

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León 

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Química-Farmacía



Monografía para optar al título de Licenciado Químico- Farmacéutico.

Validación de metodología analítica para la cuantificación de Levofloxacin 500 mg capleta recubierta por espectrofotometría ultravioleta visible durante el periodo de septiembre 2012 en UNAN LEÓN

AUTORES:

Br. Walter Alexander Vásquez Hernández

Br. Terencio Samuel Villegas Marcías.

Br. Melvin José Zamora Morales.

Tutor: Msc. Fernando Emilio Baca.

“2012 año del Bicentenario y refundación de la universidad”

DEDICATORIA

A mi señor el que todo lo puede con gratitud infinita y por todas sus bendiciones que me ha ofrecido desde el día que me creó. Ha traído mucha paz y bien, por eso señor misericordioso te doy gracias por los dones que me diste al iluminarme para llegar al fin de esta etapa y comenzar otra para perseverar y siempre servirte.

A mis padres Marcelino Vásquez Gonzales y Yanet Téllez Hernández dones del cielo y de la tierra por brindarme su amor, su apoyo incondicional, consejos, y por sus esfuerzos para lograr mi formación profesional y personal.

A mis hermanos Erick y Cristiana Vásquez Hernández sangre y savia compartida

A mis familias Antonia Téllez, Yader Téllez, Mariela Téllez, Mildre Téllez por sus oraciones y apoyo la cual me alientan y me inspira.

A mis amigos ecos del alma y el corazón.

Walter Vásquez Hernández.

DEDICATORIA

El trabajo de investigación monográfico lo dedico a mis padres; a quienes les debo todo lo que tengo en esta vida. A Dios porque gracias a el tengo esos padres maravillosos, los cuales me apoyan en mi derrotas y celebran mi triunfos .A los docentes quienes son nuestros guías en el aprendizaje, dándonos los últimos conocimientos para nuestro buen desenvolvimiento en la sociedad.

Terencio Villegas Marcias.

DEDICATORIA.

DIOS: Por permitirme culminar mis estudios llenos de salud y bendiciones y por darme la sabiduría necesaria para lograr mis metas propuesta a lo largo de mí carrea profesional.

A MI MADRE: Inocente Francisca Morales Cabrera Que con su gran esfuerzo y apoyo incondicional y siempre bajo la ayuda de nuestro señor me ayudo a lograr una de mis metas que ahora pasa a ser parte de ella misma. **TE AMO MAMA**

A MI PADRE: Melvin Mercedes Zamora Sánchez quien descansa en la paz del señor y a quien quise mucho y aun quiero lamento el no poder compartir esto con él.

A MIS HERMANOS: Flor Zamora y kelvin Zamora por además de ser mis hermanos son mis amigos incondicionales.

A MIS ABUELITOS: Emma Sánchez, Fernando Zamora y julia cabrera quienes me han brindado su apoyo de distintas maneras.

Y por ultimo y no menos importante a mi flaquita bella Nadiesda lacayo quien ha sido cariñosa y comprensiva.

Melvin Zamora Morales.

AGRADECIMIENTO

La gratitud es el sentimiento noble del alma generosa que engrandece el espíritu de quienes lo comparten, el agradecimiento profundo al creador de todo lo existente, por el amor incondicional que nos concede en cada segundo de vida.

A nuestro tutor

Msc. Fernando Baca por transmitir su conocimiento, experiencia y contribución para dar forma a esta investigación.

A nuestro asesor

Lic. Yader Benito Salgado Por brindar su invaluable orientación, consejo y sugerencia.

Al laboratorio Ramos de Nicaragua

Lic. Yessenia Darse por proveer la materia prima, producto termina y placebo.

INDICE

| CONTENIDO | PAGINAS |
|---|----------------|
| I. INTRODUCCION..... | 1 |
| II. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA..... | 4 |
| III. OBJETIVOS..... | 5 |
| IV. MARCO TEORICO..... | 6 |
| V. DISEÑO METODOLOGICO..... | 71 |
| VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS..... | 80 |
| VII. CONCLUSION..... | 93 |
| VIII. RECOMENDACIONES..... | 94 |
| IX. BIBLIOGRAFIA..... | 95 |
| X. ANEXOS..... | 97 |



I. INTRODUCCIÓN

La validación garantiza la calidad del medicamento puesto que validar un método analítico consiste en desarrollar, verificar y documentar su validez, siendo esto lo que le confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el medicamento cumpla con los parámetros de calidad establecidos.

