



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN - León



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS (C.C.Q.Q.)

“ V ” CURSO DE FARMACIA.

TESIS PARA OBTAR AL TITULO DE:

Lic. QUIMICO – FARMACEUTICO

TITULO:

VALIDACION DE FAMOTIDINA DE 40 MG TABLETA POR  
ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-Vis).

ELABORADO POR:

- Br. ARELYS JOSSEFINA SEVILLA BONILLA.

TUTOR:

- MsC. FERNANDO EMILIO BACA ESCOTO.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”



Índice

Introducción.....	8
Planteamiento del problema.....	9
Objetivos	
1. General.....	10
2. Específicos.....	10
CAPITULO I	
1. Monografía de Famotidina.....	11-12
1.1. Metodología Analítica.....	12-13
1.2. Terapéutica.....	13-16
CAPITULO II: Generalidades de la validación	
1. Validación de métodos analíticos.....	17-20
1.1. Definición	
1.1.1. Definición general	
1.1.2. Definición analítica	
1.1.3. Otros términos relacionados con la validación	
1.2. Razones que justifican la validación de métodos analíticos	
1.3. Métodos susceptibles a ser validados	
1.3.1. Entorno legal	
1.3.2. Requerimientos para el registro	
1.3.3. Normas de correcta fabricación de medicamentos	
1.3.4. Farmacopeas	
2. Organización : buenas prácticas de laboratorio.....	20-26
2.1. Organización y personal	
2.2. Instalaciones	
2.2.1. Aparatos, reactivos, material y especímenes	
2.2.2. Aparatos	
2.2.3. Reactivos	
2.2.4. Material y especímenes	
2.3. Sistemas experimentales	
2.4. Productos de referencia y muestras de ensayo	
2.5. Documentación. Procedimientos escritos	
2.6. Archivo de documentos	
2.7. Verificación de resultado	
2.8. Autoinspeccion	



3.	Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación.....	26-29
3.1.	Definición de las características de practicabilidad	
3.2.	Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis	
3.3.	Puesta a punto. Característica de idoneidad	
3.4.	Características de fiabilidad	
4.	Documentos de la validación.....	30-32
4.1.	Protocolo de validación	
4.2.	Realización de la validación y evaluación de los resultados	
4.3.	Informe de validación	
4.4.	Certificado de validación	
4.5.	Archivo	
CAPITULO III: Parámetros a estudiar		
1.	Selectividad.....	32-35
1.1.	Definición	
1.2.	Ámbito de aplicación	
1.2.1.	Según objetivo del ensayo	
1.2.1.1.	Identificación	
1.2.1.2.	Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza se u principio activo	
1.2.2.	Procedimientos de determinación de la selectividad	
1.2.3.	Por adición de las interferencias	
2.	Linealidad y Rango.....	36-43
2.1.1.	Definición	
2.1.2.	Ámbito de aplicación Valoración de contenido de principio activo	
2.1.3.	Uniformidad de contenido	
2.2.	Ámbito de aplicación	
2.3.	Procedimientos de determinación de la linealidad	
2.3.1.	Consideraciones generales	
2.3.2.	Evaluación estadística de la linealidad	
2.3.3.	Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen	
2.3.4.	Coefficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación ( $r^2$ )	
2.3.5.	Variación residual constante (homoscedasticidad)	
2.3.6.	Análisis de la Variancia: ANOVA	
2.3.7.	Test de proporcionalidad	



2.4. Comentarios y conclusiones	
3. Precisión.....	43-47
3.1. Definiciones	
3.2. Ámbito de aplicación	
3.3. Repetibilidad	
3.3.1. Repetibilidad del sistema instrumental	
3.3.2. Repetibilidad del método	
3.4. Precisión intermedia	
3.5. Reproducibilidad	
3.6. Comentarios y conclusiones	
4. Exactitud.....	48-54
4.1. Definición y generalidades	
4.2. Ámbito de aplicación	
4.2.1. Riqueza de un principio activo	
4.3. Criterios de aceptación	
4.4. Comentarios y conclusiones	
5. Limite de detección y Limite de cuantificación.....	54-56
5.1. Definición y generalidades	
5.2. Ámbito de aplicación	
5.3. Procedimiento de determinación del LD y LC	

#### CAPITULO IV:

1. Espectrofotometría.....	57-61
1.1. Definición	
1.2. Función	
1.3 Principio de la Espectrofotometría	
1.4. Ley de Beer	
1.5. Ley de lambert	
1.6. Ley de Bouguer-Beer-Lambert	
1.7. Transmitancia y absorción de las radiaciones	
1.8. Componente del espectrofotómetro	

#### CAPITULO V

1. Diseño metodológico.....	62-68
2. Resultados y Análisis de los resultados.....	69-77
3. Conclusión.....	78
4. Recomendaciones.....	79



CAPITULO VI

1. Anexos.....	80-85
1.1. Glosario	
1.2. Espectros	

CAPITULO VI:

1. Bibliografía.....	86-87
----------------------	-------



### Agradecimiento

- Agradezco a Dios y a la Virgen por haber permitido la realización de este trabajo monográfico.
  
- A mi familia por brindarme todo su apoyo y comprensión.
  
- Al laboratorio donde fue llevado a cabo la parte experimental de la tesis y en especial al equipo de Control de Calidad de dicha empresa, quienes me apoyaron a lo largo de este transcurso.
  
- Al Lic. Fernando Baca por su paciencia y enseñanzas.



### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo, el cual ha sido fruto de esfuerzo, dedicación y perseverancia a:

- Dios y la Virgen por estar siempre presente a lo largo de mi vida.
  
- A mi madre por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y por ser mi ejemplo y motivación a salir adelante.
  
- A mis familiares que ya no se encuentran conmigo pero que participaron en mi formación como persona.
  
- A mi tutor, el Lic. Fernando Baca quien ha sido una pieza muy importante en la realización de dicho trabajo monográfico.
  
- A mis maestros los que con entrega a su labor supieron transmitirme sus conocimientos a lo largo de mis estudios.



## **Introducción**

La validación garantiza la calidad del medicamento, puesto que le confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el medicamento cumpla con los parámetros de calidad establecidos.

Un medicamento se define como toda sustancia o mezcla de sustancias producida, vendida, puesta a la venta o recomendada para el tratamiento, el alivio, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, de un estado físico anormal o de los síntomas de una u otra, en el hombre, o al restablecimiento, la corrección o la modificación de funciones orgánicas en el hombre.

La industria farmacéutica consciente de su alta responsabilidad, actúa siempre buscando mejorar la calidad del medicamento a lo largo del proceso que lo crea. El objetivo es uno y es importante conseguirlo plenamente, esto es, el medicamento seguro, estable y eficaz, y la validación constituye un instrumento importante a este respecto.

Por otra parte los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de productos farmacéuticos ya que la validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. La validación además de verificar documenta su validez, esto es su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar con fiabilidad los métodos analíticos deben ser sometidos a un proceso de validación.

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.





### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Cómo realizar la Validación de la metodología analítica de una especialidad farmacéutica Famotidina 40 mg tabletas; por Espectrofotometría Ultravioleta Visible UV- Vis?



## **OBJETIVOS**

- **Objetivo General.**

Realizar la validación del análisis cuantitativo de Famotidina 40 mg tabletas, por el método de Espectrofotometría Ultravioleta Visible.

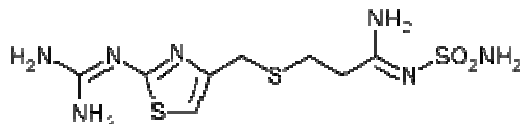
**Objetivos Específicos.**

1. Comprobar que el método de análisis por espectrofotometría UV-visible para Famotidina satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.
2. Evaluar las características de desempeño del método.
3. Elaborar un protocolo de validación que puede ser utilizado en futuras validaciones de métodos analíticos.



## Propiedades Organolépticas y Físico – Químicas de Famotidina.

### Estructura química:



**Nombre IUPAC sistemático:** 2-[4-[2-(amino-sulfamoilimino-metil) etilsulfanilmetil]-1,3-tiazol-2-il] guanidina.

### Sinónimos:

*N*-(aminosulfonil)-3-[[[2-[(diaminometileno) amino]-4-tiazolil]metil]tio]-propanimidamida.

**Fórmula química:** C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 337.449 g/mol

### Contenido<sup>16</sup>:

La Famotidina contiene no menos de 98,5 por ciento y no más de 101,0 por ciento de C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, calculado sobre la sustancia seca.

**Envase y almacenamiento** - Conservar en envases bien cerrados, resistentes a la luz.

**Sustancia de referencia** - Famotidina SR-FNA.

### Descripción de la Famotidina:

Es un fármaco derivado de la cimetidina, el anillo de imidazol es remplazado por un anillo de 2-guanidino-1,3-tiazol. Es 30 veces más activa que la cimetidina.

### Características organolépticas:

- Aspecto: polvo cristalino fino homogéneo.
- Color: blanco.
- Olor: característico.
- Sabor: ligeramente amargo.

---

16) (2000). Validation of Compendial Methods". En *United States Pharmacopeia* (págs. 2149-2152). E.E.U.U. 2149-2152



### **Solubilidad<sup>16</sup>:**

Fácilmente soluble en dimetilformamida y en ácido acético glacial; poco soluble en metanol; muy poco soluble en agua; prácticamente insoluble en acetona, alcohol, cloroformo, éter y acetato de etilo.

### **Identificación<sup>16</sup>**

**A** - Absorción infrarroja

**B** - Absorción ultravioleta

Solvente: solución reguladora de fosfato preparada del siguiente modo: ajustar 250 ml de ácido fosfórico 0,02 M con solución de hidróxido de sodio (1 en 10) a pH 2,5; diluir con agua a 500 ml y mezclar.

Concentración: 25 µg por ml.

Las absorptividades a 265 nm, calculadas sobre la sustancia seca, no difieren en más del 3,0 %.

### **Pérdida por secado:**

Secar a una presión entre 1 y 5 mm de mercurio a 80 °C durante 5 horas: no pierde más del 0,5 % de su peso.

**Residuo de ignición:** No más del 0,1 %.

**Valoración** - Disolver aproximadamente 250 mg de Famotidina, exactamente pesados, en 80 ml de ácido acético glacial y titular con ácido perclórico 0,1 N, empleando un sistema de electrodo anhidro apropiado. Cualquier solución acuosa del electrólito contenida en los electrodos empleados debe retirarse. El electrodo debe transformarse en anhidro y llenarse con perclorato de litio 0,1 N en anhídrido acético. Realizar una determinación con un blanco y hacer la corrección necesaria. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 16,87 mg de  $C_8H_{15}N_7O_2S_3$ .

---

16) (2000). Validation of Compendial Methods". En *United States Pharmacopeia* (págs. 2149-2152). E.E.U.U. 2149-2152



## Metodología Analítica.

### Métodos de análisis:

### Especialidad Farmacéutica:

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de Famotidina según su forma farmacéutica y farmacopeas oficiales.

Bibliografía	Forma Farmacéutica	Método de Análisis
Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXII)	Cápsulas	HPLC (Fase inversa)
	Tabletas	HPLC (Fase inversa)
Farmacopea Británica (BP 2009)	Cápsulas	HPLC (Fase inversa)
	Tabletas	Espectrofotométrico

### Propiedades fármaco terapéuticas de Famotidina.

Acciones sobre la secreción acida<sup>2</sup>

Los antihistamínicos H<sub>2</sub> compiten con la histamina de forma específica y reversible al nivel del receptor H<sub>2</sub> que es el encargado de estimular la producción de ácido por la célula parietal. Debido a que la histamina ejerce un efecto sinérgico sobre la secreción acida provocada por los restantes secretagogos, los antihistamínicos H<sub>2</sub> disminuyen parcialmente la producción de ácido clorhídrico desencadenada por la acetilcolina y la pentagastrina; debido a esta acción reducen la secreción acida basal y la provocada por los estímulos fisiológicos como los alimentos y la distensión gástrica.<sup>2,4</sup>

---

2 ) Flores J, A. J. (2004). *Farmacología Humana* . Barcelona: Masson.

4) Gilman, G. &. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mexico: MsGraw-Hill Interamericana.



Ninguno de los antihistamínicos H<sub>2</sub> afecta la concentración de pepsina en la secreción gástrica, pero al reducir el volumen total de jugo gástrico, la secreción absoluta de pepsinogeno queda disminuida y su activación reducida por el aumento en el pH intraluminal. La secreción del factor intrínseco esta disminuida, sin embargo, después de tratamientos prolongados con dosis elevadas, no existen problemas en la absorción de la vitamina B<sub>12</sub>. No modifican el vaciado gástrico, la secreción pancreática o la presión del esfínter esofágico superior.<sup>2</sup>

La velocidad de cicatrización de los procesos ulceroerosivos esofágicos y gastroduodenales esta en relación directa con la intensidad de la inhibición de la secreción acida. Los distintos antihistamínicos H<sub>2</sub>, aunque tienen potencias diferentes, consiguen a dosis máximas un nivel similar de inhibición de la secreción acida. La Cimetidina es el fármaco con menor potencia inhibitoria acida, la más potente es la Famotidina, mientras que la Ranitidina y la Nizatidina ocupan un lugar intermedio.<sup>2,4</sup>

Durante un tratamiento con Famotidina, el aumento de la dosis una vez logrado el máximo efecto inhibitorio, no conlleva a una mayor reducción de la producción de acido, sino a un incremento en la duración de sus efectos.<sup>2</sup>

### **Características farmacocinéticas**

La absorción por vía oral de los antihistamínicos H<sub>2</sub> es buena y, aunque existen grandes diferencias individuales, los niveles plasmáticos se obtienen 1-3 horas después de su administración. La administración con los alimentos no parece reducir su absorción, pero la ingesta concomitantes con antiácidos o sucralfato disminuye su biodisponibilidad entre el 10-30%. Se unen a las proteínas plasmáticas entre el 15-30%; la vida media de eliminación es muy similar en todos ellos, entre 1,5 y 4 horas. Atravesan bien las barreras orgánicas, encontrándose en el líquido cefalorraquídeo, la circulación fetal, y en la leche materna. Se eliminan por metabolismo hepático y por excreción renal. El aclaramiento renal de cualquiera de los antihistamínicos H<sub>2</sub> es 2 o 3 veces superior al de la creatinina, indicando que junto a la filtración glomerular coexiste una importante secreción tubular. Con excepción de la Nizatidina, el metabolismo hepático constituye la principal vía de eliminación de los antihistamínicos H<sub>2</sub> suministrados por vía oral.<sup>2</sup>

---

2 ) Flores J, A. J. (2004). *Farmacología Humana*. Barcelona: Masson.

