultados y la veracidad es la expresión de cuan cerca se encuentra el resultado obtenido del valor verdadero. Por otra parte, las normas: Informe 32 de la OMS <sup>[1]</sup>, Guía Q2 (R1) <sup>[5]</sup> ICH y las normas de la USP <sup>[13]</sup>, no incluyen el parámetro de la precisión dentro de la exactitud, este parámetro lo analizan de manera independiente por lo que en estas normas, el término de la exactitud únicamente evalúa la presencia de errores sistemáticos y no evalúa los errores aleatorios asociados a la determinación. Debido a que estas normas son las que rigen a la industria farmacéutica, se optó por realizar el procedimiento recomendado por las Normas: Guía Q2 (R1) <sup>[5]</sup> de la ICH y las de la USP <sup>[13]</sup> y evaluar la precisión de manera independiente.

Nótese que el valor de recuperación promedio fue muy cercano al 100%, pero el valor de t experimental fue ligeramente superior al tabulado, esto indica que existieron diferencias entre el valor de recuperación obtenido y el 100%. La pequeña diferencia entre lo estipulado y lo obtenido en los experimentos también pudiera estar asociada a la falta de homogeneidad de la muestra, máxime cuando se trata de una crema que es un sistema heterogéneo. La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria <sup>[60]</sup> estipula que para productos farmacéuticos, el valor de recuperación promedio debe de encontrarse entre un 97 % y un 103 %.

### **Resultado del Cálculo del intervalo de confianza de la recuperación.**

El resultado del cálculo del intervalo de confianza del recobrado se muestra a continuación:

$$\text{Intervalo} = R \pm 2u_R \quad \text{Intervalo} = 1.00228 \pm 2(0.0108)$$

$$\text{Límite superior: } 102.388 \quad \text{Límite Inferior: } 98.048$$

Se observa que el intervalo incluye al resultado obtenido como el promedio de la recuperación, con esto se confirma que el recobrado es igual al 100 %.



### 5.2.2. Errores sistemáticos.

Tabla 17. Parámetros para el cálculo de los errores sistemáticos

Valores Esperados (%)	Valores Obtenidos 1 (%)	Valores Obtenidos 2 (%)	Valores Obtenidos 3 (%)	Valores Obtenidos Promedio (%)
50,322	51,456	50,320	52,435	51,404
80,550	78,245	78,332	79,436	78,671
100,320	101,233	100,476	98,346	100,018
120,598	119,342	121,345	122,318	121,002
150,301	148,230	149,632	151,346	149,736

Tabla 18. Resultados del cálculo del valor t calculado y valor t tabulado

Parámetro	Valor $t_c$	Valor $t_{\alpha,05, n-2}$
Pendiente ( $b_i$ )	0.387	3.182
Intercepto ( $b_o$ )	0.221	3.182

Los valores de  $S_{b_i}$  y  $S_{b_o}$  encontrados fueron 0.0165 y 1.7468, respectivamente.

#### Valor de $t_c$ para la pendiente

$$t_c = \frac{b_i - 1}{S_{b_i}} \quad t_c = \frac{0.9936 - 1}{0.0165} = 0.3878$$

#### Valor de $t_c$ para el intercepto

$$t_c = \frac{b_o - 0}{S_{b_o}} \quad t_c = \frac{0.3861 - 0}{1.7468} = 0.2210$$

Nótese que para la pendiente, el valor de  $t$  crítico fue inferior al valor de  $t$  tabulado, es decir que la pendiente fue estadísticamente igual a 1, indicando la ausencia de errores proporcionales. También el intercepto fue estadísticamente igual a cero, lo cual corrobora la ausencia de errores constantes.

### 5.2.3. Resultados de la comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal.

Los resultados de la comparación de la curva de calibración por adición de patrón con la de calibración normal se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Datos y Resultados de la comparación de la curva de calibración por adición patrón con la de calibración normal.

	<b>CALIBRACIÓN NORMAL</b>		<b>ADICIÓN DE PATRON</b>	
	<b>Concentración</b>	<b>Respuesta Promedio</b>	<b>Concentración</b>	<b>Respuesta Promedio</b>
	50.000	1,678.327	50.322	1,683.424
	80.000	2,713.077	80.550	2,663.373
	100.000	3,347.348	100.320	3,340.772
	120.000	4,133.621	120.598	4,133.621
	150.000	5,177.104	150.301	5,171.554
<b>Pendiente (bi)</b>	35.060		35.140	
<b>S<sub>bi</sub></b>	0.541		0.654	
<b>S<sup>2</sup><sub>XY</sub></b>	1,699.977		2,482.513	
<b>F<sub>c</sub></b>	9.605			
<b>t<sub>c</sub></b>	2.306			
<b>F<sub>calculado</sub></b>	1.460			
<b>t<sub>calculado</sub></b>	0.238			

Nótese que no existieron diferencias significativas entre las pendientes de las dos curvas y las varianzas de las mismas pues los valores de  $t$  y  $f$  calculados fueron inferiores a los tabulados. Esto corrobora que no existen errores sistemáticos.

#### Valor de $F$ calculado

$$F_c = \frac{AP S_{x/y}^2}{CCN S_{x/y}^2} \quad F_c = \frac{2,482.513}{1,699.977} \quad F_c = 1.460$$

#### Valor de $t$ calculado

$$t_c = \frac{|b_i^{CAP} - b_i^{CCN}|}{\sqrt{AP S_{bi}^2 - CCN S_{bi}^2}} \quad t_c = \frac{|35.060 - 35.140|}{\sqrt{0.654 - 0.541}} \quad t_c = 0.238$$

#### 5.2.4. Estimación del recobrado.

El recobrado obtenido fue el siguiente:

#### Valor del recobrado

$$Rc = \frac{b_{iCPA}}{b_{iCCN}} \times 100 \quad Rc = \frac{35.140}{35.060} \times 100 \quad Rc = 100.228$$

### 5.3. Evaluación de la Precisión.

La normativa ICH <sup>[5]</sup> explica en cuanto a la determinación de la precisión en condiciones de repetibilidad, donde recomienda realizar 6 determinaciones a una muestra homogénea y bajo las mismas condiciones (operario, instrumento día, etc.). En el caso de la precisión en condiciones intermedias no establece una pauta clara para realizar la determinación, aunque especifica que se debe realizar variaciones de diferentes factores (operario, instrumento día, soluciones, etc.) a la hora de realizar las determinaciones a una misma muestra.

Tabla 20. Respuestas obtenidas del estudio de la precisión.

<b><i>Analista 1</i></b>				<b><i>Analista 2</i></b>			
<b><i>Instrumento 1</i></b>		<b><i>Instrumento 2</i></b>		<b><i>Instrumento 1</i></b>		<b><i>Instrumento 2</i></b>	
<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>	<b><i>Día 1</i></b>	<b><i>Día 2</i></b>
102.126	101.557	100.904	99.614	99.595	99.149	101.274	101.410
100.953	101.096	100.770	99.060	99.248	99.397	101.952	101.846
101.168	101.332	102.011	99.266	100.420	99.515	101.083	102.007

#### 5.3.1. Resultados del análisis de varianza para la precisión.

Tabla 21. Parámetros para el cálculo del análisis de varianza para la precisión.

<b><i>Resultados de los promedios de los analistas / instrumentos / días</i></b>							
<b><i>Ana 1 Inst 1 Día 1</i></b>	<b><i>Ana 1 Inst 1 Día 2</i></b>	<b><i>Ana 1 Inst 2 Día 1</i></b>	<b><i>Ana 1 Inst 2 Día 2</i></b>	<b><i>Ana 2 Inst 1 Día 1</i></b>	<b><i>Ana 2 Inst 1 Día 2</i></b>	<b><i>Ana 2 Inst 2 Día 1</i></b>	<b><i>Ana 2 Inst 2 Día 2</i></b>
101.416	101.328	101.228	99.313	99.754	99.354	101.436	101.754
<b><i>Resultados de los promedios de los instrumentos / analistas</i></b>							
<b><i>Analista 1 Instrumento 1</i></b>		<b><i>Analista 1 Instrumento 2</i></b>		<b><i>Analista 2 Instrumento 1</i></b>		<b><i>Analista 2 Instrumento 2</i></b>	
101.372		100.271		99.554		101.595	
<b><i>Resultados de los promedios de analistas</i></b>							
<b><i>Analista 1</i></b>	<b><i>Analista 2</i></b>						
100.821	100.575						
<b><i>Resultado del promedio total</i></b>							
100.698							

Ana = Analista; Inst = Instrumento

Tabla 22. Resultado de los cuadrados medios.

<b><u>Cuadrado Medio del Replicado (<math>MS_E</math>)</u></b>	0.2108
<b><u>Cuadrado Medio del Día (<math>MS_D</math>)</u></b>	1.4761
<b><u>Cuadrado Medio del Instrumento (<math>MS_{I/A}</math>)</u></b>	8.0707
<b><u>Cuadrado Medio del Operario (<math>MS_A</math>)</u></b>	0.3656

Tabla 23. Resultado del análisis de varianza.

<b><u>Varianza</u></b>	<b><u>Valores</u></b>
<b><u>Repetibilidad, <math>S_r^2</math></u></b>	0.21084
<b><u>Entre días, <math>S_D^2</math></u></b>	0.42176
<b><u>Entre instrumentos, <math>S_{I_n}^2</math></u></b>	1.09910
<b><u>Entre analistas, <math>S_A^2</math></u></b>	0.64209
<b><u>Intermedia de días diferente, <math>S_{I(D)}^2</math></u></b>	0.63260
<b><u>Intermedia de días e instrumentos diferentes, <math>S_{I(D+M)}^2</math></u></b>	1.73170
<b><u>Intermedia de días, instrumentos y analistas diferentes, <math>S_{I(D+M+A)}^2</math></u></b>	<b>2.37380</b>

### Planteamiento como Tabla de Varianza.

Análisis de Varianza de Tres Factores.