La industria farmacéutica como un ente de alta responsabilidad, siempre busca mejorar la calidad de los medicamento ya que este es un propósito perseguido por las industrias farmacéuticas ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que proporcionan los resultados de la validación de una metodología analítica por lo que la validación es un instrumento de gran importancia.

Los métodos de análisis por Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis) es una técnica de laboratorio que estudia la absorción y emisión de la energía luminosa por la materia por lo que es de amplio uso en la industria farmacéutica en investigaciones química y biológicas por lo tanto es necesario conocer algunos factores que influyan en sus resultados.

En el presente trabajo se validara un método de análisis por Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-Vis) para Levofloxacin capleta de 500 mg fabricada en el laboratorio ramos S.A el cual garantizara que los resultados que se obtendrán serán confiables. Dicha validación se realizara analizando los parámetros de **Selectividad, Linealidad, Exactitud, Precisión y Rango.**

A través del tiempo las industrias químicas- farmacéutica han realizado investigaciones en busca de garantizar la seguridad, eficacia y calidad de medicamentos, desarrollando y validando métodos analíticos que le permitan demostrar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el análisis.

La FDA en año 2000 publico en su página oficial una serie de métodos de disolución para diferentes fármacos donde da criterios a tomar en cuenta como son perfiles de disolución



el medio de disolución por lo que para la Levofloxacin se encuentran tres perfiles de 500, 700,900 ml en un medio acido (HCL 0.1 N).¹⁰

Evaluación de la Pureza Enantiomérica de Levofloxacin y su cuantificación en Formas Farmacéuticas por Electroforesis Capilar Zonal modificada con Sulfobutil- β -ciclodextrina como Selector Quiral.⁴

En el año 2012 en Laboratorio Ramos, Empresa del sector Industrial Farmacéutico Nicaragüense dedicada al diseño, producción y comercialización de medicamentos genéricos de alta calidad y que trabaja para garantizar la suficiente efectividad y confiabilidad, desarrolló un método de análisis para la cuantificación de Levofloxacin capleta recubierta de 500 mg. por la metodología analítica de Espectrofotometría UV visible, los resultados obtenidos en dicho análisis se demostró que la metodología es idónea para la cuantificación de Levofloxacin ya que cumple con los parámetros establecidos en una validación.¹⁶

Según la usp americana última edición se detalla un proceso analítico para la cuantificación y identificación del principio activo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) donde se detalla la preparación de la fase móvil y las condiciones de operación.¹

La Levofloxacin un principio activo de gran importancia por el cual se producen grandes cantidades y se hace necesario validar el método de análisis para obtener resultados confiables ya que el uso de antibióticos por parte de la población es de manera indiscriminada para tratar enfermedades que no requieren algún tratamiento farmacológico.

¹⁰ (Food and Drug Administration., 2000)

⁴ (Cecilia Barbara, 2005)

¹⁶ (Laboratorios Ramos, 2012)

¹ (The United states pharmacopeia conventionl USP XXXIV-NF29 VOLUMEN 3, 2011)



Debido a esto 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. Y 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.

Siendo el ensayo espectrofotométrico de Levofloxacin a una técnica análisis de fiabilidad, precisión, exactitud, linealidad, reproducibilidad, selectividad y rango, además es un método sencillo, y económico por lo que es ventajoso antes otros métodos donde habría un mayor gasto de reactivos y una mayor duración en cuanto al tiempo.

Por lo que a través de la validación realizada en este trabajo monográfico quedara establecido mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método analítico cumplen con los requerimientos para la aplicación analítica propuesta así mismo este trabajo aportara una técnica de validación la cual podría ser utilizada en futuras validaciones de métodos analíticos.



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cómo realizar la Validación de la metodología analítica para la cuantificación de Levofloxacin 500 mg capleta recubierta; por Espectrofotometría Ultravioleta Visible UV- Vis de manera que cumpla con los parámetros necesarios para ser utilizado como un método de rutina?