4) Gilman, G. &. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapeutica*. Mexico: MsGraw-Hill Interamericana.



## Interacciones farmacológicas

Los antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> compiten con ciertos medicamentos, como la procainamida, para obtener acceso a la secreción tubular en los riñones. Todos estos agentes, con la excepción de la famotidina, inhiben el metabolismo de primer paso a nivel gástrico para el etanol, especialmente en mujeres.<sup>2</sup> Aunque la importancia clínica de esta interacción aún permanece en debate, es posible que la famotidina sea el único antagonista H<sub>2</sub> que no aumente la concentración sanguínea del etanol durante el consumo de licor.

Existe poca interacción demostrada entre la famotidina y otros medicamentos que utilizan la enzima citocromo P450 para su metabolismo, una interacción importante con otros antagonistas H<sub>2</sub> como la cimetidina.<sup>11</sup>

### Indicación, Dosis y vía de Administración

#### Úlcera gástrica y duodenal

Adultos: 40 mg / día, por vía oral al acostarse o dividido en dos dosis. Por vía IV, 20 mg cada 12 horas .Durante 6-8 semanas.

Niños de 1-16 años, 0,5 mg/kg/día, por vía oral al acostarse o dividido en dos dosis. Por vía IV. 0,25 mg/día, cada 12 horas .Dosis máxima en los niños: 40mg/día.

#### Reflujo gastroesofágico

Adultos: 20-40 mg, por vía oral cada 12 horas, durante 6-12 semanas.

Niños de 1-16 años: 1-2 mg/kg/día, por vía oral dividido en dos dosis, durante 6 semanas. Dosis máxima 40 mg/día .La dosis se individualiza según la respuesta y tolerancia del paciente.

#### Síndrome de Zollinger-Ellison

Adultos: 20 mg, por vía oral cada 6 horas. La dosis se individualiza según la respuesta y tolerancia del paciente.

---

2 ) Flores J, A. J. (2004). *Farmacología Humana* . Barcelona: Masson.

11) Katzung, B. G. (2007). *Basic & Clinical Pharmacology*. Chapter 63.



### **Reacciones adversas**

Sistema nervioso. Cefalea, mareos, astenia, fatiga, parestesia, convulsiones tónico clónicas , insomnio , somnolencia , depresión , desorientación , confusión , ansiedad , agitación , disminución de la libido y alucinaciones.

Dermatológicas: Acné, prurito, urticaria, piel seca y erupción cutánea.

Reacciones de sensibilidad: Anafilaxia angioedema, broncoespasmo, edema palpebral o facial, cogestión conjuntival, alopecia, muy raras veces necrosis epidérmica tóxica.

Renales: Incremento en las concentraciones del nitrógeno de urea. Aumento de la creatinina sérica. Ocasionalmente proteinuria.

Hepáticas: Incremento en la bilirrubina sérica total, transaminasas séricas, y en las concentraciones de fosfatasa alcalina. Raramente se reportó ictericia colestásica.

Sistema respiratorio: Neumonía adquirida en la comunidad.

Otras : Fiebre , hipertensión , rubor , dolor musculoesquelético , calambres musculares , artralgias , tinnitus , leucocitosis , leucopenia , neutropenia , pancitopenia , agranulocitosis , eosinofilia , arritmias cardíacas , palpitaciones.

### **Interacciones**

Las comidas y los antiácidos disminuyen su biodisponibilidad.

### **Precauciones y recomendaciones**

Reducir la dosis en un 50% en los pacientes con aclaramiento de creatinina inferior a 50 ml/min o prolongar el intervalo de administración hasta 36-48 horas .Ajustar la dosis en caso de alteración hepática .Utilizar con precaución durante el embarazo , utilizar el fármaco solo cuando esté debidamente justificado , y suspender la lactancia si se administra Famotidina a la madre.

### **Contraindicaciones**

En pacientes con hipersensibilidad conocida a la Famotidina u otros antagonistas H<sub>2</sub>.





## Generalidades de la validación

### 1. Validación de métodos analíticos

#### 1.1. Definición

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo: a) especificar e implementar, b) aprobar y c) documentar.

Veamos dos de las posibles definiciones de validación:

##### 1.1.1. Definición general

Según las Normas de Correcta Fabricación (3ª edición 99):

**Validación:** Obtención de pruebas con arreglo a las normas de Correcta Fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto.

##### 1.1.2. Definición analítica

Validación: Obtención de pruebas con arreglo a las normas de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

##### 1.1.3. Otros términos relacionados con la validación

**Cualificación:** El término validación se amplía a veces para incluir el concepto de cualificación y consiste en la operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos. (NFC, ed.99)

**Calibración:** conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia (NFCF, ef.99).

En resumen, los términos “validación, cualificación y calibración”, son conceptos que suele emplearse de forma indistinta, sin embargo conceptualmente son diferentes.

Validar es verificar que un método o proceso hace lo que tiene que hacer.

Cualificar es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (máquina, equipo, instrumento, etc.)

Calibración es una parte de la cualificación.

Por consiguiente se puede decir que los métodos deben ser validados y los aparatos deben ser cualificados.



Esta monografía se ciñe exclusivamente, a la validación prospectiva de métodos analíticos, ya que la validación retrospectiva (realizada en base al histórico obtenido a partir de un determinado procedimiento) no se recomienda en ningún caso.

## **1.2. Razones que justifican la validación de métodos analíticos**

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

Para iniciar la validación es necesario previamente:

- Tener perfectamente caracterizado el analito.
- Trabajar con una formulación definitiva (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición incluso a nivel de excipientes afectarán probablemente el procedimiento analítico.
- Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestro conocimiento a cerca de éste, nos ofrezca garantías de que la validación puede ser satisfactoria. Solo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello en el desarrollo previo del método, es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.

### **1.2.1. Métodos susceptibles a ser validados**

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación.
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características fármaco técnicas inherentes (Ej. Test de disolución).
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos.



### 1.3. Entorno legal

#### 1.3.1. Requerimientos para el registro

En el procedimiento o Registro Multiestado de Productos Farmacéuticos de la Comunidad Económica Europea, vigente en España desde 1986, se contempla la necesidad en los apartados IIC, IIE, IIF de la validación de los métodos analíticos utilizados. En el mismo documento se indica los siguientes respecto al “Informe de Experto” (parte II):

“El experto debe resumir los datos relativos a la validación de los métodos de análisis. Debe comentar la forma en que los controles propuestos garantizan las propiedades químicas, físicas y organolépticas”.

Además la FDA (Food and Drug Administration) requiere para el registro de nuevos productos que los métodos analíticos sean validados y debidamente documentados.<sup>3</sup>

#### 1.3.2. Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos

Las normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de la CEE en el capítulo 6 de Control de Calidad indican que los métodos de análisis deben estar validados (apartado 6.15). De igual forma las Good Manufacturing Practice de los EEUU indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.

#### 1.3.3. Farmacopeas<sup>1, 16</sup>

Validación frente a los Métodos Oficiales y/o de Farmacopeas:

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

- Principios activos de síntesis: Los métodos oficiales o de Farmacopea se considerarán validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquellos para los que fuera redactada la Monografía.
- Especialidades: No es recomendable considerar ningún método oficial o de Farmacopea totalmente validado para una especialidad, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción.

---

1) (1999). Validation of Analytical Methodology. En *British Pharmacopeia* (págs. 275-280).

16) (2000). Validation of Compendial Methods” . En *United States Pharmacopeia* (págs. 2149-2152). E.E.U.U. 2149-2152

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



En la USP24 (USP 24, 2000) aparece, en la sección de Información General, en el apartado (Validation of Compendial Methods” , 2000), que es de aplicación para métodos analíticos nuevos o revisados.

## 2. Organización: buenas prácticas de laboratorio

Para validar un método analítico se requiere en primer lugar un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan. La consecución de esta garantía de calidad requiere trabajar de acuerdo con una pauta correcta.

Los laboratorios de I+D, especializados en estudios no clínicos destinados al registro de medicamentos (de toxicología, farmacología, farmacocinética, etc.) fueron los primeros en establecer unas Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Las BPL surgieron para evitar deficiencias tales como experimentos sin protocolos previos, datos y resultados no supervisados o trazables, instrumentos y reactivos en condiciones inaceptables, muestras no representativas, personal no cualificado, etc. Frente a estas deficiencias las BPL preconizaban un sistema unificado de trabajo y de gestión que permitiera establecer comparaciones entre laboratorios diferentes, intercambiar información, la aceptación mutua de resultados y la resolución de conflictos.

Las primeras BPL fueron las de Estados Unidos en 1979 y en la actualidad son de aplicación general en todos los **laboratorios de I+D** que realizan estudios no solamente sobre medicamentos sino también sobre cosméticos, aditivos alimentarios, plaguicidas y productos químicos en general cuando afecten a temas de salud humana, animal o medio ambiente. En España las BPL están reguladas por Reales Decretos, 822/1993 del 18 de mayo y el 2043/1994 del 14 de octubre, y anexos a dichos Reales Decretos.

La filosofía de las BPL se ha extendido también a los **laboratorios de ensayo** de los sectores químico, agroalimentario, etc. y a los **laboratorios de control de calidad** de la Industria Farmacéutica y Biosanitaria. La Guía de de Normas de Correcta fabricación de Medicamentos de la CEE, desde su primera edición, dedica un capítulo a la Buenas Prácticas del Laboratorio de Control (BPLC) que, conceptualmente, son muy afines a las BPL.

Las áreas de trabajo bajo normas BPL son:

- a) Organización y personal del laboratorio
- b) Instalaciones
- c) Cuidado, alojamiento y confinamiento de los elementos utilizados en los sistemas experimentales biológicos.
- d) Aparatos, materiales, reactivos, especímenes.
- e) Sistemas experimentales
- f) Productos de referencia y muestras de ensayo
- g) Documentación
- h) Archivos: almacenamiento y conservación de registros
- i) Verificación de estudios



## j) Inspecciones

A continuación se comentan algunos de estos aspectos.

### **2.1. Organización y personal**

Es uno de los factores más importantes a la hora de asegurar la calidad del análisis. El laboratorio debe disponer de suficiente personal técnico, bien organizado y dirigido para que puedan efectuarse los estudios en un tiempo razonable y sin sobresaltos, se manera que existan las condiciones apropiadas para poder efectuar las tareas de preparación, formación, supervisión, calibración, validación, etc. actividades en suma que podrían denominarse de “prevención de errores”. Una de las causas más importantes de obtención de resultados erróneos es el apresuramiento, para evitarlo es necesario establecer una planificación de los controles y análisis que se han de realizar.

El personal debe poseer unos conocimientos y una preparación adecuados al tipo de estudios que vayan a realizar, así como experiencia en las técnicas a emplear, de lo contrario deberá recibir la adecuada formación.

### **2.2. Instalaciones**

Las instalaciones del laboratorio, tanto interiores como exteriores, deben reunir las condiciones idóneas en cuanto a dimensiones, construcción, diseño y ubicación para poder realizar los estudios de forma correcta.

Por ejemplo, su diseño debe permitir la correcta disposición entre las sustancias químicas o biológicas existentes y el flujo de los materiales para que no puedan confundirse. Deben existir procedimientos de control y supervisión de las condiciones ambientales en las zonas crítica, como pueden ser los estabularios.

### **2.3. Aparatos, reactivos, material y especímenes**

#### **2.3.1. Aparatos**

El laboratorio debe disponer de instrumentos en cantidad suficiente y de capacidad adecuada para responder a las exigencias de los ensayos que se realizan. Se deben mantener limpios y en buen funcionamiento para obtener resultados fiables. Con este fin se realizarán las comprobaciones, calibraciones y cualificaciones de los equipos e instrumentos de medición (incluidos los sistemas informáticos)

La cualificación requiere que los equipos sean instalados correctamente e inspeccionados, limpiados, conservados, comprobados y calibrados periódicamente, según procedimientos escritos. Estos Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) describirán con suficiente detalle las instrucciones de funcionamiento, los métodos, materiales y programas a realizar en los aparatos. También se indicará la persona responsable de cada operación.



Debe mantenerse un registro de las diferentes operaciones que se realicen en el equipo o instrumento, ya sean de funcionamiento, mantenimiento, limpieza, calibración o cualificación. Estos registros es recomendable archivarlos durante un período de tiempo no inferior a 5 años.

Los diversos PNT's, los registros de comprobación y una copia del manual de instrucciones deben estar localizables a disposición del analista.

### 2.3.2 Reactivos

Los **reactivos** químicos deben ser preparados por personas calificadas y según procedimientos descritos en la Farmacopeas u otros procedimientos aprobados.

En la etiqueta de los reactivos es conveniente hacer constar:

- origen
- identificación de la sustancia
- concentración
- condiciones de conservación
- fecha de preparación
- seguridad
- fecha de caducidad
- analista

Deben guardarse registros (libre de laboratorio) de cada preparación y procesos de estandarización.

El agua es el disolvente más utilizado tanto en la preparación de reactivos como en los análisis por lo que debe controlarse adecuadamente mediante análisis físico-químicos y microbiológicos.