<b><i>Fuente</i></b>	<b><i>Suma de Cuadrados</i></b>	<b><i>Grados de Libertad</i></b>	<b><i>Cuadrados Medios</i></b>	<b><i>Fc</i></b>	<b><i><math>F_{1-\alpha 2}</math> <math>\alpha = 0.05</math></i></b>
Analista	0.3653	1	0.3653	0.045	0.851
Instrumento	16.1388	2	8.0694	5.466	0.072
Días	5.9048	4	1.4762	7.001	0.002
Residual o Replicado	3.3735	16	0.2108	-	
Total	25.7824	23		-	

A partir de la tabla anterior se evaluó la precisión intermedia, que representa la reproducibilidad interna, es decir, todas las varianzas implicadas dentro del laboratorio. Se calcularon las varianzas de las diferentes fuentes de variación utilizando las fórmulas de la última columna de la *Figura 2. ANOVA para un experimento anidado completo de cuatro factores*, página 45.

### Valor de la varianza del replicado o residual ( $S_r^2$ )

$$MS_E = S_r^2 \quad 0.2108 = S_r^2$$

**Valor de la varianza de los días ( $S_D^2$ )**

$$MS_D = nS_D^2 + S_r^2 \quad S_D^2 = \frac{MS_D - S_r^2}{n} \quad S_D^2 = \frac{1.4761 - 0.2108}{3} \quad S_D^2 = 0.42176$$

**Valor de la varianza de instrumento ( $S_{In}^2$ )**

$$MS_{In} = pnS_{In}^2 + nS_D^2 + S_r^2 \quad S_{In}^2 = \frac{MS_{In} - S_r^2 - nS_D^2}{pn} \quad S_{In}^2 = 0.2108$$

**Valor de la varianza de analista ( $S_A^2$ )**

$$MS_A = qpnS_A^2 + pnS_{In}^2 + nS_D^2 + S_r^2 \quad S_A^2 = \frac{MS_A - S_r^2 - nS_D^2 - pnS_{In}^2}{qpn} \quad S_A^2 = -0.1979$$

Debido a que la cuadrática media del factor analista es menor que las otras, su varianza " $S_A^2$ " es menor que cero y se considera como cero.

**Determinación de la varianza de la reproducibilidad interna**

La varianza de la reproducibilidad interna se expresa de la siguiente manera:

$$S_{RI}^2 = S_A^2 + S_{In}^2 + S_D^2 + S_r^2 \quad S_{RI}^2 = 0.0 + 0.2108 + 0.4217 + 0.2108 \quad S_{RI}^2 = 0.8434$$

**Determinación de la reproducibilidad interna como RSD**

La reproducibilidad interna como RSD se expresa de la siguiente manera:

$$RSD_{RI} = \frac{\sqrt{S_{RI}^2}}{\bar{X}} \times 100 \quad RSD_{RI} = \frac{\sqrt{0.8433}}{100.698} \times 100 \quad RSD_{RI} = 0.9119\%$$

Para la técnica analítica de cromatografía líquida se consideran valores aceptables menores a un 5.0%. El valor de 0.9119 % se encuentra por debajo del valor esperado, indicando esto una buena precisión de reproducibilidad interna.

**5.4. Evaluación de la Especificidad.****5.4.1. Interferencias de excipientes.**

Los resultados del análisis del placebo se muestran en los Gráficos 1 y 2. Nótese que en ambos equipos se obtuvo una señal muy baja en la zona correspondiente al pico de Clotrimazol. Esta señal siempre fue inferior al 1.0 % de la señal de Clotrimazol que proporciona una muestra de Tri-Clor Crema preparada al 100.0 % de la cantidad declarada (10 mg / g). Por lo que se demuestra que los excipientes presentes en la crema no interfieren en la cuantificación de Clotrimazol.

Gráfico 1. Demostración gráfica del análisis de Placebo de Tri-Clor Crema para el estudio de la Especificidad en Equipo Cromatografico Perkin Elmer [37].

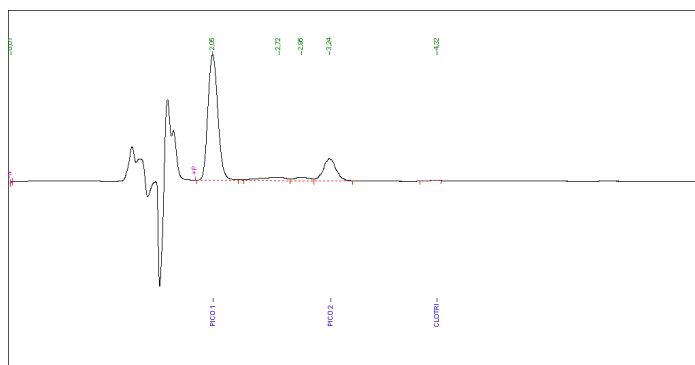
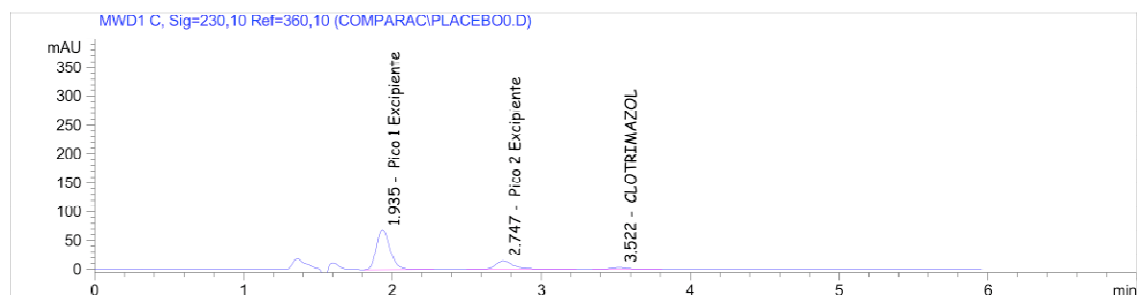


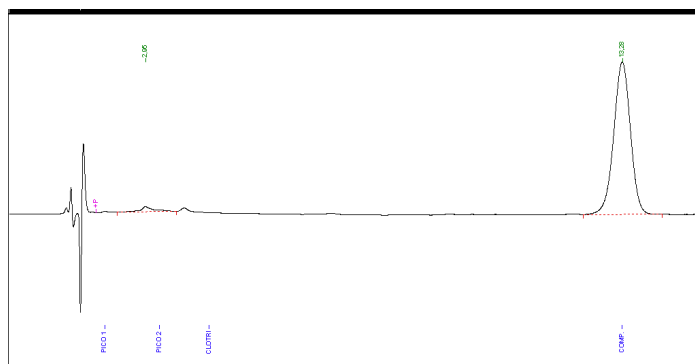
Gráfico 2. Demostración gráfica del análisis de Placebo de Tri-Clor Crema para el estudio de la Especificidad en Equipo Cromatografico Agilent [36].



#### 5.4.2. Capacidad del método para discernir entre el Clotrimazol y sus productos de degradación.

Mousa, B. y col. [46] en sus experimentos obtuvieron como resultado que la principal vía de degradación del Clotrimazol es por hidrólisis ácida, obteniéndose dos productos de degradación: Imidazol y Compuesto Relacionado A de Clotrimazol (orto-clorofenil difenilmetanol) tal como se representa en la Figura 5.

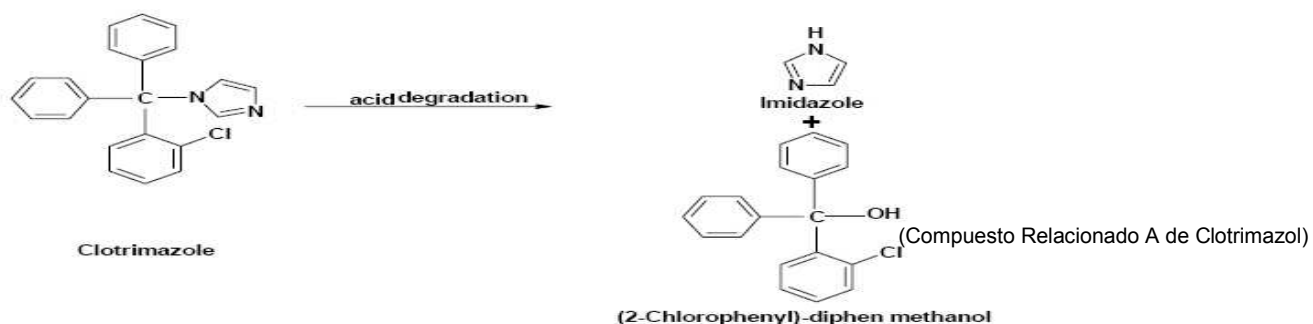
Figura 5. Degradación ácida del Clotrimazol. Formación de Imidazol y Compuesto Relacionado A.



Cuando se analizó el precipitado obtenido por degradación ácida, se obtuvo un pico con tiempo de retención de (13.28) (ver Gráfico 3) y no se detectó ninguna señal en la zona del Clotrimazol. Este pico de tiempo de retención de 13.28 pudiera estar relacionado con el Compuesto Relacionado A de Clotrimazol ya que al perder la molécula de Imidazol se acentúan las características polares de este producto de degradación. Además al analizar el filtrado del experimento de hidrólisis ácida, se obtuvo un pico al inicio de la corrida (resultados no mostrados) que pudiera corresponder a la molécula de Imidazol.

Laboratorios Andifar adquirirá un detector de arreglo de diodos lo cual permitirá detectar la presencia de impurezas en los picos obtenidos por HPLC.

Gráfico 3. Demostración gráfica del producto de degradación ácida de Tri-Clor Crema en Equipo Cromatográfico Perkin-Elmer <sup>[37]</sup>.



## 5.5. Evaluación de la Linealidad.

### 5.5.1. Resultados del análisis de las muestras por adición de estándar a un placebo de Tri-Clor Crema.

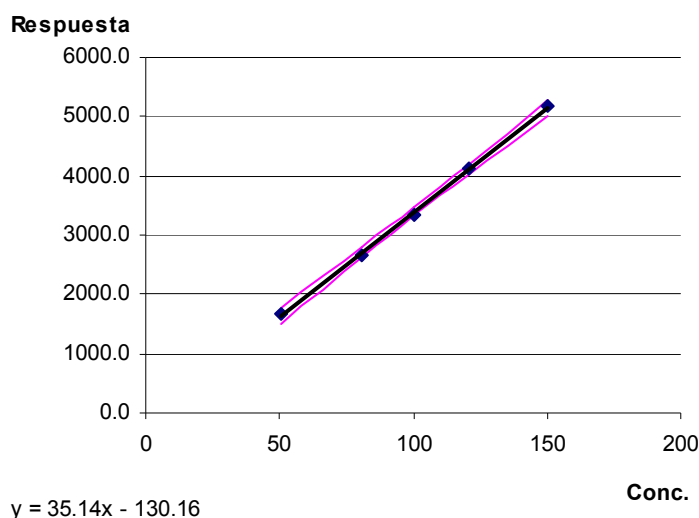
Tabla 24. Respuestas obtenidas a los diferentes niveles de concentración de Clotrimazol en las muestras adicionadas.