III. OBJETIVOS

- **Objetivo General.**

Validar el análisis cuantitativo de Levofloxacin 500 mg Capletas, por el método de Espectrofotometría Ultravioleta Visible; que cumpla con los parámetros de exactitud, precisión, linealidad y rango necesarios para ser utilizado como un método analítico de rutina.

Objetivos Específicos.

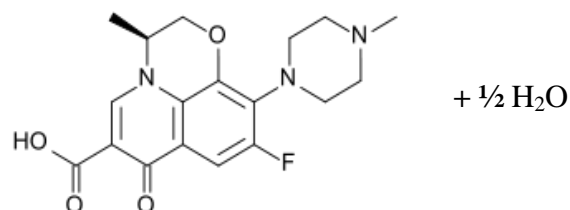
1. Describir los lineamientos a seguir en la validación de la metodología analítica para la cuantificación de levofloxacin.
2. Comprobar que el método de análisis por espectrofotometría UV-visible para Levofloxacin satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.
3. Demostrar mediante los criterios de validación que la técnica por espectrofotometría uv – visible para la cuantificación de levofloxacin en capleta de 500 mg es exacto preciso, selectivo, lineal.



IV. MARCO TEORICO

Propiedades Organolépticas y Físico – Químicas de Levofloxacin.

Estructura química:



Nombre IUPAC sistemático: Ácido (-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido [1, 2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-carboxílico.

Fórmula química: $C_{18}H_{20}N_3FO_4 + \frac{1}{2} H_2O$

Peso molecular: 361.368 g/mol base

Contenido:²³ 99%-101%

Envase y almacenamiento: Protegido de la luz

Sustancia de referencia: Levofloxacina Hemihidrato

Familia química: Quinolonas.

²³ (The United states pharmacopeia conventionl USP XXXIV-NF29 VOLUMEN 3, 2011)



Descripción de la Levofloxacina:

Características organolépticas:

- **Aspecto:** polvo cristalino.
- **Color:** amarillo claro.
- **Olor:** característico.
- **Sabor:** amargo

Solubilidad: poco soluble en agua y etanol

Identificación²³:

A - Absorción infrarroja.

B - Absorción ultravioleta.

C - HPLC.

Solvente: HCL 0.1

Concentración: 5µg/ml

Pérdida por secado²³: menor del 1%

Residuo de ignición²³: no más del 1% de la materia prima previamente secada

²³ (The United states pharmacopeia conventionl USP XXXIV-NF29 VOLUMEN 3, 2011)



Metodología Analítica.

Métodos de análisis:

✓ Especialidad Farmacéutica:

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de Levofloxacin en materia prima y Capletas.

| Bibliografía | Forma Farmacéutica | Método de Análisis |
|--|--------------------|--|
| (The United States Pharmacopeia Conventional USP XXXIV-NF29 Volumen 3, 2011) | Materia prima | Espectrofotometría UV visible Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ²³ |
| (Food and Drug Administration., 2000) | Capletas | Disolución y Cuantificación UV Visible. ¹⁰ |

²³ (The United states pharmacopeia conventional USP XXXIV-NF29 VOLUMEN 3, 2011)

¹⁰ (Food and Drug Administration., 2000)



Propiedades fármaco terapéuticas de Levofloxacina.

La Levofloxacina se considera una Quinolona de cuarta generación. Cubre neumococo, incluido el resistente a penicilina y cefalosporinas. También cubre H. Influenza E y bacterias atípicas (Legionella, Mycoplasma y Chlamydia). Por lo que es indicada para el tratamiento de enfermedades producidas por este tipo de bacterias como son neumonía, sinusitis, infecciones urinarias, infecciones en la piel y tejidos blandos.¹¹

Las Quinolonas son un grupo de antibióticos de amplio espectro. La mayor parte de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las fluoroquinolonas, caracterizadas por tener un grupo fluoruro en el anillo central, normalmente en posición 6.⁵