### 2.3.3. Material y especímenes

El **material** es vidrio en la mayoría de los análisis y se tiende erróneamente a dar por supuesta su idoneidad. Esto puede extenderse a materiales de porcelana, cuarzo, plástico y metálicos. Los errores a causa de estos materiales pueden ser debidos a:

Suciedad o contaminación: tras su limpieza hay que considerar la posibilidad de que queden residuos contaminantes de utilizations anteriores y/o detergentes. En algunos casos se requiere la utilización adicional de disolventes orgánicos o mezcla crómica. Se recomienda un aclarado final con agua purificada y/o alcohol.

Defectos del material: la exactitud del material volumétrico (buretas, pipetas y matraces aforados) tiene una gran influencia en el resultado de los análisis. Por tanto, debe calibrarse y contrastarse a su recepción y periódicamente, desechando el que no cumpla las especificaciones.



En el análisis de concentraciones muy bajas de analito (por ejemplo en bioanálisis, validaciones de limpieza y validaciones de impurezas) es recomendable el uso de material desechable.

Los **especímenes** se identificarán por sistema experimental, estudio, naturaleza y fecha de muestra.

#### **2.4. Sistemas experimentales**

Son estudios realizados en el laboratorio a partir de sistemas químicos y físicos, celulares, microbianos y vegetales o animales.

- Sistemas físicos y químicos: la instrumentación empleada para la obtención de datos deben estar correctamente situada, diseñada y dimensionada. Se podrán utilizar sustancias de referencia para verificar estos sistemas experimentales. En los sistemas automatizados, los datos generados se tratarán como datos primarios y se archivarán.
- Sistemas biológicos: Para asegurar la calidad de los datos que nos proporcionen estos sistemas, se crearán y mantendrán unas condiciones apropiadas de alojamiento, cuidado, y confinamiento de los mismos. Se registrará la recepción, manejo, alojamiento/confinamiento, cuidado y evaluación de la salud. Además se generarán registros de los exámenes, medidas de cuarentena, morbilidad, mortalidad, comportamiento, diagnóstico y tratamiento de los sistemas experimentales. Se realizará también una adecuada eliminación de residuos y desechos al finalizar los ensayos.

#### **2.5. Productos de referencia y muestras de ensayo**

Todos ellos deben presentar protocolos de preparación, manipulación y almacenaje. Además se ha de registrar una serie de datos como son la recepción, la toma de muestras, la utilización y el almacenamiento. Se etiquetarán debidamente y se llevará un registro sobre su identidad, pureza, composición, estabilidad, trazabilidad, así como de posibles impurezas.

Se puede encontrar diferentes tipos de productos de referencia y de ensayo:

- Procedentes de proveedores externos
- Patrones de referencia primarios originales (USP, EP, etc.)
- Patrones de referencia secundarios de trabajo (working standards)
- Mezclas o diluciones que se preparan en el laboratorio

Las muestras de ensayo deben ser representativas y obtenidas según procedimientos de muestreo escritos y aprobados, que deberán incluir los agrupamientos, y tratamientos previos al análisis. La identificación debe ser clara e indeleble con indicación del nombre o descripción, lote, fecha, número de envase al que corresponde, etc.



## 2.6. Documentación. Procedimientos escritos

Los documentos, procedimientos y especificaciones escritas constituyen un elemento indispensable para el correcto del laboratorio, debiendo existir:

Los PNT que recojan las instrucciones necesarias para el trabajo de laboratorio:

Procedimientos generales (toma de muestras y su tratamiento, limpieza, seguridad e higiene, verificación de resultados de autoinspección, circuitos de documentación, validación de procedimientos, etc.)

Procedimientos para funcionamiento, calibración y mantenimiento de aparatos.

Métodos de análisis y especificaciones:

En ellos se incluyen los métodos de control de materias primas, materiales de acondicionamiento, controles en proceso, productos intermedios y acabados.

Por ejemplo, en un laboratorio de control de calidad, estos procedimientos constan de una serie de ensayos analíticos habitualmente clasificados en tres grupos principales; ensayos de identificación, ensayos de pureza y ensayos de determinación cuantitativa.

Cada uno de estos ensayos analíticos comprende una serie de apartados:

- \* Objetivo
- \* Material y reactivos
- \* Sustancias de referencia
- \* Instrumentación
- \* Procedimiento detallado de su realización, incluyendo preparación de la muestra, condiciones instrumentales y número de repeticiones
- \* Verificación de idoneidad de las condiciones operatorias definidas
- \* Fórmulas para el cálculo de resultados y su tratamiento estadístico si es necesario
- \* Bibliografía y referencias

Libretas de laboratorio u hojas de trabajo:

- Son los documentos que recogen los datos primarios obtenidos durante el desarrollo de un método analítico. En la práctica, estos documentos permiten auditar la ejecución y trazabilidad del análisis.
- Registros de resultados:  
La mayoría de los instrumentos proporciona un registro impreso: balanzas, espectrofotómetros, cromatógrafos, etc. Éstos deben conservarse anexos a las libretas de laboratorio u hojas de trabajo.
- Seguimiento de resultados:

Para los análisis de rutina conviene efectuar tabulaciones de resultados por producto manera que sea posible la revisión a lo largo del tiempo y la detección de tendencias.





Herramientas informáticas actuales como los LIMS (Laboratory Information Management System) facilitan la ejecución de esta tarea.

- Informe final:  
En el caso de estudios se elaborará un informe final donde se recogerán los datos primarios, gráficas, tablas, etc. En el caso de controles de rutina se recogerán los resultados en un boletín de análisis. Además de lo anterior aparecerá la siguiente información.
  - \* Identificación de las muestras
  - \* Referencia del método de análisis
  - \* Especificaciones con sus límites de aceptación
  - \* Resultados obtenidos
  - \* Conclusiones
  - \* Fecha de inicio y final de los análisis y firma de los analistas y del supervisor que han intervenido en su realización

### **2.7. Archivo de documentos**

Debe proporcionarnos una disponibilidad inmediata de la documentación de uso diario en un plazo razonable de tiempo. Sólo podrá acceder a éste personal autorizado. El sistema de archivo debe permitir conservar durante el tiempo establecido la documentación analítica.

### **2.8. Verificación de los resultados**

Debe existir un procedimiento para la verificación por el analista de los resultados obtenidos sobre la muestra, su registro y su inclusión en el boletín de análisis. El supervisor debe revisar, firmar y fechas estos resultados

Cuando se utilicen sistemas informáticos deben validarse para garantizar su seguridad frente a errores de funcionamiento o manipulación. También considerarse aspectos de confidencialidad.

### **2.9. Autoinspección**

Un programa de autoinspecciones o auditorías internas con personal de la propia sección de trabajo o secciones afines, conduce a una crítica abierta y constructiva sobre todas las actividades del laboratorio, con consecuencias positivas a todo el nivel puesto que:

- Responsabiliza y motiva a todo el personal en la filosofía de las BPL
- Ayuda a seguir los procedimientos correctamente.
- Propone una serie de cambios o mejoras en la calidad del trabajo realizado, siendo un instrumento importante para actualizar procedimientos y estimular la innovación.



### 3. Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación

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

#### 3.1. Definición de las características de practicabilidad

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

#### 3.2. Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método con la robustez.

La estabilidad de las disoluciones de la muestra (CDER, 94) después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización. Muchos laboratorios utilizan equipos automáticos que procesan muestras durante largos períodos de tiempo, con lo que la muestra puede permanecer horas preparada antes de ser analizada. De la misma forma debe demostrarse la estabilidad de las muestras y patrones preparados si se utilizan durante varios días.

#### 3.3. Puesta a punto. Característica de idoneidad

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

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

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



### 3.4. Características de fiabilidad

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

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

- a) La capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación excipientes u otras sustancias presentes en la muestra, se relaciona con el término selectividad.

Selectividad: capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra

- b) La proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta del instrumento. Este concepto se relaciona con los términos linealidad y rango.

Linealidad: se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Rango: se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método.

- c) La dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio o central, es decir el “más o menos” de un procedimiento analítico se relaciona con el término precisión.

Precisión: Es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede estudiar a tres niveles:

Repetibilidad: Evalúa la precisión del método (precisión intraensayo).

Precisión intermedia: Evalúa la precisión frente a variaciones de analista, equipo y día (precisión intralaboratorio o precisión interensayo).

Reproducibilidad: Evalúa la precisión entre laboratorios (precisión interlaboratorios).



- d) La diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor verdadero. Concepto relacionado con el término exactitud.

Exactitud: expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.

- e) La cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo está relacionada con los términos límite de detección y límite de cuantificación.

Límite de cuantificación: se define como la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión. Este parámetro tiene sentido y especial interés en la determinación de concentraciones bajas de analito.

Límite de detección: se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud.

El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo, pudiendo resumirse en la siguiente tabla recomendada en la guía ICH Q2A

Tabla 1 Datos requeridos para la validación de métodos analíticos<sup>7</sup>

Parámetros	Identificación	Impurezas		Valoración: -Disolución <sup>(5)</sup> -Contenido
		Cuantitativo Sí	Test límite No <sup>(4)</sup>	Sí
Exactitud	No	Sí		
Precisión:				
Repetibilidad	No	Sí	No	Sí
Precisión intermedia	No	Sí <sup>(1)</sup>	No	Sí <sup>(1)</sup>
Selectividad <sup>(2)</sup>	Sí	Sí	Sí	Sí



Límite detección	No	No <sup>(3)</sup>	Sí	No
Límite cuantificación	No	Sí	No	No
Linealidad	No	Sí	No	Sí
Rango	No	Sí	No <sup>(4)</sup>	Sí

Notas:

- (1) En los casos que se realiza la reproducibilidad no es necesario realizar la precisión intermedia.
- (2) La falta de selectividad de un procedimiento analítico puede ser compensada por otros procedimientos.
- (3) Puede ser necesario en algunos casos
- (4) Puede ser requerido según el método de acuerdo a USP 24
- (5) USP 25 sólo considera el estudio de la precisión en los ensayos de comprobación de características (test de disolución). Los otros pueden ser requeridos.

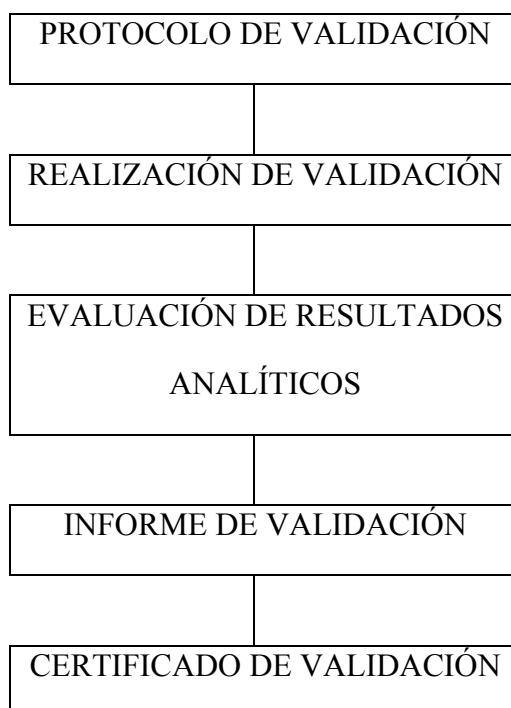
---

7) Q2A, I. (s.f.). Validation and of Analytical Methods. *ICH Harmonised Tripartite Guideline* .



#### 4. Documentación de la validación

Toda validación comienza a partir de un método ya probado y ajustado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas. Dicha demostración debe ser siempre documentada de acuerdo al siguiente esquema:



##### 4.1. Protocolo de validación

Se trata de un documento que ha de recoger el objetivo, la definición del sistema a validar, la identificación de los parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto y método, debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación.

El esquema de un protocolo de validación puede incluir los puntos siguientes:

**Objetivo:** Exposición de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.

**Responsables:** Relación de las personas que llevarán a cabo la validación y de las que la aprobarán.



Parámetros a estudiar: Los parámetros a estudiar se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.

Muestras: El muestreo se realizará de acuerdo con procedimientos escritos, en los cuales se indicarán los sistemas de identificación y tratamiento previo de las muestras. Si se precisan placebos, también existirán procedimientos del método de preparación.

Equipos: Se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación (pH-metros, balanzas, cromatógrafos, etc.), y comprobar que están convenientemente cualificados, referenciando estos datos en el informe de validación.

Métodos analíticos: Existirán métodos escritos describiendo el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnica y cálculos.

Criterios de aceptación: Se establecerán a priori para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

#### **4.2. Realización de la validación y evaluación de los resultados**

Todos los datos primarios deben ser perfectamente auditables. Una vez realizada la parte experimental de la validación se evaluarán los resultados obtenidos. Si durante la ejecución del protocolo se produce alguna modificación se añadirá como un anexo al mismo explicando el cambio introducido respecto al original y la razón que lo justifica.

#### **4.3. Informe de validación**

Los informes de validación deberán incluir:

- a) Referencia al protocolo en el cual se describe el procedimiento para la determinación de cada uno de los parámetros a evaluar.
- b) Resultados de las determinaciones de cada parámetro incluyendo todos los datos primarios.
- c) Referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados y resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad antes de iniciar el estudio de validación.
- d) Discusión de los resultados y conclusiones. Se indicará la aceptación o no de la validación del método analítico. También se puede aceptar un método analítico con limitaciones para un tipo de muestras concreto.



#### 4.4. Certificado de validación

El certificado de validación o documento formal de aprobación que emite el laboratorio con los resultados obtenidos para cada parámetro, debe ser firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe.

#### 4.5. Archivo

Los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante todo el tiempo de vida del producto.

#### Parámetros a estudiar

##### 1. Selectividad

###### 1.1 Definición

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

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

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

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

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.