Concentración en porcentaje (%)	Respuesta 1 (mAU)	Respuesta 2 (mAU)	Respuesta 3 (mAU)	Respuesta Promedio
50.322	1,723.500	1,654.543	1,672.230	1,683.424
80.550	2,653.345	2,649.320	2,687.453	2,663.373
100.320	3,316.540	3,342.345	3,363.432	3,340.772
120.598	4,125.654	4,165.000	4,110.210	4,133.621
150.301	5,102.392	5,289.340	5,122.930	5,171.554

La determinación de la linealidad se realizó en pesadas separadas y no realizando alícuotas de una solución madre ya que así se reduce el posible error sistemático que se podría arrastrar realizando diluciones partiendo de una sola pesada. Se utilizaron cinco niveles de concentración porque son el mínimo de niveles recomendados por la ICH <sup>[5]</sup> aunque la Guía de la EURACHEM <sup>[12]</sup> recomienda seis niveles de concentración y el blanco.

### 5.5.2. Curva de calibrado.

Gráfico 4. Curva de calibrado que representa la concentración teórica de las muestras adicionadas (eje x) versus respuestas promedios obtenidas para cada concentración (eje y).



A simple vista se puede considerar que aparentemente existe correlación lineal entre las concentraciones estudiadas y las respuestas obtenidas.

### 5.5.3. Ensayo estadístico de Bartlett.

Tabla 25. Parámetros para el cálculo de la determinación del test de Bartlett

Respuestas Promedios	$S_i^2$	$(v_i S_i^2)$	$(v_i \ln S_i^2)$	$S_i$
1,683.4243	1,282.7518	3,848.2554	21.4703	35.81552438
2,663.3727	438.9470	1,316.8410	18.2531	20.95106194
3,340.7723	551.5699	1,654.7096	18.9383	23.48552483
4,133.6213	798.0948	2,394.2845	20.0467	28.25057212
5,171.5540	10,510.6087	31,531.8261	27.7804	102.5212598
<b>Sumatoria</b>	13,581.9722	40,745.9166	106.4888	



( $v_i$ : Grados de libertad de cada serie de resultados = 3)

( $S_i^2$ : Varianza de cada serie.)

$$\text{Valor de } C \quad C = 1 + \frac{\frac{5}{3} - \left(\frac{1}{15}\right)}{3(5-1)} \quad C = 1 + \frac{\frac{5}{3} - \left(\frac{1}{15}\right)}{3(5-1)} \quad C = 3.1333$$

$$\text{Valor de } S^2 \quad S^2 = \frac{\sum v_i S_i^2}{\sum v_i} \quad S^2 = \frac{40,745.916}{15} \quad S^2 = 2,716.3944$$

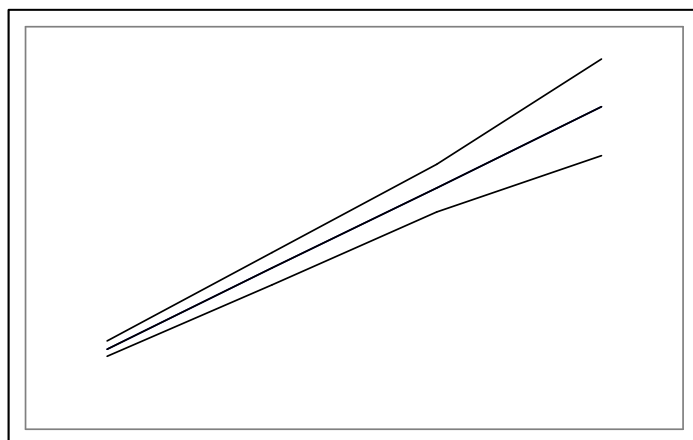
**Valor de M**

$$M : \frac{1}{C} \left[ \left( \sum_{i=1}^k v_i \right) \text{Ln} S^2 - \sum_{i=1}^k v_i \text{Ln} S_i^2 \right] \quad M : \frac{1}{3.133} [15 \text{Ln} 2,716.3944 - 106.4888] \quad M : 3.8672$$

El valor de M calculado es menor que  $\chi^2_{0.95}(\text{con } k-1=4, \text{ grados de libertad}) = 9.8$ . Este resultado indica que las varianzas son homogéneas, es decir, que la magnitud de los errores en los valores de y son independientes de la concentración de analito. Por tal motivo, la regresión que se utilizó fue regresión lineal simple no ponderada.

Muchas veces, los errores en el valor de y aumentan cuando aumenta la concentración de analito. Esto significa que los puntos de calibración, no deben tener un peso igual en los cálculos. Por lo que es más importante que la línea pase más cerca de los puntos donde los errores son menores. En estos casos, la regresión lineal que debe utilizarse es la ponderada. El Gráfico 5, muestra la ponderación de errores en un cálculo de regresión donde existe un incremento de los errores con el incremento de la concentración.

Gráfico 5. Representación grafica de la regresión ponderada.



### 5.5.4. Regresión lineal simple no ponderada.

#### 5.5.4.1. Cálculo de la recta de regresión y el coeficiente de correlación.

Tabla 26. Parámetros para el cálculo de la recta de regresión y el coeficiente de correlación.

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$y_i^2$	$x_i y_i$	$y_i/x_i$
	50.32	2,532.30	1,683.42	2,833,917.49	84,713.28	33.45
	80.55	6,488.30	2,663.37	7,093,553.96	214,534.67	33.06
	100.32	10,064.10	3,340.77	11,160,759.78	335,146.28	33.30
	120.60	14,543.88	4,133.62	17,086,825.33	498,506.47	34.28
	150.30	22,590.39	5,171.55	26,744,970.77	777,289.74	34.41
<b>Sumatoria</b>	502.09	56,218.98	16,992.74	64,920,027.33	1,910,190.43	33.70

#### Valor de la pendiente (bi)

$$Pendiente(bi) = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad Pendiente(bi) = \frac{203,809.5989}{5,799.9023} \quad Pendiente(bi) = 35.1402$$

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \quad S_{xx} = 56,218.98 - \frac{(502.09)^2}{5} \quad S_{xx} = 5,799.9023$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \quad S_{xy} = 1,910,190.43 - \frac{(502.09)(16,992.74)}{5} \quad S_{xy} = 203,809.5989$$

#### Valor del intercepto (bo)

$$Intercepto(bo) = \bar{y} - b_i \bar{x} \quad Intercepto(bo) = 3,398.5489 - (35.1402)(100.4182)$$

$$Intercepto(bo) = -130.1645$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad \bar{x} = \frac{502.09}{5} \quad \bar{x} = 100.4182$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n} \quad \bar{y} = \frac{16,992.74}{5} \quad \bar{y} = 3,398.5489$$

#### Recta de regresión lineal

La recta de regresión lineal  $y = b_i x + b_o$  es igual a  $y = 35.1402 x - 130.1645$ .

### Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}} \quad r = \frac{203,809.5989}{\sqrt{(5,799.9023)(7,169,353.0718)}} \quad r = 0.9995$$

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \quad S_{yy} = 64,920,027.33 - \frac{(16,992.74)^2}{5} \quad S_{yy} = 7,169,353.0718$$

Se muestra que se obtuvo un coeficiente de correlación alto. Esto unido a la grafica del calibrado que muestra una aparente linealidad, puede ser suficiente para asegurar que se ha obtenido una relación lineal útil.

#### 5.5.4.2. Cálculo de los errores residuales, de la pendiente y del intercepto.

Tabla 27. Parámetros para el cálculo de errores residuales, de la pendiente y del intercepto.

	$x_i$	$y_i$	$\hat{Y}$	$y_i - \hat{Y}$	$(y_i - \hat{Y})^2$
	50.32	1,683.42	1,638.16	45.26	2,048.90
	80.55	2,663.37	2,700.38	-37.00	1,369.31
	100.32	3,340.77	3,395.10	-54.33	2,951.30
	120.60	4,133.62	4,107.67	25.95	673.44
	150.30	5,171.55	5,151.44	20.11	404.60
<b>Sumatoria</b>	502.09	16,992.74	16,992.74	0.00	7,447.54

#### Valor del Error residual ( $S_{x/y}$ )

$$\text{Error de los residuos } (S_{x/y}) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad S_{x/y} = \sqrt{\frac{7,447.54}{3}} = 49.825$$

#### Valor del Error de la pendiente ( $S_{b_i}$ )

$$\text{Error de la pendiente } (S_{b_i}) = \frac{S_{x/y}}{\sqrt{S_{xx}}} \quad S_{b_i} = \frac{49.825}{\sqrt{5,799.9023}} = 0.6542$$

#### Valor del Error del intercepto ( $S_{b_o}$ )

$$\text{Error del intercepto } (S_{b_o}) = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n S_{xx}}} \quad S_{b_o} = 49.825 \sqrt{\frac{56,218.98}{5(5,799.9023)}} = 69.3732$$

### 5.5.4.3. Cálculo para la determinación del intervalo de confianza de la curva de regresión.

Tabla 28. Parámetros para el cálculo del intervalo de confianza de la curva de regresión.

$x_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
50.322	-50.096	2,509.629
80.550	-19.868	394.745
100.320	-0.098	0.010
120.598	20.180	407.224
150.301	49.883	2,488.294

El valor de t para un  $\alpha$  de 0.05 y n-2 grados de libertad se busco en una tabla de puntos de porcentajes de distribución t, siendo de 3.128. Así mismo los valores de  $S_{xy}$  y  $S_{xx}$  se determinaron según formulaciones en “d.2” y “d.1.”, respectivamente, para los parámetros de “d. Regresión lineal simple no ponderada”, página 47.