Las quinolonas son los antimicrobianos que han tenido un mayor desarrollo en los últimos años. Después de obtenerse el ácido nalidíxico, en 1962, se desarrollaron varios compuestos con características muy similares, que solo se establecieron como antisépticos urinarios, y que constituyeron la primera generación de quinolonas, hasta que en 1978, mediante la adición de un grupo piperacilil en posición 7 y un átomo de flúor en posición 6 comenzó a desarrollarse un conjunto de agentes antibacterianos llamados piperacililfluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas. El primero de ellos fue el norfloxacin, con el cual se logró una mayor actividad antimicrobiana del grupo y su uso sistémico.⁵

Desde entonces se han sintetizado e investigado gran número de quinolonas, buscando incrementar su actividad y espectro de acción y reducir sus efectos adversos.⁵

¹¹ (Francesc Puigventós, 2000)

⁵ (Cué Manuel, 2005)



Mecanismo de acción:

Este grupo de quimioterápicos que produce un efecto bactericida penetra en las bacterias a través de las porinas, no afectándoles la integridad de la pared celular, dentro de las células inhiben la encima que prepara el ADN para la transcripción de ADN girasa (por ello se las denomina “inhibidores de la girasa”).¹⁴

Esta encima está compuesta de cuatro subunidades (dos A y dos B), y la responsable del enrollamiento de las bandas de ADN, actúan interfiriendo en la síntesis de ADN al bloquear la reacción de superenrollamiento de pendiente de ATP y catalizada por la girasa; esta encima es también responsable de otras actividades necesarias para la integridad del ADN como son la unión y separación de las bandas que la componen.¹⁴

Además a concentraciones mayores para inhibir a la Topoisomerasa II encima cuya secuencia de aminoácido presenta una homología con la girasa y cuyo papel es también de gran importancia en el superenrollamiento del ADN.¹⁴

La acción bactericida se observa principalmente en el caso de las Fluorquinolonas, siendo además bifásica para cada quinolona existe una concentración bactericida máxima por encima de la cual la actividad disminuye, pero que vuelve a aumentarse si se incrementa más la concentración. Esta característica parece que se explica por el hecho de que con ciertas concentraciones la acción bacteriostática impide la síntesis de proteínas que participan en una acción bactericida.¹⁴

¹⁴ (Jesus, 2005)



Acción farmacológica de interés terapéutico.

Actividad antibacteriana:

Presentan un amplio espectro antibacteriano dirigido principalmente contra las bacterias gram negativas, pero los nuevos compuestos 4-quinolonicos actúan también frente a bacterias gram positivas, algunos anaerobios y micobacterias.⁵

Las modernas fluorquinolonas tienen un espectro más amplio: *Pseudomonasaeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, varios *Staphylococcus* (incluyendo cepas productoras de B-Lactamasas), *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Gardnerella Vaginalis*, *Legionella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria Monocytogenes*, *Chamydia* y *Mycoplasma*.⁵

Las fluorquinonas son también activas sobre micobacterias. Ciprofloxacino, Ofloxacino y Sparfloxacino son activos sobre *Mycobacterium tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* y algunas cepas *M. chelonae*; en general su actividad es reducida por *M. avium-intracellulare*. La duración del efecto postantibiotico de las quinolinas varía entre una y dos horas, aumentando con el incremento de la concentración plasmática y el tiempo de exposición a estos antibióticos.⁵

Características farmacocinéticas:

Las quinolonas de primera generación se caracterizan por presentar todas ellas buena absorción tras su administración oral, con una biodisponibilidad que oscila entre el 50 y el 80 %. También las fluorquinolonas se absorben bien por vía oral, alcanzando su T_{máx} al cabo de 1-3 horas; pero existen diferencias entre ellas respecto a su velocidad de absorción y al porcentaje de dosis absorbida. Aunque la presencia de alimentos no reduce

⁵ (Cué Manuel, 2005)



de forma significativa la absorción oral de las quinolonas en general, puede retrasar el tiempo necesario para alcanzar la concentración plasmática máxima.⁵

La absorción del levofloxacino es prácticamente completa por lo que las concentraciones plasmáticas se alcanzan tras la administración oral similares a las logradas tras la administración intravenosa. La absorción oral esta interferida por las sales de aluminio o magnesio, por lo que deben administrarse en tiempos diferentes.⁵