###### 1.2 Ámbito de aplicación

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa





influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos. No obstante se pueden utilizar métodos poco específicos (por ejemplo potenciométricos o espectrofotométricos) si existen métodos complementarios que demuestren la ausencia de sustancias que puedan interferir. De hecho es muy difícil declarar que no existe interferencia en la determinación de un analito porque siempre existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, hasta el momento desconocida, que interfiera. También se puede dar el caso contrario, de hallar alguna posible interferencia que en la práctica diaria sea improbable que se produzca.

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

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

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

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

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

### **1.2.1 Según objetivo del ensayo**

#### **1.2.1.1 Identificación**

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



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

#### **1.2.1.2. Ensayos de pureza**

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

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

#### **1.2.1.3 Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo**

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

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

### **1.3. Procedimientos de determinación de la selectividad**

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

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder la demostración documental de la selectividad del método.

#### **1.3.1. Por adición de las interferencias**

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos para los que se tienen identificadas las posibles interferencias y éstas se encuentran disponibles de forma aislada. En estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de dichas



interferencias. Se evaluará a que nivel se producen y si es preciso modificar el método o añadir alguna técnica complementaria.

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

<b>Determinaciones para la forma farmacéutica</b>	<b>Determinaciones para la materia prima</b>
Matriz <sup>1</sup>	Blanco
Analito <sup>2</sup>	Analito <sup>2</sup>
Matriz + Analito	Otras sustancias similares <sup>9</sup>
Matriz + Analito + Impurezas (Disolventes Residuales, Trazas Metálicas) + Productos de Degradación... <sup>4</sup>	Analito, Productos de Degradación + Impurezas (Disolventes Residuales, Trazas Metálicas, Reactivos de Síntesis)... <sup>4</sup>

Nota:

1. Entendida como todo aquello que acompaña el analito de interés. La cantidad de matriz sobre la que se realizará el análisis será equivalente a la fracción que se tomaría en una aplicación rutinaria del método. En el análisis de la matriz ninguno de los componentes debería dar, de forma ideal, una respuesta cuantificable para descartar posibles interferencias por su parte.
2. El analito a comprobar corresponderá al 100% de la concentración de trabajo. Es el punto de referencia.
3. Especialmente en métodos de identificación es susceptible comprobar el carácter discriminatorio del ensayo si se aplica sobre otros productos de composición similar por los que pudiera ser confundido (ej. Una sal sódica por una potásica o cálcica).
4. Las impurezas y productos de degradación que se adicionen corresponderán a los niveles máximos aceptados en el producto en cada caso. Otro aspecto a considerar es la determinación de muestras donde el analito puede encontrarse de diferentes formas: unido/libre, inorgánico/organometálico, diferentes estados de oxidación. Puede ser de interés el análisis de las impurezas por separado.

La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés (ej. Conservantes) y las interferencias a su límite máximo establecido. En caso de que se observen interferencias, su nivel puede evaluarse a partir del análisis de seis replicados y el grado de discrepancia entre las determinaciones en presencia o ausencia de las posibles interferencias.



## 2. LINEALIDAD Y RANGO

### 2.1 Definición

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. Por ejemplo en algunos procedimientos como en los inmunoensayos la respuesta del método no suele ser lineal pero sí proporcional a la concentración. En estos casos son válidos otros ajustes matemáticos.

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

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

### 2.2 Ámbito de aplicación<sup>7</sup>

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

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

#### 2.2.1 Valoración del contenido de principio activo<sup>7-9</sup>

En la especialidad farmacéutica los límites de especificaciones suele establecerse entre 95-105% a liberación, 90-110% a caducidad, respecto al valor nominal. En materia prima los límites son 98-102% o 99-101%. Debido a esto se suele evaluar la linealidad de los métodos en un rango más amplio, las ICH recomiendan del 80-120%

---

7) Q2A, I. (s.f.). Validation and of Analytical Methods. *ICH Harmonised Tripartite Guideline* .

8) ICHQ2B. (s.f.). Validation of Analytical Procedures. *Harmonised Tripartite Guideline* .

9) ICH 3AQ22a: ICH Harmonised Tripartite Guideline. (s.f.). *Guideline of Herbal Remedies* .



## 2.2.2 Uniformidad de contenido

Puesto que los límites habituales de especificaciones son 85-115% suele evaluarse la linealidad entre el 70-130%. En el caso de que el procedimiento analítico para el análisis del contenido y el de uniformidad coincidan, puede aprovecharse el mismo rango y evaluar la linealidad una sola vez entre el 70-130%.

## 2.3 Procedimientos de determinación de la linealidad

### 2.3.1 Consideraciones generales

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado ( $K=5$ ,  $n^{\circ}$  de replicas = 3) con un total de 15 determinaciones ( $n=15$ ) Por ejemplo; 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico.

Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarla en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.

- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja a niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas.

Las muestras a analizar pueden prepararse a partir de estándares de analito de concentración conocida, o bien a partir de un lote de concentración conocida de la especialidad terminada. De esta última forma el estudio de linealidad puede servir también para evaluar la recuperación y con ella la exactitud del método.

- El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento analítico a validar.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones  $x$  (variable independiente o predictiva), y la respuesta  $y$  (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y = b \cdot x + a$ , obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). En algunos casos podría ser necesaria alguna transformación matemática previa (uso de logaritmos, recíprocos de las variables, etc.) para obtener funciones lineales.



La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).

### 2.3.2 Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las fórmulas que se pueden aplicar son las siguientes:

Ecuación de la recta	$y = b \cdot x + a$
Valor estimado para $x_i$	$\hat{y}_i = b \cdot x_i + a$
Valor residual	$E_i = \hat{y}_i - y_i$  $i$ grupos

Término independiente	Pendiente
$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b\sum x}{n}$	$b = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sum(x-\bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$
Coeficiente de correlación	
$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right]}}$	
Coeficiente de determinación	



$r^2 = SC_{REG}/SC_T$
Cálculo de la variancia residual
$S^2_{y,x} = \frac{\sum(y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum(x - \bar{x})^2}}{n-2} = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n-2} =$ $\frac{\sum(y - \bar{y})^2}{n-2} (1 - r^2) = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2} = \frac{\sum e_i^2}{n-2}$
Cálculo de la variancia de la pendiente
$s_b^2 = \frac{s_{xy}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$
Cálculo de la variancia del término independiente
$s_a^2 = s_b^2 * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{s_{xy}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{s_{xy}^2}{\sum(x - \bar{x})^2} * \frac{\sum x^2}{n}$

Análisis de la variancia: ANOVA

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Variancia (V)	
Regresión	$SC_{REG} = \sum n_i (n_i (\hat{y} - \bar{y}))^2$	1	$V_{REG}$	$F_1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$
Falta de ajuste	$SC_{FA} = \sum n_i (n_i (\bar{y} - \hat{y}_1))^2$	k-2	$V_{FA}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}}$



Error experimental	$SC_{EXP} = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i n_i - k$	$V_{EXP}$	
Total	$SC_T = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$	$\sum_i n_i - 1$		

Donde:

$i$  = grupos

$j$  = series

$\bar{x}$  = media de x

$\bar{y}$  = media de y

$SC_{REG}$  = suma de cuadrados debido a la regresión

$V_{REG}$  = variancia de la regresión

$SC_{RES}$  = variación residual debida al error experimental dentro de los grupos más la

Variación debida a la falta de ajuste.

$V_{RES}$  = variancia residual

$SC_{EXP}$  = cálculo del error experimental (suma de cuadrados debido a las réplicas dentro de las series

$V_{EXP}$  = variancia del error experimental

$SC_{FA}$  = cálculo del error de regresión o de falta de ajuste (se debe a la dispersión de

Resultados entre los valores de la recta de regresión y las medias de cada Grupo.

$SC_T$  = suma de cuadrados total

$V_T$  = variancia total entre series

- Relación entre suma de cuadrados  
 $SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$





$$SC_{RES} = SC_{EXP} + SC_{FA}$$

$$\sum \sum (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum \sum (y_{ij} - \hat{y})^2 + \sum n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

$$SC_T \qquad \underbrace{SC_{EXP} \quad SC_{FA}} \qquad SC_{REG}$$

- Relación entre suma de cuadrados y variancias:  
 $V = SC/gl$

### 2.3.3 Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen

En la recta de regresión  $y=b*x+a$ , **x** es la concentración, **y** la respuesta, **b** el valor de la pendiente y **a** el término independiente.

La pendiente **b** se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El término independiente **a**, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

### 2.3.4 Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>)

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable **x** (concentración), y la variable **y** (respuesta). Su valor máximo es 1. Si **r** es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0.999$ , aunque en el caso de impurezas se admite  $\geq 0.990$ .

La información obtenida mediante cálculo de **r** es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo **r<sup>2</sup>** coeficiente de determinación el aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de **y** explicada por el modelo.

### 2.3.5. Variancia residual constante (homoscedasticidad)

La representación de los residuales **e<sub>i</sub>** aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar



los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no relejar ninguna tendencia.

### 2.3.6 Análisis de la Variancia: ANOVA

Para poder realizar una ANOVA, se deben cumplir los siguientes supuestos:

- a) Homogeneidad de variancias
- b) Normalidad de los residuales

- a) Homogeneidad de variancias

La homogeneidad de variancias se puede comprobar aplicando, por ejemplo, un test de Cochran que indicará si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Estadísticamente sería más correcto normalizar previamente las respuestas, ya que de lo contrario se comparan coeficientes de variación que corresponden a medias de concentración diferentes entre sí. De todas formas es habitual efectuar el test sin cumplir este requisito cuando el intervalo de concentraciones no es excesivamente amplio.

### 2.3.7. Test de proporcionalidad

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor normal.

Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación **t** de Student (n-2 grados de libertad,  $\alpha=0.05$ ):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|a|}{s_a} \quad S_a \text{ se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual } s_{y,s}^w$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido.

En los intervalos de confianza ( $\pm S_a$ ) debe estar incluido el cero.

En caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre al menos dos estándares, uno superior y otro inferior. De esta forma se obvia el sesgo del método.



## 2.4. Comentarios y conclusiones

Generalmente no es necesario efectuar todos los test estadísticos relacionados con la linealidad. Los de carácter obligatorio son:

Ecuación de la recta de regresión

- Representación gráfica de la recta de regresión y de los resultados experimentales
- Coeficiente de correlación  $r$  y de determinación  $r^2$
- Características de la variancia residual
- Análisis de la variancia (significación de la pendiente y linealidad) comprobando que se cumplen los supuestos de homogeneidad de variancias y normalidad de residuales.

El test de proporcionalidad también aporta información adicional sobre el sesgo del método, lo cual es muy útil a la hora de evaluar su capacidad para ser empleado en el análisis de trazas.

## 3. PRECISIÓN

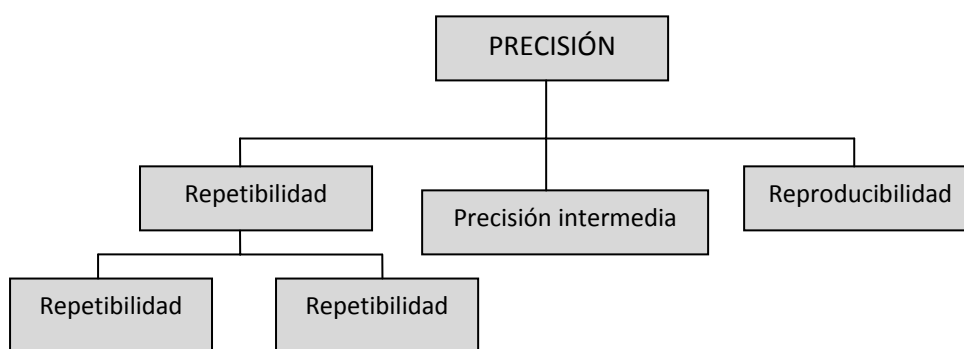
### 3.1. Definiciones

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:





**Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto.

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

**Reproducibilidad:** estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

S = desviación estándar

$\bar{x}$  = media aritmética de los resultados

En la tabla 1 (Huber, 1999) se resumen los factores que pueden o no pueden variar en el estudio de la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Tabla 1. Variación de factores en el estudio de la precisión<sup>6</sup>.

	<b>Repetibilidad</b>	<b>Precisión Intermedia</b>	<b>Reproducibilidad</b>
Instrumento	igual	diferente	diferente
Día de análisis	igual	diferente	diferente
Analista	igual	diferente	diferente
Otros factores (p.ej. reactivos)	igual	diferente	diferente
Laboratorio	igual	Igual	diferente

6) L, H. (1999). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Illinois: Interpham Press.



### 3.2. Ámbito de aplicación<sup>8</sup>

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

#### 3.3. Repetibilidad

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

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Así por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas (por ejemplo impurezas). Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis. El número de replicados se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método.

##### 3.3.1. Repetibilidad del sistema instrumental

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

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

##### 3.3.2. Repetibilidad del método

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

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras)

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

---

8) ICHQ2B. (s.f.). Validation of Analytical Procedures. *Harmonised Tripartite Guideline* .



### 3.4. Precisión intermedia

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. (ver tabla 1). No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Para estudiar los factores de una manera aleatoria se recomienda un estudio matricial y, para cada combinación de éstos, las muestras deben ser preparadas independientemente como mínimo por triplicado.

A continuación se propone un modelo de un diseño experimental (ejemplo 4) donde se estudia la variación de los factores; día de análisis, analista e instrumento. En este modelo se presenta el caso particular de determinar la variación de los resultados obtenidos al considerar dos analistas, dos instrumentos y realizando el análisis tres días diferentes.

#### Ejemplo 4. Precisión intermedia

Instrumento A	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento B	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente.

Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cual es el factor responsable de esta variabilidad. Se recomienda, además, determinar el coeficiente de variación para cada grupo de análisis para comprobar que se cumplen las especificaciones establecidas en la repetibilidad del método.



### 3.5. Reproducibilidad

La reproducibilidad estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método (ver tabla 1).