Tabla 29. Valores de los límites para el intervalo de confianza de la curva de regresión.

$x_i$	Valor mínimo del Intervalo de Confianza	Valor máximo del Intervalo de Confianza
50.322	1,512.031	1,764.288
80.550	2,618.279	2,782.475
100.320	3,324.184	3,466.012
120.598	4,025.244	4,190.097
150.301	5,025.678	5,277.201

### 5.5.4.4. Cálculo para la determinación de los intervalos de confianza para la pendiente y para el intercepto.

5.5.4.4.1. Intervalo de confianza para la pendiente ( $b_i$ ) =  $b_i \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{bi}$

$$S_{bi} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad S_{bi} = \frac{49.825}{\sqrt{5,799.402}} \quad S_{bi} = 0.6542$$

$$\text{Intervalo de confianza de la pendiente} = b_i \pm t_{\alpha/2, n-2} S_b \quad 35.1402 \pm 3.182(0.6542)$$

Valor mínimo: 33.0585

Valor máximo: 37.2218

El intervalo de confianza de la pendiente no incluye el valor cero.

5.5.4.4.2. Intervalo de confianza para el intercepto ( $b_o$ ) =  $b_o \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{bo}$

$$S_{b_0} = S_{x/y} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad S_{b_0} = 49.825 \sqrt{\frac{56,218.98}{5(5,799.9023)}} \quad S_{b_0} = 69.3732$$

Intervalo de confianza del intercepto  $S_{b_0} = b_0 \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{b_0} - 130.1645 \pm (3.128)(69.3732)$

Valor mínimo: -347.1638

Valor máximo: 86.8348

El intervalo de confianza del intercepto incluye el valor cero.

**5.5.4.5. Cálculo para la determinación del error aleatorio asociado a la determinación de una concentración.**

Valores de y (Área bajo la curva).

$$y_1 = 3,397.246$$

$$y_2 = 3,392.362$$

Sustituyendo el promedio de los valores de “y” en la ecuación de regresión obtenida en el inciso a: “Cálculo de la recta de regresión y el coeficiente de correlación” del acápite 5.5.4. Regresión lineal simple no ponderada”, página 72.

$$y = b_i x - b_0 \quad x = (y - b_0) / b_i$$

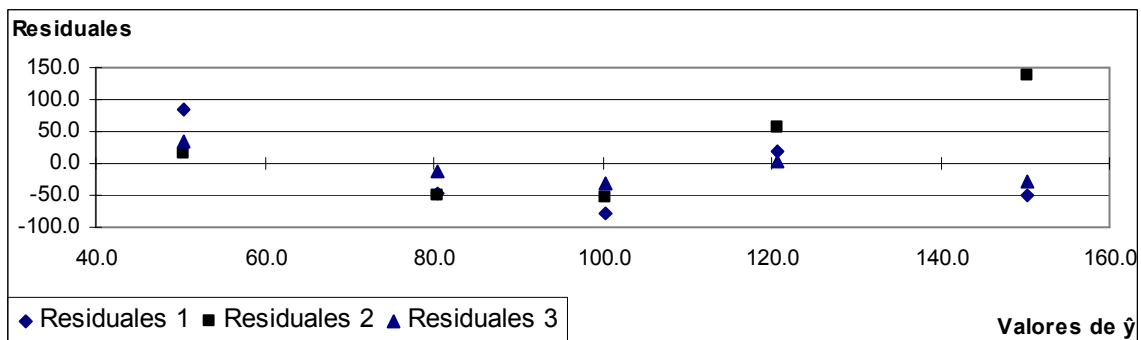
$$X_0 = 100.3116$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{b_i} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b_i^2 \sum_i (X_i - \bar{X})^2}} \quad S_{x_0} = \frac{49.825}{35.1402} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{5} + \frac{(3,394.804 - 3,398.5489)^2}{(35.1402)^2 (5,799.9023)}}$$

$$S_{x_0} = 1.1863$$

**5.5.4.6. Gráfico de los residuales.**

Gráfico 6. Verificación de la linealidad por gráfico de los residuales.



Los valores de los residuales obtenidos con las concentraciones de 120.598 y 150.301 están distribuidos sin tendencia alrededor de cero. En el caso de los valores obtenidos con las concentraciones de 50.322, 80.550 y 100.320 las réplicas de ambos tienen una tendencia de signo; el hecho de existir un reducido número de réplicas no nos permitió llegar a la conclusión de que el modelo de regresión lineal no se ajustara. También, en el caso de los valores obtenidos con la concentración de 150, se observó que los residuos parecieran ser superiores. Por tal motivo, se procedió a realizar el análisis de varianza y la evaluación de la falta de ajuste de la regresión lineal que se describe a continuación.

#### 5.5.4.7. Cálculo del ajuste a un modelo lineal.

Tabla 30. Parámetros para el cálculo de la regresión.

Datos	Concentración	Respuestas Promedio
1	50.322	1,683.424
2	80.550	2,663.373
3	100.320	3,340.772
4	120.598	4,133.621
5	150.301	5,171.554

Tabla 31. Resultado de regresión según el programa *Microsoft Excel*.

Origen de las Variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Regresión	1	62070,649.37	62070,649.37	12,046.88	8.29987E-05
Residuos	3	15,457.27	5,152.42		
Total	4	62086,106.64			

El valor de F calculado es mucho mayor que el valor crítico para F, con lo que las variaciones se encuentran explicadas en la regresión lineal y no en las residuales.

#### 5.5.4.8. Cálculo para la evaluación de la falta de ajuste en la regresión lineal.

Tabla 32. Valores para el cálculo de la suma cuadrado del error (SSE).

$X_i$	$\hat{Y}$	$(\hat{y} - y_i)^2$		
50.322	1,638.160	7,282.991	268.417	1,160.795
80.550	2,700.377	2,211.995	2,606.802	167.026
100.320	3,395.098	6,171.386	2,782.897	1,002.746
120.598	4,107.671	323.399	3,286.650	6.448
150.301	5,151.439	2,405.647	19,016.578	812.785
<b>Sumatoria</b>		18,395.418	27,961.343	3,149.801
<b>Sumatoria total (SSE)</b>				49,506.561

$$\text{Suma cuadrado del error (SSE)} : \sum (y_i - \hat{y})^2 = 49,506.561$$

Tabla 33. Valores para el cálculo del la suma de cuadrado del error experimental puro.

$X_i$	$Y_{i 1}$	$Y_{i 2}$	$Y_{i 3}$	$\bar{y}$	$(y_{ij} - \bar{y})^2$ (1)	$(y_{ij} - \bar{y})^2$ (2)	$(y_{ij} - \bar{y})^2$ (3)	$(ni-1)$
50.32	1,723.50	1,654.54	1,672.23	1,683.42	1,606.06	834.13	125.31	2
80.55	2,653.35	2,649.32	2,687.45	2,663.37	100.55	197.48	579.86	2
100.32	3,316.54	3,342.35	3,363.43	3,340.77	587.21	2.47	513.46	2
120.60	4,125.65	4,165.00	4,110.21	4,133.62	63.48	984.62	548.09	2
150.30	5,102.39	5,289.34	5,122.93	5,171.55	4,783.38	13,873.54	2,364.29	2
<b>Sumatoria</b>					7,140.68	15,892.24	4,131.02	10.00
<b>Sumatoria (SSP<sub>exp</sub>)</b>							27,163.94	-

$$\text{Suma de cuadrado del error experimental puro (SSP}_{exp}) = \sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 = 27,163.94$$

$$MS_{exp} = \frac{\sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{\sum_i (n_i - 1)} = \frac{27,163.94}{10} = 2,716.394$$

$$MS_{Falta} = \frac{SSE - SSP_{exp}}{n - 2 - \sum (n_i - 1)} = \frac{49,506.56 - 27,163.94}{3} = \frac{22,342.62}{3} = 7,447.54$$

$$F = \frac{MS_{Falta}}{MS_{exp}} = \frac{7,447.54}{2,716.394} = 2.741$$

El valor de F calculado es menor que el valor de F tabulado, esto indica que no existe evidencia suficiente para sugerir que el modelo de regresión lineal es inapropiado.

### 5.6. Evaluación del Rango.

Como lo define la Guía de la ICH Q2 (R1) <sup>[5]</sup>, el rango es el intervalo de concentración para el cual se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel apropiado de precisión, exactitud y linealidad.

Para el caso de producto terminado, como Tri-Clor Crema, específica que debe ser de 50 a 150 % de la cantidad declarada del principio activo. En este trabajo se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal en ese intervalo.

### 5.7. Evaluación del Límite de Detección y de Cuantificación.

#### 5.7.1. Resultados de la Evaluación de los Límites de detección y cuantificación.

Tabla 34. Valores para el cálculo del límite de detección y de cuantificación.

<b>Número</b>	<b>Ruido del Blanco <math>y_b</math> (<math>\mu</math>AU)</b>	<b>Señal del Analito <math>y_D</math> (<math>\mu</math>AU)</b>
1	0.2860	0.73518
2	0.2303	0.71750
3	0.3550	0.70590
4	0.2132	0.75370
5	0.3239	0.72415
6	0.2041	0.73936
7	0.2496	0.73794
8	0.2072	0.74191
9	0.3455	0.73030
10	0.3861	0.72058
<b>Promedio</b>	0.28009	0.73065
<b>Desviación</b>	0.06835	0.01389

**Valor de  $y_A$** 

$$y_A = y_D - \bar{y}_b \quad y_A = 0.73065 - 0.28009 \quad y_A = 0.45056$$

**Valor del Límite de detección**

$$LD = \frac{3.29 S_{y_b}}{y_A} C_A \quad LD = \frac{3.29 \times 0.06835}{0.45056} \times 0.1 \quad LD = 0.050 \mu\text{g} / \text{mL}$$

**Valor del Límite de cuantificación**

$$LC = \frac{10 S_{y_b}}{y_A} C_A \quad LC = \frac{10 \times 0.06835}{0.45056} \times 0.1 \quad LC = 0.152 \mu\text{g} / \text{mL}$$

## 5.7.2. Resultados de la comprobación del límite de detección y cuantificación.

## 5.7.2.1. Comprobación del límite de detección.

A la concentración calculada para el límite de detección de 0.050  $\mu\text{g} / \text{mL}$  no se detectó la molécula de Clotrimazol; sin embargo a una concentración de 0.100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  si pudo ser detectado, por lo que al límite de detección del método se le asignó el valor de 0.100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

## 5.7.2.2. Comprobación del límite de cuantificación.

Los resultados de la comprobación del límite de cuantificación mediante el análisis repetido de una



muestra de Tri-Clor Crema, a una concentración de Clotrimazol cercana al límite de detección calculado, se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Comprobación del límite de cuantificación.