El escaso porcentaje de unión a proteínas que presentan la mayoría de las fluorquinolonas el bajo grado de ionización y la elevada solubilidad en agua favorecen su transporte al territorio extravascular, alcanzando concentraciones incluso superiores a las plasmáticas en muchos tejidos (mucosa bronquial y gástrica, riñón, pulmón y líquido sinovial); la concentración que logran en esputo, piel, músculo, útero o saliva es superior al 50 % de la plasmática, siendo sólo inferiores las concentraciones en LCR, grasa y ojo.⁵

Las fluorquinolonas atraviesan la placenta y se concentran en el líquido amniótico. Se eliminan por la leche, por lo que deben evitarse durante la lactancia. Existen diferencias notables en el grado de metabolismo hepático que sufren las fluorquinolonas se eliminan parcialmente por metabolismo hepático y parcialmente por el riñón. En el hígado, la biotransformación ocurre fundamentalmente por reacciones de oxidación en las que intervienen enzimas del sistema citocromo P-450. Tanto los metabolitos como el fármaco sin modificar pueden encontrarse en la orina y en la bilis; algunos sufren circulación entero hepática, encontrándose en las heces en concentraciones elevadas.⁵

⁵ (Cué Manuel, 2005)



El aclaramiento renal del Norfloxacin, Ciprofloxacino, Ofloxacino, Enoxacin y lomefloxacino ocurre por filtración glomerular y secreción tubular activa. El 15% aproximadamente de la dosis de Ciprofloxacino administrada por vía intravenosa se elimina por secreción transintestinal.⁵

La semivida de eliminación varía, oscilando para las fluorquinolonas entre 4 y 14 horas; para el Ciprofloxacino, el Ofloxacino, el Norfloxacin y el Enoxacin es de 5-7 horas, mientras que para el Pefloxacino alcanza unas 12 horas aproximadamente. Las fluorquinolonas son poco dializables.⁵

Reacciones adversa:

La reacción adversa más importante y limitante para su uso, es que afectan el desarrollo del cartílago y por ello están contraindicadas en los niños, adolescentes, embarazadas y mujeres en lactancia.⁵

La incidencia general de efectos adversos es baja (8-10 %) y en su mayoría de carácter leve. Todas las quinolonas, tanto las de primera como de segunda generación, pueden originar molestias gastrointestinales. Las alteraciones hematológicas más frecuentes son leucopenia, eosinofilia o trombocitopenia. Con el Ácido Nalidíxico se han descrito casos de depresión medular. En pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-PD) pueden producir hemólisis y anemia.¹⁴

Efectos gastrointestinales: El efecto adverso más común se ha localizado en el tracto gastrointestinal, fundamentalmente náuseas, dolor abdominal, dispepsia, pérdida de apetito y diarrea.⁵

¹⁴ (Jesus, 2005)

⁵ (Cué Manuel, 2005)



Sistema nervioso central: Los efectos suelen ser mareos, cefalea, inquietud, depresión, insomnio, somnolencia, confusión, fatiga, agitación y temblores, excepcionalmente pueden presentarse reacciones psicóticas, alucinaciones y convulsiones.⁵

Reacciones dérmicas: Durante el tratamiento con quinolonas pueden observarse reacciones cutáneas de hipersensibilidad que incluyen eritema, prurito y urticaria.⁵

Alteraciones analíticas: Pueden producir aumento transitorio de la aminotransferasa, leucopenia transitoria leve y eosinofilia, y ocasionalmente también, elevaciones del nivel de las transaminasas y neutropenia.⁵

Alargamiento del intervalo QT en el electrocardiograma: Pueden ocasionar arritmias ventriculares fatales. Este efecto adverso ha sido reportado con las FQ más modernas (Levofloxacino, Moxifloxacino, Flerofloxacino, Trovafloxacino).⁵

Interacciones medicamentosas:

La concentración sérica de las quinolonas puede disminuir en 25-90 %, cuando entre las 2-4 h de su administración oral se ingieren productos que contienen sucralfato o sales de calcio, aluminio, magnesio, hierro o cinc, como las que se hayan en antiácidos, suplementos nutricionales o suplementos minerales. La presencia de otros medicamentos puede alterar el perfil sérico de las quinolonas, tal es el caso de los bloqueadores H₂, que retrasan la absorción, y la metoclopramida, que eleva precozmente los niveles máximos de ciprofloxacino. La eliminación metabólica se inhibe y aumentan sus niveles séricos si se administra junto con teofilina.⁵