Estas condiciones operativas y ambientales diferentes (Huber, 1999) pueden ser<sup>6</sup>:

- Humedad y temperatura ambiental diferente
- Analistas con diferente experiencia
- Instrumentos de características diferentes
- Variaciones de condiciones instrumentales
- Variaciones de detalles experimentales no especificadas en el método
- Equipos y fungibles de diferente antigüedad
- Disolventes y reactivos de diferente calidad

Este estudio es necesario si se pretende realizar el método en diferentes laboratorios o si se quiere estandarizar un procedimiento analítico, por ejemplo para incluirlo en las Farmacopeas.

### 3.6. Comentarios y conclusiones

La precisión estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. La precisión se determina con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, y se expresa dando el valor medio obtenido junto con el más-menos de la variabilidad de los resultados.

Los resultados obtenidos en la repetibilidad instrumental dependen del instrumento, por ejemplo no se puede obtener el mismo coeficiente de variación en un equipo con inyección automática que con inyección manual.

La repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra. Es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad del método aumente.

El parámetro de la reproducibilidad no es de obligado cumplimiento y se debe realizar solamente en aquellos casos en que se quiera transferir el método a otros laboratorios o incluirlo en guías oficiales.

---

6)L, H. (1999). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Illinois: Interpham Press.



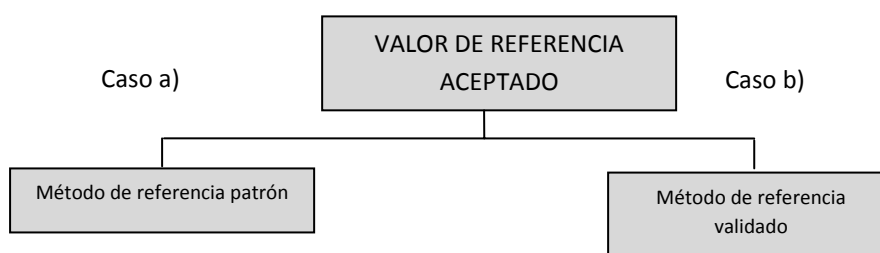
## 4. EXACTITUD

### 4.1 Definición y generalidades

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

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

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿cuál es el valor verdadero del analito en la muestra? Por desgracia el valor verdadero en muchos casos se desconoce como, por ejemplo, en la industria alimentaria debido a la gran variedad de matrices posibles y que prácticamente no existen patrones de referencia certificados por organismos oficiales. No obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados (caso a, Figura 1), el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón (caso 1.1.) o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón (caso a.2 y a.3). También se acepta la comparación de los resultados con método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud (caso b, Figura 1); entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.



- 1) Principio activo (analito puro)
- 2) Placebo cargado con el analito
- 3) Muestra problema cargada con el analito

**Figura 1.** Concepto de valor de referencia aceptado





#### 4.2 Ámbito de aplicación<sup>7</sup>

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

Según la USP 24 también debe evaluarse la exactitud en los métodos de análisis de estudios de velocidad de disolución.

#### 4.3 Procedimientos de determinación de la exactitud<sup>16</sup>

La exactitud debe demostrarse en todo el rango para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones x 3 niveles de concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- 1) Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.
- 2) Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel
- 3) Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20% a Q+20%; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada período de tiempo se aplicaría ( $\pm 20\%$ ).

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza (ver Figura 2).

<p>Porcentaje de recuperación (<math>R</math>) = <math>\frac{X_m}{\mu} * 100</math></p> <p>Diferencia = <math>X_m - \mu</math></p> <p>Donde:</p> <p><math>X_m</math> = valor medio hallado</p> <p><math>\mu</math> = valor aceptado como verdadero</p>
--

**Figura 2.** Expresión matemática de la exactitud

7) Q2A, I. (s.f.). Validation and of Analytical Methods. *ICH Harmonised Tripartite Guideline* .

16) (2000). Validation of Compendial Methods” . En *United States Pharmacopeia* (págs. 2149-2152). E.E.U.U. 2149-2152



### **4.3.1 Riqueza de un principio activo**

#### **4.3.1.1 Aplicación del método analítico a una muestra de riqueza conocida**

Para evaluar la riqueza de un principio activo o de una materia prima es habitual la utilización de un método absoluto, por ejemplo una valoración ácido-base. En este caso para demostrar la exactitud del método puede valorarse un patrón de referencia de concentración conocida y se compara el valor hallado con el valor verdadero conocido. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, en muchos casos no existen patrones de referencia certificados por un organismo oficial, como los patrones del NIST (National Institute of Standards and Technology) o los suministrados por las diferentes Farmacopeas (EP, USP standards BP standards). Entonces la evaluación de la exactitud puede llevarse a cabo por la comparación con un método de referencia validado como se describe más adelante.

### **4.3.2 Determinación cuantitativa de un analito en un producto acabado**

El enfoque es similar al que se plantea para evaluar la exactitud de un método para la riqueza de un principio activo pero en este caso se trabaja sobre el producto acabado.

#### **4.3.2.1 Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida**

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición de patrón sobre el problema.<sup>12</sup>

---

12) J, M. G. (May 1996). "A Practical Guide to Analytical Method Validation" . *Analytical Chemistry News & Features* , 305-309 A. .



- a) **Método del placebo cargado.** Se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. El ensayo de recuperación se realiza como mínimo con 3 replicados para cada nivel. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación (Green, 1996; Carr, 1990; Mehta 1989)<sup>12-13</sup>. El problema del método del placebo cargado está en como se introduce el analito sobre el placebo. El proceso de adición, por mucho que simule lo más exactamente posible la preparación del producto acabado, solo se trata de una aproximación ya que en el producto acabado real el analito o principio activo está íntimamente mezclado con los otros ingredientes. Por lo tanto, la eficacia de la recuperación obtenida con el método del placebo cargado puede llegar a ser más elevada de lo que en realidad es. Aún teniendo en cuenta este inconveniente, el método del placebo cargado es una técnica común y aceptada para la determinación de la recuperación y la exactitud de un método. Como ejemplo de un caso muy especial, en la bibliografía se explica el diseño de un estudio de recuperación para algunas formas de dosificación no clásicas como las fórmulas de liberación controlada que constan de pellets o comprimidos con recubrimientos poliméricos o también las fórmulas transdérmicas (Hokanson, 1994)<sup>5</sup>
- b) **Método de adición de patrón.** Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga el analito. Este podría ser el caso de las muestras liofilizadas en los que la presencia o ausencia del analito es significativamente distinta. Se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo 3 replicados para cada nivel y se analizan las muestras adicionadas y no adicionadas según el método analítico calculando finalmente la recuperación. Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere la preparación especial de un placebo cargado. No obstante, también debe hacerse la misma reflexión que para el método del placebo cargado, ya que la adición de un patrón sobre una muestra no es exactamente lo mismo que el producto acabado real.

---

5) (September 1994. ). The Initial Method Validation Process” Pharmaceutical Tecnology”.  
En H. G.C., “A Life ,Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods During  
Pharmaceutical Product Development, (págs. Part I: 118-130, ).

12) J., M. G. (May , 1996). *Analytical Chemistry News & Features*.

13) A.C., M. (1989). The Validation Criteria for Analytical Methods use in Pharmacy Practice  
Recerarch. *Journal of Clinical Pharmacy and Terapeutics*, 14,465-473.



#### 4.4 Criterios de aceptación

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra (más o menos complejo) y de la concentración del analito en la misma.

Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en según que tipos de muestras de matrices complejas (productos naturales, fluidos biológicos, alimentación, etc.) sólo se obtienen valores del 50, 80, o 90% (Sabater Torbella, 1988). En estos casos es importante que aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces puede intentar aplicarse un factor de correlación.<sup>14</sup> Con respecto a si un resultado analítico debe ser corregido o no según la recuperación del método, se recomienda consultar la guía sobre recuperación preparada por la IUPAC, ISO y la AOAC, ya que existen argumentos a favor y en contra de este concepto<sup>15</sup> (Thompson, 1999).

A continuación se presentan algunos criterios de aceptación que pueden orientar en la estimación de la recuperación en función del tipo de muestra a analizar y de la concentración del analito en dicha muestra, aunque pueden aceptarse valores de recuperación más bajos según las necesidades del método (Johnson, 1996)

a) Valores orientativos aceptables en la industria farmacéutica.<sup>10</sup>

Tipo	Coef. Recuperación (%)
Materia prima	99.0 – 101.0
Formulado farmacéutico	97.0 – 103.0
Trazas (0.1-10ppm)	Min. 90%
Trazas (< 0.1 ppm)	Min. 75%

10)( 1996). Validation. En V. B. Johnson J.D., Analytical Method. (págs. J.Val. Tehc. , 2, 2, 88-104,.).

14) Sabater Torbella J., V. T. (1988). *Buenas Praticas de Laboratorio (GLP)*. Ediciones Diaz de Santos.

15) Thompson M. Ellison S. Fajgel, A. P. (1999). J. Pure & Applied Chemistry. *Harmonised Guideline Forthe USE of Recovery Information in Analytical Measurement*, 71,2,337-348.



- b) Valores orientativos aceptables según la AOAC 8Asociación Oficial de Químicos Analíticos), en función de la concentración del analito (OAC, 1993; Huber, 1999)<sup>6</sup>

<b>% Analito</b>	<b>Relación</b>	<b>Unidades</b>	<b>Factor recuperación (%)</b>
100	1	100%	98-102
≥10	10 <sup>-1</sup>	10%	98-102
≥1	10 <sup>-2</sup>	1%	97-103
≥0,1	10 <sup>-3</sup>	0.1%	95-105
0.01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm	90-107
0.001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	80-110
0.0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	80-110
0.00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	80-110
0.000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	60-115
0.0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb	40-120

- c) Valores orientativos aceptables para los métodos descritos en EPA: el porcentaje de la recuperación debe estar entre el 50 y el 150% del valor teórico (William, 1983)
- d) Otros autores recomiendan que la recuperación expresada como porcentaje sea  $\pm 4CV$  del valor teórico en todos los niveles, siendo CV el coeficiente de variación en porcentaje obtenido en el ensayo de la precisión del método (Debesis, 1982)

---

6) L, H. (1999). *Valodation and Qualification in Analytical Laboratories*. Illinois: Interpham Press.



#### 4.5 Comentarios y conclusiones

La exactitud nos indica si los resultados que se obtienen con un método analítico están próximos al valor verdadero o al que se acepta convencionalmente como valor verdadero. Este puede obtenerse de distintas formas. Una alternativa es comparar los resultados del método a evaluar con otro método de referencia validado, cuya exactitud haya sido demostrada. Otra alternativa es analizar una muestra de concentración conocida, es decir, un patrón de referencia certificado. En el caso de la determinación de un analito en un producto acabado ya sea un principio activo, un excipiente o una impureza, la muestra de concentración conocida se prepara por adición de la cantidad que corresponda del analito patrón sobre un placebo (método del placebo cargado) o sobre la propia muestra (método de adición de patrón)

No siempre se obtienen valores de recuperación cercanos al 100%, ya que ésta depende de la matriz de la muestra, de la efectividad del método de preparación y extracción y de la concentración del analito.

La desviación de la exactitud por **exceso** se produce cuando existen interferencias y la selectividad del método no es la adecuada, entonces se obtienen resultados superiores al valor verdadero. En este caso, si es posible, se deberían modificar las condiciones del método para optimizar la selectividad o bien cambiar a otro alternativo que sea selectivo.

La desviación de la exactitud por **defecto** suele producirse cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos obteniéndose recuperaciones más bajas. Cuando esto ocurre sería conveniente intentar optimizar la preparación de muestra para mejorar el factor de recuperación. Si esto es muy costoso o no es posible, cuando la exactitud obtenida es repetible, es decir, tiene una precisión elevada y además es homogénea en todos los niveles de concentración estudiados, puede aplicarse un factor de corrección en el cálculo final para compensar las pérdidas del analito debidas al método de extracción (Thompson, 1999)

### 5. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

#### 5.1 Definición y generalidades

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH, Q2A).

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



No deben confundirse estos términos con otro al que normalmente se asocian, la Sensibilidad, ya que ésta es la capacidad de un método de análisis para discriminar pequeñas diferencias en concentración o masa del analito. Por lo tanto en términos prácticos, la sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración obtenida al representar la respuesta frente a la concentración (Huber, 1999). En este sentido una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de cuantificación y de detección, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre el ruido y la señal debida al analito; es decir a este respecto siempre es preferible un sistema con bajo ruido de fondo a costa de una menor sensibilidad (Mehta, 1989)

## 5.2 **Ámbito de aplicación**

De esta definición general se derivan, no obstante una serie de cuestiones previas a resolver, tales como cuando es necesario establecer los límites de cuantificación y detección para un método de análisis y cual es el interés en su determinación; es decir, qué aporta a la validación del método establecer dichos límites.

Como ya se ha apuntado con anterioridad, la guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Estos es, ensayos en los que simplemente se determina si la cantidad de impureza presente en la muestra es superior o no al límite establecido en especificaciones, sin dar un valor numérico. Se trata de demostrar de esta forma que el método es realmente capaz de detectar la concentración límite y superiores. Por el contrario se considera necesario establecer únicamente el límite de cuantificación en métodos destinados a la determinación numérica de impurezas; y es aquí donde puede surgir la primera duda, puesto que hoy día la pureza de gran parte de los principios activos farmacéuticos se define a partir de una serie de test límites de impurezas conocidas y desconocidas junto, con la suma total de éstas, y parece obvio que si se ha de dar finalmente una suma porcentual del contenido en impurezas, previamente éstas se han de haber cuantificado con suficiente precisión y exactitud; dicho de otro modo, siempre que se deba dar un valor numérico al total de impurezas se reconoce implícitamente la necesidad de determinar el límite de cuantificación para cada una de ellas.

De todo ello se deduce que siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de principio activo, sería muy recomendable de entrada establecer no sólo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.