<b>Número</b>	<b>Concentración Muestra (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>Concentración Muestra (%)</b>
<b>1</b>	0.155	103.33
<b>2</b>	0.161	107.19
<b>3</b>	0.163	108.50
<b>4</b>	0.131	87.58
<b>5</b>	0.139	92.62
<b>6</b>	0.166	110.58
<b>7</b>	0.174	116.31
<b>8</b>	0.156	104.28
<b>9</b>	0.156	103.79
<b>10</b>	0.165	109.71
<b>Promedio</b>	0.152	101.65
<b>Desv. Estándar</b>	0.014	9.63
<b>c.v.</b>	9.495	

Nótese que el coeficiente de variación fue inferior al 10 %, límite máximo permitido por la Asociación Española de Farmacéuticos <sup>[60]</sup>. La recuperación también se encontró dentro de los límites establecidos por esta asociación (de 80 a 120 % para concentraciones de 0.1 a 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

### **5.8. Evaluación de la Robustez.**

El esquema de la Figura 6. muestra los parámetros que fueron variados en el estudio de la robustez. Las variables representadas con letras azules son las normales y las rojas son las modificadas.

Figura 6. Esquema de las variables asignadas para la evaluación de la robustez.

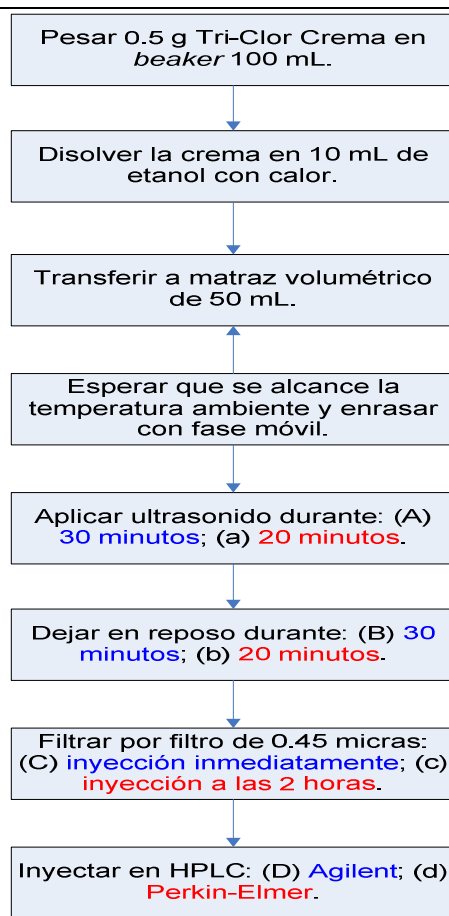


Tabla 36. Variables asignadas para la evaluación de la robustez.

<b>A:</b>	Aplicar ultrasonido durante 30 minutos.
<b>a:</b>	Aplicar ultrasonido durante 15 minutos.
<b>B:</b>	Dejar en reposo durante 30 minutos.
<b>b:</b>	Dejar en reposo durante 15 minutos.
<b>C:</b>	Inyección de la muestra en el HPLC una vez filtrada.
<b>c:</b>	Inyección de la muestra en el HPLC pasado 2 horas de haberla filtrada.
<b>D:</b>	Inyectar en el HPLC <i>Agilent</i> .
<b>d:</b>	Inyectar en el HPLC <i>Perkin – Elmer</i> .
<b>E:</b>	Sin Sentido.
<b>e:</b>	Sin Sentido.
<b>F:</b>	Sin Sentido.
<b>f:</b>	Sin Sentido.
<b>G:</b>	Sin Sentido.
<b>g:</b>	Sin Sentido.

La Tabla 37 y 38 muestran los resultados del análisis de la variación de los parámetros señalados en la tabla anterior. Como criterio para determinar si la variación de un parámetro tenía influencia en el desempeño del método se utilizó que los valores de  $(VA - Va)$  deberían ser inferiores a

1.276, este valor es el producto de la multiplicación de  $s\sqrt{2}$ , donde  $s = 0.902$  y es la desviación estándar obtenida al aplicar el método 6 veces a una muestra de Tri-Clor Crema, en condiciones de repetibilidad.

Los resultados muestran que la aplicación de ultrasonido solamente durante 15 minutos y el hecho de dejar reposar la muestra 15 minutos menos, previo a filtrarla e inyectarla, provocan una disminución de la extracción de Clotrimazol de la crema.

Tabla 37. Resultados de los análisis del estudio de la evaluación de la robustez.

<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>
101.32	100.95	98.21	98.02	97.92	98.35	96.89	96.87

Tabla 38. Resultado de las diferencias de cada media para la evaluación de la robustez.

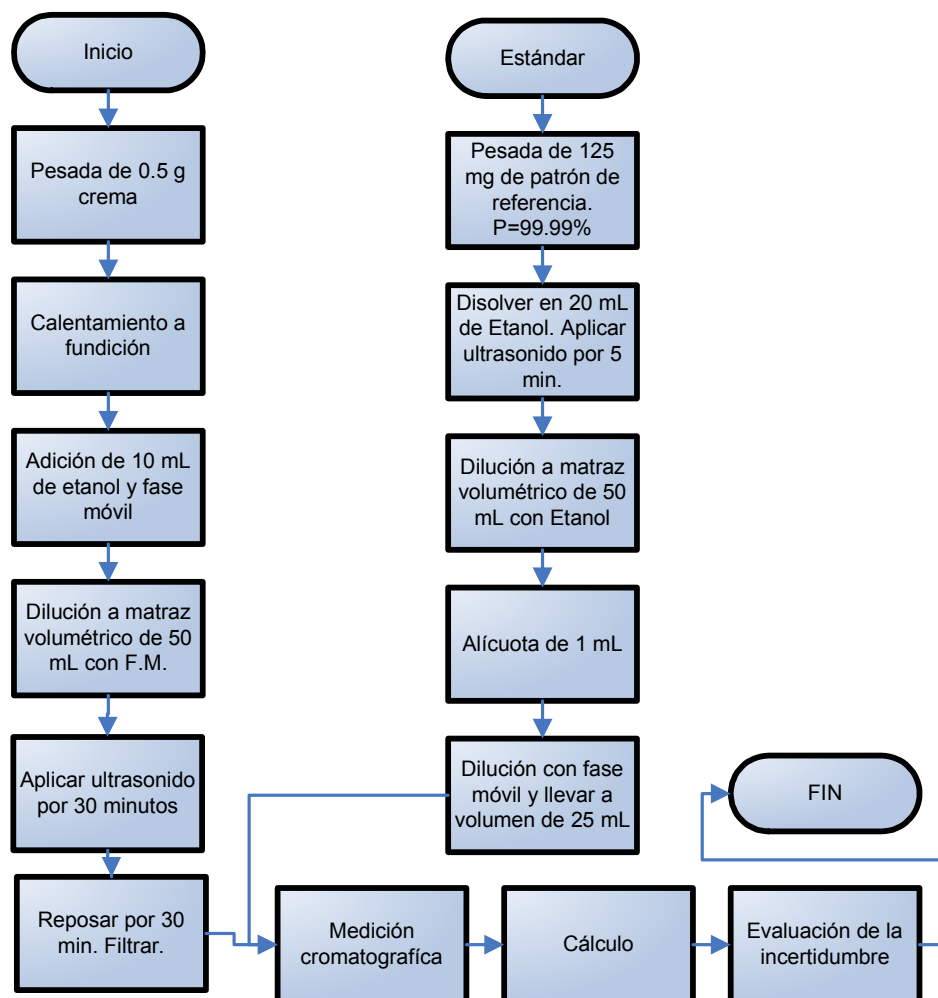
<b>Parámetros</b>	<b>Resultado</b>
A-a	$V_A = 2.117$
B-b	$V_B = 2.137$
C-c	$V_C = 0.037$
D-d	$V_D = 0.882$
E-e	$V_E = 0.243$
F-f	$V_F = 0.067$
G-g	$V_G = 0.157$

El método es robusto cuando en el tratamiento de la muestra se incluyen las siguientes condiciones: aplicación de ultrasonido durante 30 minutos y reposo durante 20 minutos.

### **5.9. Evaluación de la Incertidumbre.**

5.9.1. Definición del mensurando. Cantidad de clotrimazol (mg / g) determinada por cromatografía HPLC en la porción tomada de crema.

5.9.2. Diagrama:



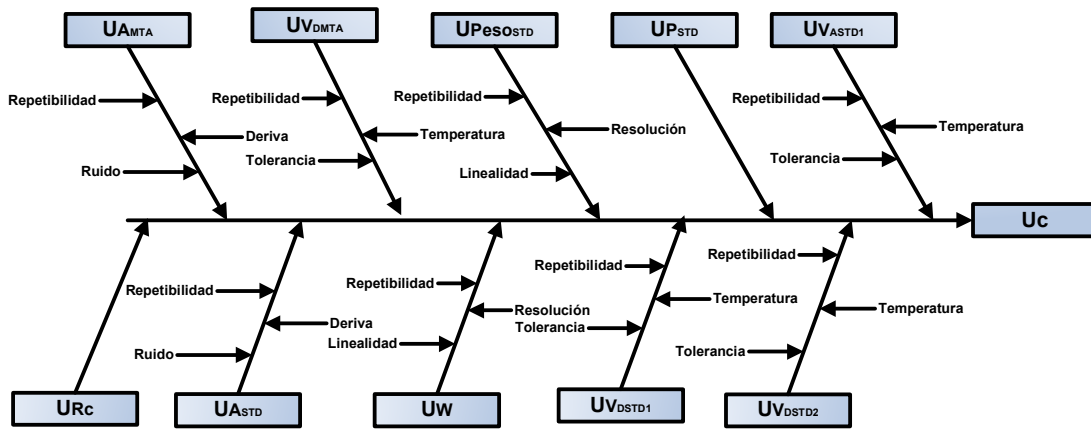
### 5.9.3. Modelo matemático:

$$f = \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{A_{STD} W V_{DSTD1} V_{DSTD2} R}$$

En donde:

f: mg de clotrimazol por g de crema;  $A_{MTA}$ : Área de la muestra;  $A_{STD}$ : Área del estándar;  $V_{DMTA}$ : Volumen dilución de la muestra (50 mL);  $\text{Peso}_{STD}$ : peso del estándar;  $P_{STD}$ : Pureza del estándar;  $V_{ASTD1}$ : Volumen alícuota del estándar (1 mL); W: Peso de la muestra;  $V_{DSTD1}$ : Volumen dilución No. 1 del estándar (50 mL);  $V_{DSTD2}$ : Volumen dilución No. 2 del estándar (25 mL) y R: Recobrado.