⁵ (Cué Manuel, 2005)



Las quinolonas pueden incrementar el efecto anticoagulante de la warfarina y el riesgo de convulsiones y de estimulación del sistema nervioso central al usarse concomitantemente con antiinflamatorios no esteroideos, así como hipoglucemia y/o hiperglucemia al usarse con antidiabéticos orales o con insulina.⁵

VALIDACION

1. GENERALIDADES DE GRAN IMPORTANCIA:

- Definición, importancia, y necesidad de validación.

1.1. Definición

El término validación ha sido definido en las literaturas, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo:

- ❖ Especificar e implementar.
- ❖ Aprobar.
- ❖ Documentar.

La validación se puede llevar a cabo de diferentes formas esto depende del laboratorio, de la habilidad los objetivos y alcances planteados por el analista a esto se agrega el uso del método; además el analista debe conocer e interpretar resultados esperados y a su vez definir el nivel de confianza siendo el laboratorio que desarrolla o aplica el método el responsable del proceso de validación.¹

⁵ (Cué Manuel, 2005)

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)



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

Veamos cuatros de las definiciones posibles de 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.(según las normas de correcta fabricación (edicion99)).¹
- La confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.⁹ (IRAM 32).⁹
- Proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas.¹²
- Es el establecimiento de la evidencia documental 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 la calidad previamente establecido.¹

⁹ (Eurachem Guide, 1998)

¹² (Garcia, 2009)

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)

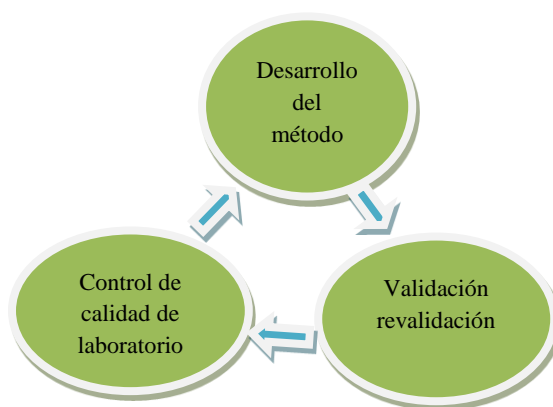


- Dentro de estas tres definiciones antes mencionadas cabe destacar las siguientes palabras claves para llevar a cabo una validación:

- a) Establecer un método que permita cuantificar mi analito en forma de materia.
- b) Confirmar su desempeño por medio de tratamiento estadístico y apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general.

Por lo que esta manera es de suma importancia una correcta validación ya que debe plantearse las condiciones de un análisis donde se asegura que los datos obtenidos cumplan en su totalidad deseada, así nos proporciona seguridad y respaldo obteniendo los criterios para rechazo o re análisis de lecturas anómalas.¹²

Donde observaremos en la siguiente figura como en teoría una validación se encuentra relacionada con el desarrollo del método y el control de calidad.



En el caso de métodos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación a la USP de un método analítico revisado o utilización de un método general establecido con un nuevo producto o materia prima.

¹² (Garcia, 2009)



Los documentos de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH) aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.¹²

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)¹

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).¹

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

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

Cualificación: es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (maquina, equipo, instrumento, etc.).

Calibración: Conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento de

¹² (Garcia, 2009)

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)



medida y los correspondientes valores conocidos de una magnitud física medida a través de patrones.¹

➤ **Necesidad de validar.**

Eurachem una red de organizaciones en europea con el objetivo de establecer un sistema de trazabilidad internacional de laboratorios de las mediciones químicas y la promoción de prácticas de buena calidad propone los principios siguientes:

- 1) Cuando la medición analítica es importante (costo, salud, remediación, legal, etc.)
- 2) Debe existir un aseguramiento independiente y periódico del desempeño de las técnicas del laboratorio.
- 3) Por la obligación profesional del analista de manera que garantice la confiabilidad de los resultados.