Por otra parte, cuando el método se define como un método de análisis de valoración de contenido en el cual siempre se trabajará en rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo, no sería necesario la determinación de éstos parámetros: no obstante, y como se ha insistido a lo largo de la Monografía, la validación permite un mejor conocimiento del método analítico, y desde este punto de



vista, saber cuáles son las cantidades mínimas de analito que se podría cuantificar puede resultar muy interesante y en ocasiones útil. En numerosas circunstancias se suelen emplear las mismas condiciones experimentales en el análisis de contenido en principio activo que en el ensayo de test de disolución, en el que la concentración de analito en la muestra puede ser muy baja (por ejemplo en el caso de productos de liberación controlada en los que interesa comprobar que en determinadas condiciones la cantidad de principio activo disuelto es prácticamente nula), o en la determinación de trazas de principio activo en validaciones de limpieza, tan a la orden del día. Para todo esto es también imprescindible conocer qué mínima cantidad de analito que se puede cuantificar con exactitud y precisión.

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

Una vez se ha visto la importancia de estos parámetros de validación, se tratará de desarrollar los diferentes métodos a través de los cuales pueden establecerse. No obstante, procedimientos de análisis y sistemas instrumentales hay de muy diversa índole y sus características definen en muchos casos cuál es el método a seguir de entre los posibles.





## Espectrofotometría

### Definición de Espectrofotómetro:

Un **espectrofotómetro** es un instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones. También es utilizado en los laboratorios de química para la cuantificación de sustancias y microorganismos.

### Función:

Este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Esto le permite al operador realizar dos funciones:

1. Dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra
2. Indicar indirectamente qué cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra

### Principio de la Espectrofotometría

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe radiación de longitudes de ondas que no pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del infrarrojo.

La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida.

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas.

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

Al campo de luz uv de 200 a 400 nm se le conoce también como rango de uv cercano, la espectrofotometría visible solamente usa el rango del campo electromagnético de la luz visible, de 400 a 800 nm.

Además, no está de menos mencionar el hecho de que la absorción y trasmittancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida.



### Ley de Beer

La Ley de Beer declara que la cantidad de luz absorbida por un cuerpo depende de la concentración en la solución.

Por ejemplo, en un vaso de vidrio tenemos agua con azúcar diluida y en otro tenemos un vaso con la misma cantidad de agua pero con más azúcar diluida. El detector es una celda fotoeléctrica, y la solución de azúcar es la que se mide en su concentración.

Según la ley de Beer, si hiciéramos que un rayo de luz atravesara el primer vaso, la cantidad de luz que saldría del otro lado sería mayor que si repitiéramos esto en el segundo; ya que en el segundo, las ondas electromagnéticas chocan contra un mayor número de átomos o/y moléculas y son absorbidos por estos.

### Ley de Lambert

En la Ley de Lambert se dice que la cantidad de luz absorbida por un objeto depende de la distancia recorrida por la luz.

Por ejemplo, retomando el ejemplo de los vasos, pero ahora, pensemos que ambos tienen la misma cantidad de agua y la misma concentración de azúcar, pero, el segundo tiene un diámetro mayor que el otro.

Según la ley de Lambert, si hiciéramos que un rayo de luz atravesara el primer vaso, la cantidad de luz que saldría del otro lado sería mayor que si repitiéramos esto en el segundo; ya que en el segundo, las ondas electromagnéticas chocan contra un mayor número de átomos o/y moléculas y son absorbidos por estos; de la misma forma que se explicó en la ley de Beer.

### Ley de Bouguer-Beer-Lambert

Una ley muy importante es la ley de Bouguer-Beer-Lambert (también conocida como ley Lambert Bouguer y Beer) la cual es solo una combinación de las citadas anteriormente.

### Transmitancia y absorción de las radiaciones

Al hacer pasar una cantidad de fotones o de radiaciones, por las leyes mencionadas anteriormente, hay una pérdida que se expresa con la ecuación:

$$I_t/I_o = T^{-kdc}$$

Donde  **$I_t$** , es la intensidad de luz que sale de la cubeta y que va a llegar a la celda fotoeléctrica (llamada **radiación o intensidad transmitida**); y  **$I_o$**  que es la que intensidad con la que sale al atravesar la celda (**radiación intensidad incidente**) y la relación entre ambas ( **$T$** ) es la transmitancia.



En el exponente, el signo negativo se debe a que la energía radiante decrece a medida que el recorrido aumenta. Donde  $k$  es la capacidad de la **muestra** para la captación del haz del campo electromagnético,  $d$  es la longitud de la cubeta de espectrofotometría que recorre la radiación, y  $c$  es la concentración del soluto en la muestra ya ubicada en la cubeta.

La ecuación simplificada de la ley de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c$$

Comprende a la *mínima* ecuación que relaciona la concentración ( $c$ ), la absorbancia de la muestra ( $A$ ), el espesor recorrido por la radiación ( $d$ ) y el factor de calibración ( $\epsilon$ ). El factor de calibración relaciona la concentración y la absorbancia de los estándares.

La absorción (o absorbancia) es igual a  $A$ , la es el logaritmo del recíproco de la transmitancia:

$$A = \log 1/T$$

Lo que es igual a:

$$A = -\log T$$

Las ecuaciones mencionadas de las leyes son válidas solo y solo sí<sup>17</sup>:

- La radiación incidente es monocromática.
- Las especies actúan independientemente unas de otras durante la absorción.
- La absorción ocurre en un volumen de sección transversal uniforme

#### **Componentes de un espectrofotómetro:**

- Cubetas de espectrofotometría
- Fuente de luz:

La fuente de luz que ilumina la muestra debe cumplir con las siguientes condiciones: estabilidad, direccionabilidad, distribución de energía espectral continua y larga vida. Las fuentes empleadas son: lámpara de wolframio (también llamado tungsteno), lámpara de arco de xenón y lámpara de deuterio que es utilizada en los laboratorios atómicos.

---

17)Shields, R. L. (s.f.). *Wikipedia*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2011, de <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometr%C3%ADa>



- **Monocromador:**

El monocromador aísla las radiaciones de longitud de onda deseada que inciden o se reflejan desde el conjunto, se usa para obtener luz monocromática.

Está constituido por las rendijas de entrada y salida, colimadores y el elemento de dispersión. El colimador se ubica entre la rendija de entrada y salida. Es un lente que lleva el haz de luz que entra con una determinada longitud de onda hacia un prisma el cual separa todas las longitudes de onda de ese haz y la longitud deseada se dirige hacia otra lente que direcciona ese haz hacia la rendija de salida.

- **Compartimiento de Muestra:**

Es donde tiene lugar la interacción, R.E.M con la materia (debe producirse donde no haya absorción ni dispersión de las longitudes de onda). Es importante destacar, que durante este proceso, se aplica la ley de Lambert-Beer en su máxima expresión, en base a sus leyes de absorción, en lo que concierne al paso de la molécula de fundamental-excitado.

- **Detector:**

El detector, es quien detecta una radiación y a su vez lo deja en evidencia, para posterior estudio. Hay de dos tipos:

- a) los que responden a fotones.
- b) los que responden al calor.

- **Registrador:**

En los instrumentos modernos se encuentra una serie de 16 fotodetectores para percibir la señal en forma simultánea en 16 longitudes de onda, cubriendo el espectro visible. Esto reduce el tiempo de medida, y minimiza las partes móviles del equipo.

- **Características del sistema:**

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de Si.
- Se utilizan dos lámparas: una de H o deuterio para la región UV, y una de W / halógeno para la región visible
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene sólo solvente.
- La luz pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia.
- El espectrómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia.



- La radiación transmitida es detectada y el espectrómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz que pasa por las celdas.



## Diseño Metodológico

### Tipo de estudio:

Estudio tipo analítico.

Tipo de muestreo: Probabilístico, ya que se determinarán al azar los elementos que se incluirán en la muestra; teniendo cada uno de estos la misma probabilidad de ser seleccionados.

### Universo:

El universo o población está compuesto por el lote número FMT/0108010 de Famotidina de 40 mg tabletas.

### Muestra:

La muestra fue seleccionada al azar tomándose 50 blísteres de Famotidina que representan el 10% de la población en estudio.

### Material y Método:

El instrumental empleado es el que se menciona más adelante en el protocolo de validación.

### Método de muestreo:

El método de muestro utilizado fue un método propio del laboratorio el cual se realiza aplicando la tabla 1000 Estándar.

### Área de estudio:

Instalaciones de Laboratorios X.

### Variables de estudio:

- Selectividad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión

**Tipos de variables:** Cuantitativa



### Operacionalización de las variables

Variable	Sub-variable	Indicadores
Linealidad	Coeficiente de correlación  Coeficiente de determinación  Varianza de residuales constantes	r  $r^2$  Homocedasticidad
Exactitud	Porcentaje de recuperación  Coeficiente de correlación  Coeficiente de determinación	%R  r  $r^2$
Precisión	Repetibilidad	Instrumental  Sistema  Método



## Muestras

### Preparaciones

#### Preparación de Acido clorhídrico 0.1 N (Blanco):

Medir 33.2 mL de HCl grado reactivo y adicionarlos en un balón con capacidad de 1000 mL que contenga aproximadamente 500 mL de agua destilada, aforar con el medio de disolución (agua) y transferirlo a un recipiente con capacidad para 4000 mL y adicionar agua hasta llegar a la marca de aforo, la concentración final será de 0.1 N.

#### Preparación de la solución estándar:

Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de Famotidina estándar de referencia, transferir a un balón de 10mL, adicionar aproximadamente 50 mL de HCl 0.1 N y agitar en el Bracsonic hasta disolución completa, aforar con de HCl 0.1 N hasta completar el volumen y mezclar; transferir 5 mL de la solución a un balón de 50 mL, diluir con el medio hasta el volumen. La concentración final de esta solución es de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Preparación de la muestra:

Determinar el peso promedio de 20 tabletas de Famotidina de 40 mg, pesar una cantidad equivalente a 20 mg, transferir a un balón de 100 mL, adicionar aproximadamente 50 mL de HCl 0.1 N y agitar, aforar con el medio de disolución, filtrar y tomar una alícuota de 5 mL, diluir con el medio y mezclar, la concentración final de esta solución será de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Lecturas:

Una vez preparadas las soluciones estándar de referencia y soluciones de de muestras, proceder a la realización de las lecturas, utilizando celdas de 1 cuarzo de 1 cm. y el equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de máxima absorbancia de 265 nm, utilizando HCl 0.1 N como blanco.





### Equipos.

Nombre	Descripción
Espectrofotómetro UV- visible 8453 con detector de arreglo de diodo	Equipo de un solo haz que permite obtener espectros completos en un rango de 190 a 1100 nm. Con luz de fondo corregida en 1.5 segundos, con un tiempo de integración de 0.5 segundos. Puede obtener un espectro completo cada 0.1 segundos sin corrección de luz de fondo, no tiene partes móviles que puedan afectar la reproducibilidad de la longitud de onda.
Celda	Celda de cuarzo de 1 cm.
Balanza analítica	Marca: OHAUS, Modelo AR 1140, tiene suficiente precisión para los requisitos que exige el presente método analítico y esta perfectamente calibrada.
Ultrasonic Cleaner	Marca: Brasonic, baño ultrasónico para clarificar soluciones.
Pipetas volumétricas	Pipetas volumétricas con capacidades de 3, 4, 5, 6 y 7 mL. Marca PYREX.
Filtros	Filtro de papel marca WATTMAN DE 0.2 $\mu\text{m}$ .
Espátulas	De acero inoxidable utilizadas en los procesos de pesadas de reactivos.
Balones	Balones PYREX de 100 y 50 mL.
Becker	Marca PYREX con capacidades de 50 y 250 mL.

#### Condiciones espectrofotométricas:

Temperatura de operación	0-50 °C (32-122 °F)
Temperatura de no operación	-40-70 °C (-4-158 °F)
Humedad	45% - 55%
Medio de disolución (Blanco)	Acido clorhídrico 0.1N
Longitud de onda	$\lambda = 266 \text{ nm}$
Concentración del estándar	$\mu\text{g/mL}$
Concentración de muestras	$\mu\text{g/mL}$



## METODOS ANALITICOS

Procedimiento experimental:

Determinación de los parámetros de validación

### Linealidad

Para la determinación experimental de la Linealidad se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizar por triplicado ( $K=5$ ,  $n^{\circ}$  de replicas=3) obteniéndose un total de 15 determinaciones ( $n=15$ ). Por lo cual se prepararon en forma independiente 5 niveles de concentración las cuales se encuentran dentro del intervalo establecido de 70-130% de la concentración prevista de trabajo.

Cada solución estañar se leerá 3 veces en el espectrofotómetro UV-visible, comenzando desde la solución de menor concentración hasta llegar a la de mayor concentración.

Para la determinación experimental de la Linealidad del Método, se realizara el mismo procedimiento, pero esta vez trabajando con la matriz y el producto terminado de Famotidina 40 mg (tabletas).

Datos a reportar:

- Análisis de la curva de regresión.
- Ecuación de la recta de regresión.
- Coeficiente de correlación  $r$  y de determinación  $r^2$
- Características de la variancia residual.
- Grafica de residuales.
- Análisis de varianza (ANOVA).
- Test de linealidad.

Criterios de aceptación:

- El valor recomendable para de coeficiente de correlación es  $\geq 0.999$ . aunque en caso de impurezas se admite  $\geq 0.990$ .
- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $\geq 0.998$ .
- Debe haber una varianza residual constante (Homoscedasticidad).
- Coeficientes de variación de los factores de respuesta  $f$  menor de 5%

### Exactitud

Se realizaran 9 determinaciones sobre 3 niveles (3 determinaciones por nivel) de concentración de analito los cuales cubren el rango especificado comprendido por la concentración centra (100%) y las concentraciones de los extremos (80-120%).

Método del placebo cargado: se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades



conocidas del analito patrón a tres niveles de concentración los cuales están dentro del rango a estudiar (80-100-120%).