### 5.9.4. Identificación de las fuentes de incertidumbre:



### 5.9.5. Cálculo de las incertidumbres

a. Incertidumbre asociada al volumen de dilución No. 1 del estándar ( $V_{DSTD1}$ ):

$$T_f: \pm 0.06 \text{ mL} \quad u_f: a/\sqrt{6} = 0.06/\sqrt{6} = 0.0245$$

$u_r$ : la desviación estándar promedio es 0.023, la incertidumbre de la repetibilidad de la calibración es de  $S_r/\sqrt{n} = 0.023\sqrt{6} = 0.0094$ .

$$u_{\Delta t}: \frac{Vx\alpha}{\sqrt{3}} x \Delta t / 2 = \frac{50 \times 9.96^{-4}}{\sqrt{3}} x (37 - 23) / 2 = 0.2012$$

$$u_{VDSTD1}: \sqrt{(u_f^2 + u_r^2 + u_{\Delta t}^2)}$$

$$u_{VDSTD1}: \sqrt{(0.0245^2 + 0.0094^2 + 0.20126^2)}$$

$$u_{VDSTD1}: \sqrt{(6.0025^{-4} + 8.836^{-5} + 0.04051)}$$

$$u_{VDSTD1}: 0.20296$$

b. Incertidumbre asociada al volumen de dilución de la muestra ( $V_{DMTA}$ ):

$$T_f: \pm 0.06 \text{ mL} \quad u_f: a/\sqrt{6} \quad u_f: 0.06/\sqrt{6} = 0.0245$$

$u_r$ : la desviación estándar promedio es 0.023, la incertidumbre de la repetibilidad de la calibración es de  $S_r/\sqrt{n} = 0.023\sqrt{6} = 0.0094$ .

$$u_{\Delta t}: \frac{Vx\alpha}{\sqrt{3}} x \Delta t / 2 = \frac{50 \times 9.96^{-4}}{\sqrt{3}} x (37 - 23) / 2 = 0.20126$$

$$u_{VDMTA}: \sqrt{(u_f^2 + u_r^2 + u_{\Delta t}^2)}$$

$$u_{\text{VDMTA}}: \sqrt{(0.0245^2 + 0.0094^2 + 0.20126^2)}$$

$$u_{\text{VDMTA}}: \sqrt{(6.0025^{-4} + 8.836^{-5} + 0.04051)}$$

$$u_{\text{VDMTA}}: 0.20296$$

c. Incertidumbre asociada al volumen de dilución No. 2 del estándar ( $V_{\text{DSTD2}}$ ):

$$T_f: \pm 0.06 \text{ mL} \quad u_f: a/\sqrt{6} \quad u_f: 0.06/\sqrt{6} = 0.0245$$

$u_r$ : la desviación estándar promedio es 0.0167, la incertidumbre de la repetibilidad de la calibración es de  $S_r/\sqrt{n} = 0.0167/\sqrt{6} = 0.0056$ .

$$u_{\Delta t}: \frac{Vx\alpha}{\sqrt{3}} x\Delta t / 2 \quad \frac{25x9.96^{-4}}{\sqrt{3}} x(37 - 23) / 2 = 0.10063$$

$$u_{\text{VDSTD2}}: \sqrt{(u_f^2 + u_r^2 + u_{\Delta t}^2)}$$

$$u_{\text{VDSTD2}}: \sqrt{(0.0245^2 + 0.0056^2 + 0.10063^2)}$$

$$u_{\text{VDSTD2}}: \sqrt{(6.0025^{-4} + 3.136^{-5} + 0.01012)}$$

$$u_{\text{VDSTD2}}: 0.1037$$

d. Incertidumbre asociada al peso del estándar ( $\text{Peso}_{\text{STD}}$ ):

$u_d$ : debida a la resolución de la balanza:  $d/2/\sqrt{3}$  (distribución rectangular),  $0.0005/\sqrt{3} = 0.000289$

$u_r$ : debida a la repetibilidad de las mediciones,  $u_{\text{rep}} = 0.0005$

$u_L$ : debida a la calibración. Linealidad,  $u_L: L/\sqrt{3} = 0,002/\sqrt{3} = 0.001155$  (distribución rectangular).

$$u_{\text{PesoSTD}}: \sqrt{(u_d^2 + u_r^2 + 2 u_L^2)}$$

$$u_{\text{PesoSTD}}: \sqrt{(0.000289^2 + 0.0005^2 + 2 \times 0.001155^2)}$$

---


$$u_{\text{PesoSTD}}: \sqrt{(8.3521^{-8} + 2.5^{-7} + 2.66805^{-6})}$$

$$u_{\text{PesoSTD}}: 1.7325^{-3} \text{ g} = 17325 \text{ mg}$$

e. Incertidumbre asociada al área del pico cromatográfico de la muestra ( $A_{\text{MTA}}$ ):

$u_{\text{rep}}$ : debido a la repetibilidad de las mediciones: 28.70592.

$u_{\text{d}}$ : deriva: 0.02882.

$u_{\text{r}}$ : ruido: 0.02356.

$$u_{\text{AMTA}}: \sqrt{(u_{\text{rep}}^2 + u_{\text{d}}^2 + u_{\text{r}}^2)}$$

$$u_{\text{AMTA}}: \sqrt{(28.7059^2 + 0.02882^2 + 0.02356^2)}$$

$$u_{\text{AMTA}}: \sqrt{(824.0312 + 0.00083 + 0.000555)}$$

$$u_{\text{AMTA}}: 28.7059 \text{ mAu S}$$

f. Incertidumbre asociada al área del pico cromatográfico del estándar ( $A_{\text{STD}}$ ):

$u_{\text{rep}}$  debido a la repetibilidad de las mediciones: 19.27390.

$u_{\text{d}}$ : deriva: 0.02882.

$u_{\text{r}}$ : ruido: 0.02356.

$$u_{\text{ASTD}}: \sqrt{(u_{\text{rep}}^2 + u_{\text{d}}^2 + u_{\text{r}}^2)}$$

$$u_{\text{ASTD}}: \sqrt{(19.27390^2 + 0.02882^2 + 0.02356^2)}$$

$$u_{\text{ASTD}}: \sqrt{(371.48336 + 0.00083 + 0.000555)}$$

$$u_{\text{ASTD}}: 19.2739 \text{ mAu S}$$

g. Incertidumbre asociada a la pureza del estándar ( $P_{\text{STD}}$ ):

$$u: 0.0001 / \sqrt{3} = 5.773\text{E-}5$$

$$u_{\text{p}}: 5.773^{-5}$$


---

h. Incertidumbre asociada al peso de la muestra (W):

$u_d$ : debida a la resolución de la balanza:  $d/2/\sqrt{3}$  (distribución rectangular),  $0.0005/\sqrt{3} = 0.000289$  g.

$u_r$  debida a la repetibilidad de las mediciones,  $u_{rep} = 0.0005$  g.

$u_L$  debida a la calibración. Linealidad,  $u_L: L/\sqrt{3} = 0.002/\sqrt{3} = 0.00115$  g (distribución rectangular).

$$u_W: \sqrt{(u_d^2 + u_r^2 + 2 u_L^2)}$$

$$u_W: \sqrt{(0.000289^2 + 0.0005^2 + 2 \times 0.00115^2)}$$

$$u_W: \sqrt{(8.3521 \cdot 10^{-8} + 2.5 \cdot 10^{-7} + 2.666 \cdot 10^{-6})}$$

$$u_W: 1.7325 \cdot 10^{-3} \text{ g.}$$

i. Incertidumbre asociada al volumen de la alícuota ( $V_{ASTD1}$ ):

$$T_f: \pm 0.06 \text{ mL } u_f: a/\sqrt{6} \quad u_f: 0.06/\sqrt{6} = 0.00245$$

$u_r$  repetibilidad: la desviación estándar promedio es 0.0020, la incertidumbre de la repetibilidad es de  $S_r/\sqrt{n} = 0.0020/\sqrt{6} = 0.0008$ .

$$u_{\Delta t}: \frac{Vx\alpha}{\sqrt{3}} \times \Delta t / 2 \quad \frac{1 \times 9.96^{-4}}{\sqrt{3}} \times (37 - 23) / 2 = 4.0252 \cdot 10^{-3}$$

$$u_{VASTD1}: \sqrt{(u_f^2 + u_r^2 + u_{\Delta t}^2)}$$

$$u_{VASTD1}: \sqrt{(0.00245^2 + 0.0008^2 + (4.0252 \cdot 10^{-3})^2)}$$

$$u_{VASTD1}: \sqrt{(6.00 \cdot 10^{-6} + 6.4 \cdot 10^{-7} + 1.6202 \cdot 10^{-5})}$$

$$u_{VASTD1}: 0.0047 \text{ mL}$$

j. Incertidumbre asociada al recobrado (R):

$$u_R: R \sqrt{\left( \frac{S_{biCAP}^2}{n_{CAP} bi_{CAP}^2} \right) + \left( \frac{S_{biCCN}^2}{n_{CCN} bi_{CCN}^2} \right)}$$



$$u_R: 1.00228 \sqrt{\left( \frac{(0.654)^2}{5 \times (35.140)^2} \right) + \left( \frac{(0.541)^2}{5 \times (35.060)^2} \right)}$$

$$u_R: 1.00228 \sqrt{0.000069 + 0.000047}$$

$$u_R: 0.0108$$

### 5.9.6. Coeficientes de sensibilidad

$$5.9.6.1. \text{ Coeficiente de sensibilidad } V_{DSTD1}: - \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1}^2 V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.2. \text{ Coeficiente de sensibilidad } A_{MTA}: \frac{V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.3. \text{ Coeficiente de sensibilidad } V_{DMTA}: \frac{A_{MTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.4. \text{ Coeficiente de sensibilidad } V_{DSTD2}: - \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2}^2 W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.5. \text{ Coeficiente de sensibilidad } \text{Peso}_{STD}: \frac{A_{MTA} V_{DMTA} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.6. \text{ Coeficiente de sensibilidad } A_{STD}: - \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD}^2 R}$$

$$5.9.6.7. \text{ Coeficiente de sensibilidad } P_{STD}: \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

$$5.9.6.8. \text{ Coeficiente de sensibilidad } W: - \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W^2 A_{STD} R}$$

$$5.9.6.9. \text{ Coeficiente de sensibilidad } V_{ASTD1}: \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R}$$