➤ Las mediciones analíticas deben realizarse usando métodos y equipos evaluados (cualificados), y así asegurar que estos son adecuados para su propósito.⁹

➤ **Razones que justifican la validación de métodos analíticos.**

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)

⁹ (Eurachem Guide, 1998)



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.¹

Cuando realizar una validación de un método.

La validación es un proceso que asegura el mejoramiento de la calidad de los productos en los laboratorios y además de esto confiere una gran confiabilidad a los resultados formando parte de un ciclo cada modificación que se realiza a los métodos.

- 1) Cuando se necesita verificar que sus parámetros de aptitud son adecuados para usar para un problema analítico particular.
 - 2) Cuando se desarrolla un método nuevo.
 - 3) Cuando el control de calidad indica que el método en uso está cambiando con el tiempo.
 - 4) Cuando se usa un método ya establecido en un laboratorio diferente o con diferente analista o con diferente instrumental.
- El proceso de validación está limitado por el alcance que se requiere, es importante definir bien los objetivos iniciales y el alcance que tendrá y de esta forma optimizar los ensayos es de anotar que en un proceso de re-validación no es necesario realizar todo el proceso de validación, en ocasiones solo es necesario realizar el correspondiente análisis de robustez y precisión.⁹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)

⁹ (Eurachem Guide, 1998)



➤ **Para iniciar la validación es necesario previamente:**

- 1) Tener perfectamente caracterizado el analito.
- 2) 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 acerca 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.⁷

➤ **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

⁷ (Delgado, Julio del 2008)

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Clasificación de métodos analíticos.

Según las normalización y estado de desarrollo del método.

Métodos estándar o normalizados.

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; de referencias legales; métodos publicados por la FDA (food and drug administration), y que se ejecutan tal y como se describe en la norma.

Estos métodos incluye aquellos publicados por:

- United States Pharmacopeia (USP)
- Nacional formulary (NF)
- Homeopathic Pharmacopeia of the United states
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical chemists (AOAC)
- International conference of harmonization (ICH)
- Pharmacopeia britannica (BP)
- Farmacopea internacional (FI)
- Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales se usan. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para garantizar asegurar una aplicación consistente.

USOS DE LOS ESTANDARES DE REFERENCIA

USP

Los usos oficiales y autorizados de los Estándares de Referencia USP se especifican en las monografías USP y en los Capítulos Generales e incluyen los siguientes:

- Usos cuantitativos en valoraciones para fármacos y formulaciones, pruebas de límite, o blancos y controles.



- Usos cualitativos, como por ejemplo pruebas de identificación, pruebas de aptitud del sistema, marcadores de picos cromatograficos, etc.
- Calibradores y estándares de desempeño, como por ejemplo calibradores de disolución, estándares de punto de fusión, conjuntos de conteo de partículas.²⁴

Métodos desarrollados por los laboratorios.

En ocasiones cada laboratorio elabora sus propios métodos. Esto puede deberse a que el análisis o el analito es muy específico y se debe de evaluar un ejemplo sería una matriz especial que es de solo interés para el laboratorio. Por consiguiente el laboratorio está en la necesidad de evaluar la capacidad de los analistas, equipos y demás recursos que se encuentren relacionados con el método en cuestión por lo que los métodos deben estar debidamente validados documentados y autorizados para ser aplicados.

En cuanto en la evaluación de la capacidad del método se sugiere realizar comparaciones con otros métodos normalizados. En lo posible se recomienda utilizar materiales de referencia, estándares.

➤ **Métodos no normalizados.**

Los métodos no normalizados son aquellos que no han sido publicados por fuentes autorizadas y/o validadas. Es muy probable que los métodos sin normalización no dispongan de datos validación o estudios colaborativos fiables o suficientes, por lo que se recomienda realizar una validación cuanto sea posible. Para de asta manera garantizar la confiabilidad del método en dado caso que el método sufra cambios se requerirá una revalidación del método.

²⁴ (The United States Pharmacopeial Convention USP 30 NF 25, 2007)



Según categoría de metodología.