La exactitud se expresara como el porcentaje de recuperación.

El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación.

Criterios de aceptación:

- Placebo enriquecido: porcentaje de recuperación esperado debe encontrarse entre 95-105% lo cual equivale a  $\pm 5\%$  de error relativo.
- El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.9998.
- El valor de  $t_{cal}$  debe ser menor al valor de  $t_{crit}$ .
- Homogeneidad de las varianzas
- Si el porcentaje de recobro es menos de 99% existe un efecto depresor, pero si es mayor del 101% existe un efecto amplificador en la señal de la respuesta.

### Precisión

#### Repetibilidad

- Repetibilidad Instrumental

El ensayo de la repetibilidad instrumental se realizara efectuando una serie de análisis sobre una misma muestra (la cual esta a la concentración principal o concentración de trabajo,  $20\mu\text{g/mL}$ ) en las mismas condiciones operativas establecidas. Es decir, el análisis se llevara a cabo efectuando 10 veces la lectura de una muestra única conteniendo principio activo a la concentración nominal ( $20\mu\text{g/mL}$ ).

- Precisión intermedia

Se realizara efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra a la concentración nominal pero en diferentes condiciones de operación (días, analistas). Por lo que la ejecución de este parámetro será llevado a cabo por analistas diferentes, en días diferentes. Realizando cada analista tres lecturas al día durante un periodo de tiempo de tres días.

- Repetibilidad del método

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.



- Un mínimo de 3 muestras a 3 niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).
  
- Criterios de aceptación
  - Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el coeficiente de variación del método.
  - Se realizara un análisis de varianza (ANOVA) para obtener la precisión intermedia del método.
  - El coeficiente de variación para análisis de impurezas en función de la concentración del analito debe ser aceptable.
  - Intervalos de confianza



## Resultados y Análisis de los resultados

### Selectividad

En la tabla 1 recoge las absorvancias para cada caso preestado a continuacion

Determinacion	Placebo cargado	P.a
1	0.631	0.62536
2	0.6286	0.62532
3	0.62918	0.62569
4	0.62444	0.61576
5	0.62853	0.62604
6	0.62262	0.61493
promedio	0.627395	0.62218333
S	0.003176638	0.00530981
CV	0.50632188	0.85341603

Tabla 1. Absorvancias con presencia y ausencia de excipientes de la matriz.

Discrepancia		0.837641638
Diferencia entre medias		0.005211667
Error estándar combinado		
EE		0.002526036
tn-2, 0.05		2.228
IC 95%		
D±t*EE	LS	0.010839674
	LI	0.000416341

Tabla 2. Determinaciones del intervalo de confianza.

En la tabla 2 que con un intervalo de confianza de 95% el comportamiento de las absorvancias en la determinacion del principio activo en presencia de la matriz de excipientes se situa entre 0.000416341 y 0.010839674.

En este caso , el sesgo maximo posible, con una confianza de 95% , es de 0.010839674, lo que representaria aproximadamente un 0.002526036% sobre la valoracion del 100%

Se observa un sesgo positivo de 0.00252%



Linealidad

Para saber el tipo de regresion aplicar se hizo un estudio de homocedasticidad, mediante el Test de Hartley de la absorbancia obtenidas al leer 3 veces una solucion estandar interna de concentracion menor (nivel 60% de la concentracion nominal ) y 3 veces una solucion estandar interna de concentracion mas alta (140% de la concentracion nominal), los resultados de abosrbancias y del Test de Hartley se muestran en la tabla 2, siendo el Valor de r calculado menor al r de tabla, por lo que la regresion es simple.

N'	Absorbancias de la concentración al 60%	Absorbancias de la concentración al 140%
1	0.33897	0.78442
2	0.33846	0.78611
3	0.33827	0.78596
Varianza	1.31033E-07	8.7503E-07
r	6.677944543	
r <sub>tab</sub> (0.95,2)	39	

Tabla 2. Absorbancias para el estandar de mas baja concentracion y mas alta concentracion.

Los coeficiente de regresion obtenidos a partir de las curvas de calibracion elaborada durante los 5 dias se muestra en la tabla 3.

Pendiente	0.02805583
Intercepto	0.00142
r <sup>2</sup>	0.99959352
Var. Res.	0.00001183
S <sub>bo</sub>	0.00088763
s <sub>b1</sub>	0.000042706

Tabla 3. coeficientes de regresion

La tabla 3 nos indica que existe una buena linealidad (99.95%).

La normalidad de los residuales se muestran en la grafica 1, se puede obsevar que los residuales se distribuyen aleatoriamente y no reflejan ninguna tendencia.

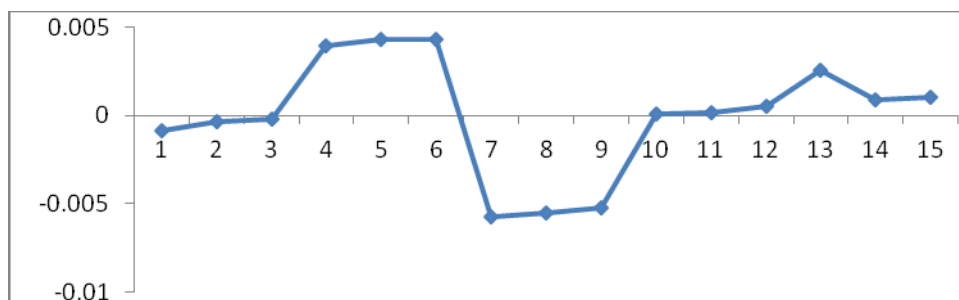


Figura 1. Gráficos de residuales

Para verificar la validez del modelo, se aplico el Análisis de varianza (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, para verificar el ajuste del modelo se presenta en la tabla 4. Donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el  $F_c$  es mayor al  $F$  de tabla.

Verificaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_c$	$F_{tabl}$
Regresión	1	0.377822296	0.3778223	31969.1552	1.9744E- <sup>23</sup>
Residuos	13	0.000153638	1.1818E- <sup>05</sup>		

Tabla 4. Resultado de ANOVA para la verificar la validez del modelo

La curva de calibracion se muestra en el figura 2.

$$y = 0.0281x + 0.0014$$

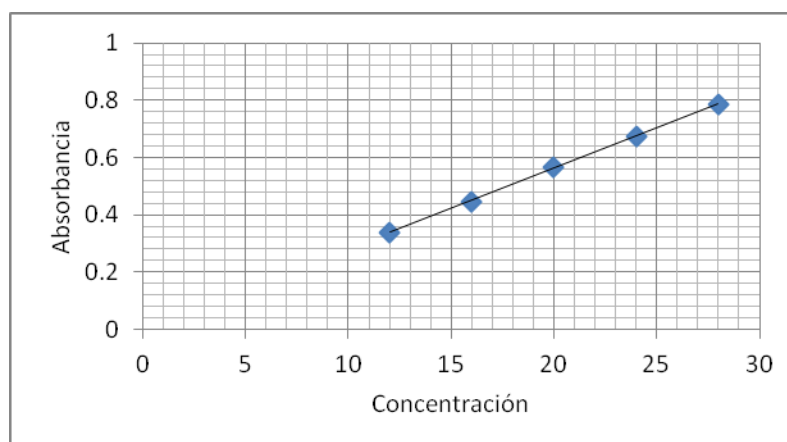


Figura 2. Curva de calibracion



Limite de deteccion y cuantificacion

El limite de deteccion y cuantificacion calculados a partir de la desviacion estandar de la residual y pendiente de la curva de adicion patron se muestran en la tabla 5.

Parametro	Valor
Desviacion estandar residual	0.0040998
Pendiente	0.02805583
LD (mg/ml)	0.48076829
LC (mg/ml)	1.4613018

Tabla 5. Resultados de limite de deteccion y cuantificacion.

Repetibilidad y Precisión intermedia de las mediciones Analíticas (INSTRUMENTAL)

Para el estudio de la Repetibilidad y Precisión intermedia de las mediciones analíticas, se prepararon soluciones estándar de Famotidina, a una concentración de 20 mcg/ml y se midieron las áreas de los picos por 3 días, los resultados se muestran en la tabla 6.

Concentracion	Dia 1	Dia 2	Dia 3
20.047	0.62536	0.62435	0.6254
20.046	0.62532	0.62489	0.6245
20.058	0.62569	0.62558	0.62523
20.06	0.62576	0.62568	0.6267
20.046	0.6253	0.626	0.6252
20.069	0.62604	0.62528	0.62589
20.055	0.6256	0.62548	0.626
20.045	0.6253	0.62527	0.6259

Tabla 6. Absorbancias del estándar de Famotidina





Para estudiar la Repetibilidad de las mediciones analíticas se demostró la homogeneidad en las varianzas y para identificar si existen diferencias significativas de los resultados entre los días se realizó ANOVA de un factor. El valor calculado del test de Hartley para el estudio de la homogeneidad de las varianzas es de 0.2866 siendo el de tabla al 95% de 6.94 por lo que las varianzas entre los días son homogéneas y por lo tanto hay Repetibilidad entre las mediciones.

La tabla 7 muestra los resultados para el análisis de varianzas, se puede observar que existe diferencia significativa entre los días. La diferencia de los resultados se puede ver en la gráfica de los intervalos de confianza, donde el día 2 presenta mayor variación en las mediciones analíticas.

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	
	Ambientales	2839.80268	3	946.600893	812315.739	2.86626556	
	Repetibilidad	0.04195121	36	0.00116531			
	Total	2839.84463	39				

Tabla 7 ANOVA para el estudio de la Repetibilidad y precisión intermedia de las Mediciones Analíticas

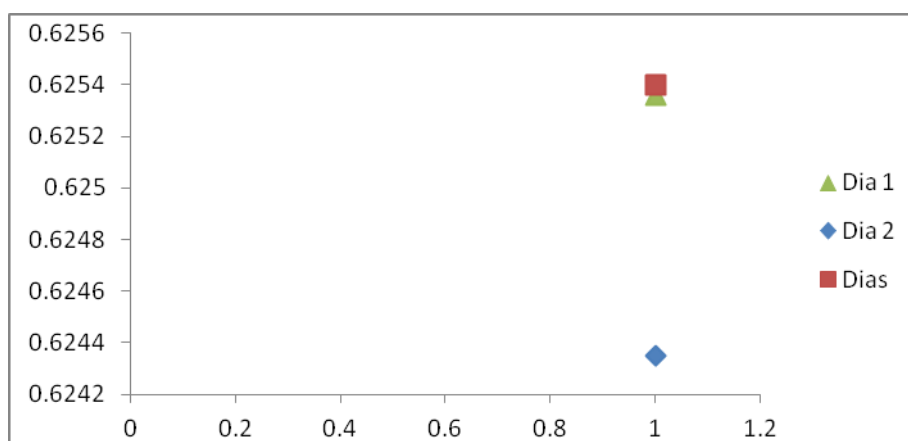


Figura 3 Intervalos de confianza para los valores de precisión de las mediciones analíticas.



La repetibilidad y la precisión intermedia de las mediciones analíticas calculados a partir de sus desviación estándar, expresada como %RSD es de 0.700% y 0.61%. Según el porcentaje de desviación estándar relativa el sistema es capaz de producir resultados precisos.

Para identificar los cambios en el proceso de medición en el tiempo, y llevar un control de la calidad en las mediciones de rutina, se han elaborado las cartas de control para la exactitud y repetibilidad en las mediciones del sistema. La figura 4 y 5, se presentan los gráficos de control para los promedios y la desviación estándar para los 3 días. Se puede observar que los promedios y la desviación estándar de los resultados por día, se encuentran dentro de los límites de control establecidos.

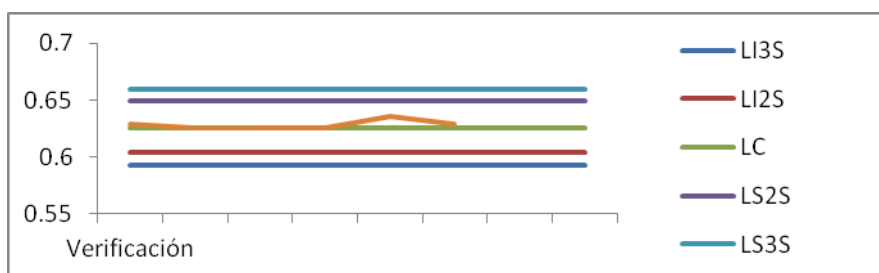


Figura 4. Intensidad de la señal de la respuesta instrumental (exactitud).

### Repetibilidad y Precisión intermedia del método

Para el estudio de la Repetibilidad y precisión intermedia del método, se preparó una muestra de Famotidina (tabletas) en solución HCl 0.1 N a una concentración de 0.021 mg/ml, se midieron las absorbancias por 3 días consecutivos, los resultados se muestran en la Tabla 8.



N°	D1	D2	D3
1	0.58775	0.5888	0.59825
2	0.59302	0.58958	0.58964
3	0.59135	0.59325	0.58765
4	0.59108	0.58479	0.59875
5	0.59307	0.59875	0.59465
6	0.59928	0.59657	0.59875
7	0.59016	0.58985	0.58962
8	0.59104	0.59845	0.58965
9	0.59113	0.59832	0.58624

**Tabla 8 Absorbancias para la muestra de Famotidina.**

Para estudiar la Repetibilidad del método, se demostró la homogeneidad en las varianzas. Para estudiar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el Test de Hartley y para ver la diferencia entre los días se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA).

El valor calculado del test de Hartley para el estudio de la homogeneidad de las varianzas es de 2.64 siendo el de tabla al 95% de 6, por lo que las varianzas entre los días son homogéneas y por lo tanto hay Repetibilidad entre las mediciones.