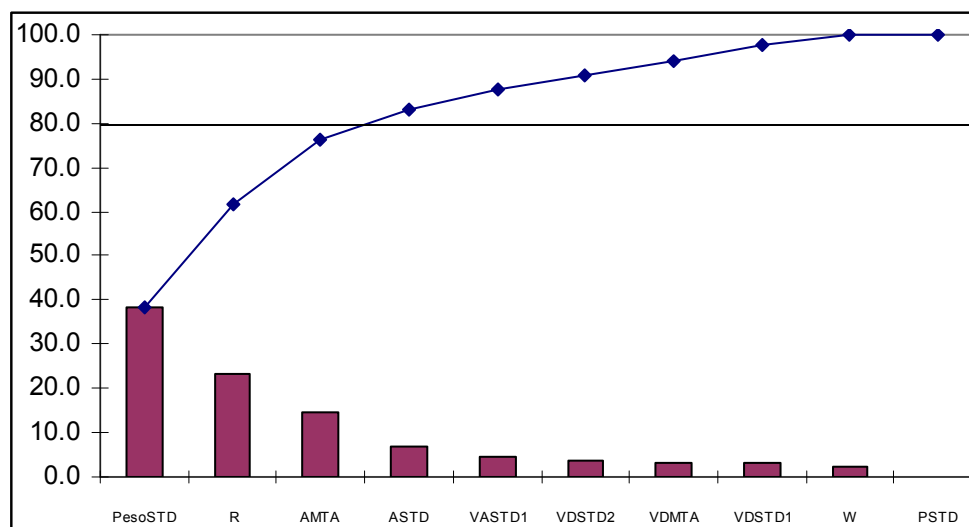
$$5.9.6.10. \text{ Coeficiente de sensibilidad } R: \frac{A_{MTA} V_{DMTA} \text{Peso}_{STD} P_{STD} V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} V_{DSTD2} W A_{STD} R^2}$$

5.9.7. Presupuesto de la incertidumbre:

Tabla. 39. Presupuesto de la incertidumbre.

No.	Fuente de incertidumbre	Valor de $x_i$	$ux_i$	$cx_i$	$(cx_i \times ux_i)^2$	Ind %	Ind Acum %
1	Peso <sub>STD</sub>	125.000	1.730	0.080	0.019	38.403	38.403
2	R	1.003	0.011	-9.924	0.011	23.255	61.657
3	A <sub>MTA</sub>	3340.772	28.706	0.003	0.007	14.803	76.460
4	A <sub>STD</sub>	3347.348	19.274	-0.003	0.003	6.647	83.107
5	V <sub>ASTD1</sub>	1.000	0.005	9.951	0.002	4.429	87.536
6	V <sub>DSTD2</sub>	25.000	0.104	-0.398	0.002	3.450	90.985
7	V <sub>DMTA</sub>	50.000	0.203	0.199	0.002	3.303	94.289
8	V <sub>DSTD1</sub>	50.000	0.203	-0.199	0.002	3.303	97.592
9	W	0.500	0.002	-19.903	0.001	2.407	99.999
10	P <sub>STD</sub>	1.000	0.000	9.952	0.000	0.001	100.000

Grafico 7. Grafico de Pareto representando la contribución de las diferentes variables que contribuyen a la incertidumbre en la medición de Clotrimazol en Tri-Clor Crema.



Como muestra el Diagrama de Pareto la incertidumbre en la medición del peso del estándar ( $Peso_{STD}$ ) tiene una contribución de 38.40 por ciento, seguido de la variable del recobrado (R) con 23.25 por ciento. La incertidumbre en la medición de la absorbancia de la muestra ( $A_{MTA}$ ) y de la absorbancia del estándar ( $A_{STD}$ ) contribuyen con 14.80 y 6.65 por ciento, respectivamente. Estos cuatro componentes representan el 80.0 por ciento de la contribución acumulativa en la incertidumbre del mensurando y. La variable sobre la que hay que actuar primero es en la incertidumbre de la medición del peso del estándar ( $U_{Peso_{STD}}$ ).

#### 5.9.8. Cálculo y expresión de la incertidumbre:

$$f := \frac{A_{MTA} \cdot V_{DMTA} \cdot Peso_{STD} \cdot P_{STD} \cdot V_{ASTD1}}{V_{DSTD1} \cdot V_{DSTD2} \cdot W \cdot A_{STD} \cdot R}$$

f: = 9.9514 mg / g de Clotrimazol de la porción de crema tomada.

$u_f$ : = 0.2223 mg / g

U = 2 x  $u_f$  = 2 x 0.2223 = 0.4446

Expresión: (9.95 ± 0.44) mg de Clotrimazol / g de crema.

### Características del Método de la Determinación de Clotrimazol por Cromatografía Líquida de Alto Desempeño en Tri-Clor Crema 20 g.

Parámetro de Validación	Estadístico	Resultado	Valor de Referencia	Especificación	
				Cumple	No Cumple
<b>1. Desempeño Cromatográfico</b>					
Eficiencia, N	-	3,584 y 2895.5	> 2,000	√	
Factor de simetría, T	-	1.193 y 1.05	$0.8 \leq T \leq 1.5$	√	
Repetibilidad del sistema	RSD	0.85 y 0.63 %	< 2.0 %	√	
<b>2. Exactitud</b>					
A. Exactitud	Promedio	99.085 %	97.0 – 103.0 %	√	
	Prueba de t	2.872	2.306	√	
Intervalo de Confianza	-	99.085 %	98.04 – 102.3 %	√	
B. Errores sistemáticos	Pendiente	Prueba de t	0.400	3.182	√
	Intercepto		0.474	3.182	√
C. Comparación de curvas	Varianzas	Prueba F	1.460	9.605	√
	Pendientes	Prueba t	0.238	2.306	√
<b>3. Precisión</b>					
Precisión intermedia	RSD	0.9119 %	< 5.0 %	√	
<b>4. Especificidad</b>					
Señal del placebo	-	Ausencia	Ausencia	√	
Activo degradado	-	Ausencia	Ausencia	√	
<b>5. Linealidad</b>					
Valor de r	-	0.9995	$\geq 0.990$	√	
Intervalo de confianza de la pendiente	$b_i + tS_{b_i}$	33.058 – 37.221	No incluir el cero	√	
Intervalo de confianza del intercepto	$b_o + tS_{b_o}$	-347.16 – 86.834	Incluir el cero	√	
Ajuste a un modelo lineal	Prueba F	12046	18.51	√	
Falta de ajuste en la regresión lineal	Prueba F	2.741	3.71	√	
<b>6. Rango</b>					
En el intervalo de 50 a 150 %, el método provee un grado aceptable de exactitud, precisión y linealidad.					
<b>7. Límite de Detección</b>					
Señal – Ruido	-	0.1 µg / mL	-		
<b>8. Límite de Cuantificación</b>					
Coefficiente de variación	C.V.	9.495 %	< 10.0 %	√	
Recobrado	%	101.65 %	80 – 120 %	√	
<b>9. Robustez</b>					
El método es robusto cuando en el tratamiento de la muestra se incluyen las siguientes condiciones: aplicación de ultrasonido durante 30 minutos y reposo durante 20 minutos.					
<p><i>Los parámetros: Desempeño Cromatográfico, Precisión, Linealidad y Especificidad, cumplieron con todas las especificaciones establecidas. En el estudio de la Exactitud existe una diferencia de 0.915 % respecto al 100 %; pero el valor 99.085 % se encuentra dentro de los valores de recuperación aceptados por las especialidades farmacéuticas. Se concluye que el método es preciso, lineal, específico y exacto para la cuantificación de Clotrimazol en el rango de 50 a 150 %. El método es apto para su utilización.</i></p> <p><i>* El método no es 100 % exacto, comprobado por la prueba t realizada en este estudio de la exactitud. Pero el valor obtenido (99.085), es de una exactitud suficiente para no realizar ninguna corrección al método, teniendo en cuenta que el intervalo para reconocer a un método como exacto, en las determinaciones de la industria farmacéutica, es de 97 a 103 % de la cantidad declarada. Por lo que aún incluyendo la posible falta de homogeneidad de la muestra, o los errores cometidos en la preparación de las muestras adicionadas, se obtiene un valor promedio dentro del rango especificado y con una desviación estándar inferior al 1 % [60].</i></p>					

---

## VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluaron los diferentes parámetros que caracterizan el desempeño del método para la determinación de clotrimazol por HPLC en el laboratorio de control de calidad de Laboratorios Andifar. El método fue validado con el fin de garantizar la calidad de los resultados y confirmar la especificación del producto terminado y elaborado por parte del Departamento de Producción, cumpliendo así con uno de los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:05, cuyas exigencias están orientadas a asegurar la competencia técnica de los laboratorios de ensayos, como organismo evaluador de la conformidad.