La tabla 9 muestra los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que existe diferencia significativa entre los días. La diferencia de los resultados se puede ver en la gráfica 7 de los intervalos de confianza, donde el día 5 presenta mayor variación en las mediciones analíticas.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre días	2956.46257	3	985.4875235	1028773.222	3.008786572
Dentro de los días	0.0229902	24	0.000957925		

Tabla 9 ANOVA para el estudio de la Repetibilidad y precisión intermedia del método.

La repetibilidad y la precisión intermedia del método, expresada como %RSD es de 0.531368521% y 311.1683651% respectivamente. Según los %RSD el método **es hábil de dar resultados precisos.**

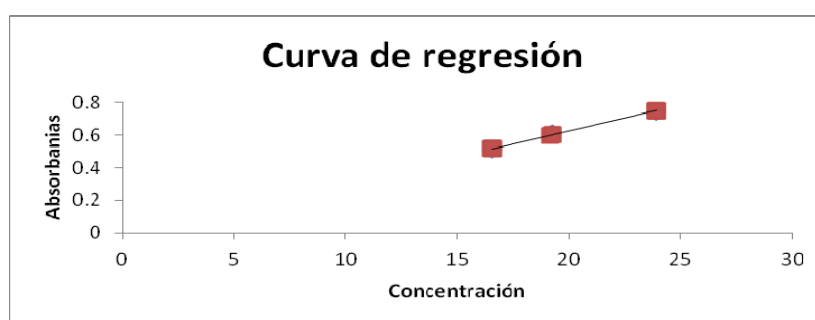


Evaluacion de la exactitud del metodo

Estudio del efecto de matriz:

Se preparo una curva de calibracion normal a 3 niveles de concentracion ( 81.815%, 98.47% y 119.75% de la concentracion nominal). El grafico 5 muestra curva, los parametros de regresion para las dos curvas se muestran en la tabla 10.

$$y = 0.0317x - 0.008$$



**Grafico 5. Curva de calibracion normal (CCN)**

Parametro	Calibracion normal (CCN)
Pendiente (b1)	0.03170195
Intercepto(b0)	-0.0080239
Var. Residual	0.000078860

Tabla 10. Parámetros de la curva de calibración Normal (CCN).

A partir del Test de Hartley, se demostro la homogenidad de la varianzas, verificandose con la t student en donde se demuestra la recuperacion sastifactoria. Significa que las variancias de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es disir que el factor concentracion no influye en la variabilidad de los resultados. Por lo tanto la recuperacin es sastifactoria. Ver tabla 11.



Parámetro	Calculado	Tabla
Hartley	70.6	87.5
Test T	0.86	2.31

Tabla 11.

La estimación de recobro se puede hacer por comparación de pendientes entre curvas adición patrón y normal, en nuestro caso se determina haciendo un promedio de las concentraciones encontradas, y se observa que existe un efecto depresor de la matriz, para un 99.58 % de recobro.



## **Conclusión**

- Según el Test de Hartley, y la verificación de la validez del modelo mediante la aplicación de un análisis de varianzas (ANOVA). El método analítico es lineal y el tipo de regresión es simple. Y con la determinación del Límite de Cuantificación (LC) demostramos que las cantidades de analito presente en las muestras en diferentes concentraciones, se determinaron cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.
- En el estudio de la Repetibilidad y precisión intermedia del método expresada como %RSD. Se demostró la homogeneidad en las varianzas, lo que nos indica que el método es hábil de dar resultados precisos.
- En la evaluación de la exactitud del método, se estudió el efecto de la matriz y se observa que existe un efecto depresor de la matriz, para un 99.58 % de recobro, por lo tanto la recuperación es satisfactoria.
- Mediante los Test aplicados (Test de Hartley, ANOVA, t student), Hemos demostrado que factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.
- El método es Selectivo, tiene la capacidad de identificar de manera inequívoca el analito de interés de los excipientes presentes en la matriz.
- El método demostró: Linealidad, Precisión, Exactitud y Selectividad.



### **Recomendaciones**

- El método analítico propuesto puede utilizarse en el análisis de Famotidina en formas de materia prima y producto terminado.
- Tener de referencia los parámetros de validación calculados en cada uno de los ensayos realizados.
- Dar mantenimiento a los equipos para así evitar errores en futuras validaciones y análisis cuantitativos.
- Tener presente dicho trabajo monográfico, como base para realizar futuros estudios de carácter investigativo de validación.
- Utilizar estándares de referencias certificadas, materiales volumétricos calibrados y equipos cualificados, de tal forma que se pueda determinar los elementos de incertidumbre que puedan afectar los resultados.



# **Anexos**





## GLOSARIO

El presente glosario se limita a los términos estadísticos propios de la validación analítica.

### **Analito:**

Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis.

### **Blanco, placebo o matriz de la muestra:**

Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene analitos. Puede ser un blanco de los reactivos o bien de las muestras problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema menos los analitos. En este último caso se denomina placebo o matriz de la muestra.

### **Cantidad declarada o nominal:**

Es la cantidad o concentración teórica de un analito. Cuando se trabaja con concentraciones relativas se le da valor 100.

### **Coefficiente de variación o desviación estándar relativa:**

Es la desviación estándar expresado como función de la media.

### **Desviación estándar:**

Estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los resultados.

### **Error relativo porcentual:**

Desviación en porcentaje de los valores experimentales frente a los valores teóricos.

### **Estándar de referencia:**

Un estándar de referencia o patrón primario es un producto homogéneo con propiedades específicas (identidad, pureza y riqueza) que ha sido analizado y certificado por un organismo cualificado por y homologado (reconocido oficialmente).

### **Estándar de trabajo:**

Un estándar de trabajo o patrón secundario es un estándar cuya riqueza (u otras características), ha sido calibrada y comprobada mediante a un método validado frente a un patrón de referencia.

### **Exactitud:**

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. Capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más



cercanos posibles al valor teórico o nominal. Matemáticamente se expresa como el valor numérico del error sistemático (diferencia entre el valor medio hallado y el verdadero) o bien como error relativo porcentual.

**Fiabilidad:**

Capacidad de un método analítico para mantener durante periodos de tiempo apropiados los criterios fundamentales de validación. La fiabilidad indica las prestaciones del método para su uso rutinario.

**Grados de libertad:**

Numero de categorías independientes que definen una muestra o una población. En el cálculo de la desviación estándar significa el número de desviaciones independientes con respecto a la media y vale  $n-1$ . En el cálculo de la recta de regresión lineal, el número de grados de libertad es  $n-2$ .

**Homogeneidad de variancias:**

En muchos test estadísticos es necesario comprobar previamente la homoscedasticidad (homogeneidad de variancias) de las muestras mediante test específicos (Cochran, Barlett, Levene, etc.) .L condición de variancias diferentes recibe el nombre de heteroscedasticidad.

**Limite de cuantificación.**

Mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

**Limite de detección:**

Mínima cantidad de analito que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud.

**Linealidad:**

Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

**Media aritmética:**

Valor de centralización de una muestra o población .Equivale a la suma de todas las observaciones dividida por el número de las mismas.

**Método analítico o ensayo:**

Procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones necesarias para efectuar un análisis concreto.



**Muestra:**

Producto resultante de operación de muestreo .El muestreo debe ser representativo y con determinado carácter aleatorio.

**Precisión:**

Capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre si .Grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio .Se puede estudiar a tres niveles.

Repetibilidad: Evalúa la precisión del método realizando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analistas) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto

Precisión intermedia: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas (analista, día, instrumento) .Es la precisión intralaboratorio.

Reproducibilidad: Evalúa la precisión entre laboratorios diferentes.

**Recuperación:**

Se define como eficacia en el rescate del analito de la matriz de la muestra. Es un parámetro que se debe estudiar durante el desarrollo del método analítico. La recuperación ideal es del 100%.

**Replicas o repeticiones:**

En la presente monografía se entiende como “replicas” o replicados a los análisis sucesivos de una muestra en las mismas condiciones utilizando el método analítico completo, desde la preparación de la muestra hasta la medición final del analito.

**Selectividad:**

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.

Capacidad del método para producir una respuesta para el analito de interés distinguible de todas las otras respuestas de los demás componentes de una mezcla potencialmente compleja.

La especificidad se usa como sinónimo de la selectividad aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química.



**Sensibilidad:**

Capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de analito.

**Suma de cuadrados:**

En estadística y especialmente en ANOVA, una suma de cuadrados es la suma de los cuadrados de las diferencias entre los componentes de una serie y su media aritmética.

La suma de cuadrados dividida por los correspondientes grados de libertad da el valor de la media cuadrática o variancia.

**Validación:**

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

Obtención de pruebas documentadas de que un método analítico es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

**Valor estimado en una recta de regresión:**

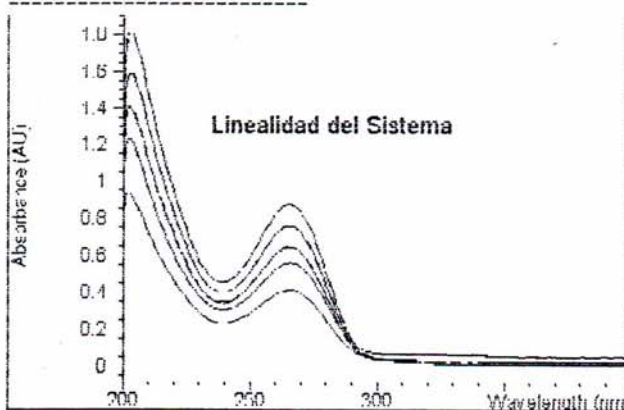
En una recta de regresión de ecuación  $y = bx + a$ , son los valores estimados de la variable independiente ( $\hat{x}$ ) obtenidos al aplicar dicha ecuación sobre los puntos experimentales  $y_i$ . Es decir, son los resultados de las concentraciones de los patrones recalculados utilizando la propia ecuación de la curva de calibración.



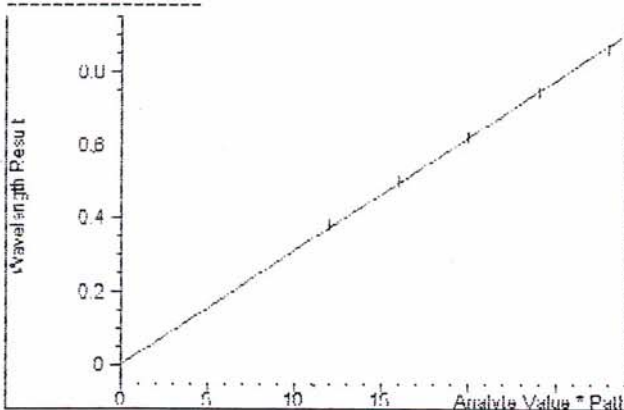
Hardcopy view

Date 10/29/2011 Time 14:37:21 Page 1 of 1

Processed Standard Spectra



Calibration Curve



Calibration Table

#	Standard Name	famotidina	net. Abs<266nm>	Rq<350nm>	%Error
1		12.00000	0.38431	2.7775E-2	-2.75
2		12.00000	0.38328	2.8278E-2	-2.49
3		12.00000	0.38229	2.8632E-2	-2.23
4		16.00000	0.50466	5.6963E-2	-1.25
5		16.00000	0.50360	5.7288E-2	-1.04
6		16.00000	0.50420	5.7199E-2	-1.16
7		20.00000	0.62638	1.9680E-2	-0.55
8		20.00000	0.62634	1.9900E-2	-0.55
9		20.00000	0.62671	2.2523E-2	-0.60
10		24.00000	0.74763	1.2990E-2	-0.02
11		24.00000	0.74708	1.3065E-2	0.06
12		24.00000	0.74678	1.2777E-2	0.10
13		28.00000	0.86221	1.3963E-2	1.15
14		28.00000	0.86202	1.2930E-2	1.17
15		28.00000	0.86224	1.3478E-2	1.14

\*\*\* End Hardcopy view \*\*\*



### Bibliografía

1. British Pharmacopeia 1999. (1999). Validation of Analytical Methodology. En *British Pharmacopeia* (págs. 275-280).
2. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología Humana. 4<sup>ta</sup> Edición. Barcelona : Masson; 2004
3. Food and Drug Administration “Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation” (Draft Guidance). August 2000.
4. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9<sup>o</sup> Edición. México: McGraw – Hill Interamericana Editores; 1996. Vol. I.
5. Hokanson G.C., “A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development, Part I: The Initial Method Validation Process” *Pharmaceutical Technology*, 118-130, September 1994.
6. Huber L., “Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpham Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois, 1999.
7. ICH Q2A: ICH Harmonised Tripartite Guideline “Validation of Analytical Methods: Definition and Terminology”.
8. ICH Q2B: ICH Harmonised Tripartite Guideline “Validation of Analytical Procedures: Methodology.”
9. ICH 3AQ22a: ICH Harmonised Tripartite Guideline “Guideline of Herbal Remedies.”
10. Johnson J.D., Van Buskiik G.E., “Analytical Method. Validation”. *J.Val. Tehc.* , 2, 2, 88-104, 1996.
11. Katzung, Bertram G. (2007). «Chapter 63. Drugs Used in the Treatment of Gastrointestinal Diseases». *Basic & Clinical Pharmacology*(9 edición)
12. Mark Green J. “A Practical Guide to Analytical Method Validation” *Analytical Chemistry News & Features* 305-309 A. May 1996.
13. Mehta A.C. “The Validation Criteria for Analytical Methods use in Pharmacy Practice Recerarch”, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 14,465-473, 1989.
14. Sabater Torbella J., Vilumara Torrallardona A. “Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP)”. Ediciones Díaz de Santos 1988.



15. Thompson M. Ellison S. Fajgel , A., Willets P., Wood R., “Harmonised Guideline Forthe USE of Recovery Information in Analytical Measurement”, J. Pure & Applied Chemistry , 71,2,337-348,1999.
16. (2000). Validation of Compendial Methods” . En *United States Phamacop* (págs. 2149-2152). E.E.U.U. 2149-2152
17. Shields, R. L. (s.f.). *Wikipedia*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2011, de <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometr%C3%ADa>