Los parámetros que se evaluaron fueron la exactitud, la precisión, la linealidad y rango, los límites de detección y de cuantificación, la especificidad, la robustez y la estimación de la incertidumbre de la medición. Todos estos parámetros cumplieron con los requisitos de la valoración del principio activo Clotrimazol en Tri-Clor Crema. El valor del principio activo oscila entre 9.51 y 10.39 mg / g a un 99.45 % de nivel de confianza y de acuerdo a la formulación del producto debe estar entre 9.0 y 11.0 mg / g. Por tanto, cumple con las especificaciones.

Es importante señalar, que uno de los problemas principales en este tipo de ensayos es que el producto farmacéutico evaluado es un compuesto heterogéneo, es así, que si se admite que la muestra es representativa del lote y las especificaciones internas del producto terminado establecen que el contenido de Clotrimazol debe encontrarse entre 90 y 110 por ciento de la cantidad declarada, se puede afirmar que la muestra cumple con las especificaciones establecidas por parte del laboratorio. Y dado que el método utilizado es validado se puede afirmar que los resultados cumplen con los requisitos de calidad, exacto, preciso y confiable.

---

---

## VII. RECOMENDACIONES

1. Una vez que se adquiriera un detector de arreglo de diodos, incluir en la evaluación de la especificidad la evaluación de la pureza de los picos analizados de los diferentes productos a ser estudiados.
  2. Efectuar, en colaboración con el Departamento de Producción, una revisión de los Instructivos de Fabricación de los Productos Farmacéuticos que posean las metodologías analíticas validadas para realizar en caso de ser necesario correcciones y mejoramiento a los procesos y los controles en proceso. Esto con el fin de realizar productos con procedimientos que sean reproducibles lote a lote y así continuar con procesos de validación como: validación de producción y validación de limpieza.
-

---

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 32(ES), 1992, "Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas", *Norma Internacional*, Ginebra.
  2. REGLAMENTO TECNICO CENTROAMERICANO, RTCA 11.03.39: 06(ES), 2006, "Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos", *Norma Internacional*, Primera Edición.
  3. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS ANEXO 5 INFORME 32. "Validación de los Procedimientos Analíticos Empleados en el Examen de los Materiales Farmacéuticos", *Norma Internacional*.
  4. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 25(ES), 1975, "Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas", *Norma Internacional*, Ginebra.
  5. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, ICH Q2(R1) (EN), (2005), "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology", *Norma Internacional*, Quinta Edición.
  6. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions", *Norma Internacional*, Segunda Edición.
  7. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method", *Norma Internacional*, Segunda Edición.
  8. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method", *Norma Internacional*, Segunda Edición.
  9. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 4: Basic method for the determination of the trueness of a standard measurement method", *Norma Internacional*, Segunda Edición.
  10. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method", *Norma Internacional*, Segunda Edición.
-

- 
11. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 5725 (EN), (1998), “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values”, *Norma Internacional*, Segunda Edición.
  12. EURACHEM GUIDE “The Fitness for Purpose of Analytical Methods”, (EN), (1998), “A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, Norma Internacional.
  13. Farmacopea de los Estados Unidos USP 30, Formulario Nacional NF 25”; (2008), Edición 30, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA, páginas: 749 – 752.
  14. Especificaciones Propias de Laboratorios Andifar, Fórmula Maestra, Código 13009. Tri-Clor Crema 20 g.
  15. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 25(ES), 1975, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, *Norma Internacional*, Ginebra.
  16. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 26(ES), 1977, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  17. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 27(ES), 1980, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, *Norma Internacional*, Ginebra.
  18. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 28(ES), 1982, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  19. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 29(ES), 1984, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  20. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 30(ES), 1987, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  21. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 31(ES), 1990, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  22. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 33 (ES), 1990, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  23. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 34(ES), 1996, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
-



- 
24. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS Informe 35(ES), 1999, “Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas”, Norma Internacional, Ginebra.
  25. Sistema de la Integración Centroamérica, [En Línea]; [Fecha de acceso Mayo del 2009]; URL disponible en: <http://www.sica.int/miembros>.
  26. Caribbean Community Secretariat, [En Línea]; [Fecha de acceso Mayo del 2009]; URL disponible en: <http://www.caricom.org/jsp/community>.
  27. Mercado Común del Sur, [En Línea]; [Fecha de acceso Mayo del 2009]; URL disponible en: <http://www.mercosur.org>.
  28. North American Free Trade Agreement, [En Línea]; [Fecha de acceso Mayo del 2009]; URL disponible en: <http://www.fas.usda.gov/itp/policy/nafta>.
  29. Chacón Solano, J., (2004), “Prácticas Recomendadas Para Determinar y Reportar la Incertidumbre de las Mediciones en Química Analítica”, Primera Edición, Editorial de la Universidad de Costa Rica.
  30. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN, ISO (EN), (1995), “Guía para la expresión de la incertidumbre de medida”, *Norma Internacional*, Suiza.
  31. Centro Nacional de Metrología, CENAM, NMX-CH-140-IMNC-2002 “Guía para la Expresión de la Incertidumbre de las Mediciones”, Norma Internacional, México, Primera Revisión.
  32. MAROTO, A., “*Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina*”, tesis doctoral, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España, 2002, página 26 – 32.
  33. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 3534-1(EN), (1993), “Statistics – Vocabulary and Symbols”, Geneva.
  34. Benítez, P. E.; Buenas Prácticas de Manufactura. La Gestión Técnica en la Fabricación de Medicamentos. Editorial CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA. Madrid, España. 1996.
  35. Centro Nacional de Metrología, CENAM, “Guía sobre la Calificación de Equipo de Instrumentos Analíticos” (ES), (2004), Norma Internacional, México.
  36. Manual Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent 1100 Series, (2001).
  37. Manual Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Perkin Elmer 200 Series, (2006).
  38. Manual pH-Metro Oakton pH 500, (2002).
  39. Manual Balanza analítica OHAUS EXPLORER, (2001).
  40. Manual Baño ultrasónico Cole Parmer (2002).
  41. Manual Agitador magnético con plancha calefactor Corning (2004).
-

- 
42. Instructivo de Trabajo, Laboratorios Andifar. PET-CC047/I-004, (2007), *“Procedimiento de Trabajo de la Calificación de la Operación de los Cromatógrafos Líquidos de Alta Resolución”*.
  43. Instructivo de Trabajo, Laboratorios Andifar. PET-CC048/I-002, (2007), *“Procedimiento de Trabajo de la Calificación de la Operación de los potenciómetros”*.
  44. Delgado, G., Vanegas, M., Delgado, M.; (2008), "Estimación de la Incertidumbre en la Medición de pH en Aguas", *Universitas*, **1**, pág. 8 – 18.
  45. Instructivo de Trabajo, Laboratorios Andifar. PET-CC049, (2007), *“Procedimiento de Trabajo de Verificación de la Cristalería”*.
  46. Mousa, B.; El-Kousy, N.; El-Bagary, R.; Mohamed, N.; “Stability Indicating Methods for the Determination of Some Anti-Fungal Agents Using Densitometric and RP-HPLC Methods”, [ En Línea ]; [ Fecha de acceso: Octubre del 2007 ]; URL disponible en: <http://www.cat.inist>.
  47. Instructivo de Trabajo, Laboratorios Andifar. PET-CC034/I-045, (2007), *“Procedimiento de Trabajo para la Determinación de Clotrimazol”*.
  48. “Farmacopea de los Estados Unidos USP 30, Formulario Nacional NF 25”; (2008), Edición 30, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA, páginas: 1987 – 1992.
  49. “Bioestadística aplicada a Bioquímica y Farmacia”, Capítulo 24, Control de Calidad Metodológico.
  50. Procedimiento Estandarizado de Trabajo Laboratorios Andifar. PET-CC036 “Protocolo de Validación de Laboratorios Andifar”.
  51. Instructivo de Trabajo, Laboratorios Andifar. PET-CC036/I-007 “Protocolo de Validación de la Valoración por HPLC de Clotrimazol en Tri-Clor, Crema 20 g”.
  52. Quattrachi, O.A.; Abelaira de Andrizzi, S.; Laba, R. F.; “Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica”, Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, Argentina, 1992.
  53. OTT, R. L.; “An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis”, Duxbury Press, Fourth edition, Belmont, California, 1993. Capítulo 9, Pág.: 437 - 490.
  54. Delgado, G.; Maestría en Química Analítica, Módulo I, Modelos de Calibración; Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León; Agosto, 2007.
  55. Microsoft Office Excel, (2003).
  56. MILLER, N. J., MILLER, J. C., (2002), “Estadística y Quimiometría para Química Analítica” Traducción de “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, Pearson Educación, Madrid; Capítulo 5, Pág. 111 – 152.
  57. OTT, R.L.; “An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis”, Duxbury Press, Fourth Edition, Belmont, California, 1993, Pág.: 529 – 532.
-

- 
58. Delgado, G.; Maestría en Química Analítica, Módulo II, Validación de Métodos Analíticos; Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León; Agosto, 2008.
59. Manual HPLC (2001), Evaluación de la Idoneidad del Sistema, Agilent Technologies.
60. Colectivo de Autores; Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.); Validación de Métodos Analíticos.
61. Leito, S.; Mölder, K.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I.; "Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources", *Journal of Chromatography*, [publicación periódica en línea] 2006, <http://www.sciencedirect.com>.
62. Delgado, G., Hernández, N., (2009), "Evaluación de la Incertidumbre en la determinación de aflatoxina B1 en maní de exportación por HPLC-FD, *Universitas*, **3**, pág. 5 – 15.
63. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN, ISO 17025(ES), (2005), "Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración", Norma Internacional, Ginebra, Segunda Edición.
64. BIPM, IEC, IFCC, IUPAC, OIML (1995). Guide for the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO, Ginebra.
65. Maple 11.0, Tutorial, software.
66. United State Pharmacopeia Certificate for Clotrimazole, LOT K0C282, USP Rockville, MD.
67. Delgado, G.; Maestría en Química Analítica, Módulo II, Cálculo de la Incertidumbre; Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León; Agosto, 2008.
68. BENITEZ, E., *Mejoramiento de la Calidad del Producto EPOCIM*, tesis maestría, Universidad de la Habana, Habana, Cuba, 2002.
69. ALBARENGA, J., *Validación de un Método Analítico para la Determinación Cuantitativa de Materia Prima que contenga Aloina por Espectrofotometría de Sistema de Diodos*, tesis maestría, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua, 2000.
-