Los métodos también pueden agruparse y clasificarse según su ámbito en el cual serán usados estos pueden agruparse en cuatro categorías generales:

Categoría I:

Para la cuantificación de materia o principio activo en producto terminado.

Categoría II:

Para determinar impurezas en materia prima o compuestos de degradación en producto terminado; o para análisis de residuos en material biológico o alimentos.

Categoría III:

Para determinar las características de funcionamiento como disolución o liberación de droga en el organismo.

Categoría IV:

Pruebas de identificación.

La validación de metodologías analíticas se fundamenta en la determinación de estos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Según la USP XXXIV las metodologías se clasifican en cuatro categorías para su validación y está indicara que parámetros deben evaluarse.¹⁸

¹⁸ (Morales de La Cruz, 2003)



Parámetros de desempeño requeridos para la validación de los métodos analíticos.

| Parámetro de desempeño Analítico | Categoría I | Categoría II | | Categoría III | Categoría IV |
|----------------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|--------------|
| | | Cuantitativa | Cualitativa | | |
| Selectividad | SI | SI | SI | * | SI |
| Exactitud | SI | SI | NO | * | NO |
| Precisión | SI | SI | NO | SI | NO |
| Límite de Detección | NO | NO | SI | * | NO |
| Límite de Cuantificación | NO | SI | NO | * | NO |
| Linealidad | SI | SI | NO | * | NO |

*puede requerirse dependiendo de la prueba.

➤ **Selección y validación de métodos. ISO/IEC 17025**

Pasos para la validación

- Desarrollar un protocolo de validación o procedimiento operacional para la validación.
- Definir la aplicación, propósitos y alcance del método.
- Definir los parámetros de idoneidad y los criterios de aceptación.
- Definir los experimentos de validación.



- Verificar las características relevantes de desempeño de los instrumentos.
- Calificar los materiales, es decir, estándares y reactivos.
- Llevar a cabo los pre-experimentos de validación.
- Ajustar los parámetros del método y/o los criterios de aceptación si es necesario.
- Realizar los diferentes experimentos de validación (internos y externos).
- Desarrollar los PNT para el empleo del método en análisis de rutina.
- Documentar los experimentos de validación y los resultados en un experimento de validación.

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 aquéllos para los que fuera redactada la monografía.⁸

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.⁸

Principios activos de síntesis

Los métodos oficiales o de Farmacopea serán considerados validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquéllos para los que fuera redactada la monografía.¹³

⁸ (Esteban., Agosto 2009)

¹³ (Harvey, 2000)

²³ (The United States Pharmacopeia Conventionl USP XXXIV-NF29 Volumen 3, 2011)



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.²³

Pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades de diferentes tipos, 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.²

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.¹⁷

Características del desempeño del método

Han de evaluarse los parámetros 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.⁶

² (British Pharmacopoeia Volume I & II, 2009)

¹⁷ (Marunata, 2004)

⁶ (Daniel)



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 junto con la robustez.

La estabilidad de las disoluciones de la muestra, 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 periodos 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.

La forma de evaluación de este parámetro en los métodos espectrofotométricos por UV-visible consistirá en realizar tres replicadas que serán sometidas bajo diferentes condiciones una a congelación otra a temperatura ambiente y una más protegida de la luz de una misma muestra a lo largo del tiempo que se considere necesario.¹⁵

Características de idoneidad

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.

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

¹⁵ (Kenneth.A)



requerimientos y parámetros a evaluar en un ensayo de idoneidad dependerán del tipo de método.²⁰

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.³

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.³

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.

Especificidad: Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.³

²⁰ (Skoog D.A, 1994)

3 (C., 2002)



En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable.

- 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.³

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 intra-ensayo).

Precisión intermedia: Evalúa la precisión frente a variaciones de analista, equipo y día (precisión intra-laboratorio o precisión inter-ensayo).

Reproducibilidad: Evalúa la precisión entre laboratorios (precisión inter-laboratorios).

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

³ (C., 2002)



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.²²

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.²²

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.²²

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE VALIDACIÓN

Linealidad y rango

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.¹

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.¹

²² (the european agency for the evaluation of medical products Human Medicines Evaluation Unit)

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



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. En el proceso lógico consistiría en evaluar cuáles son los límites de

Concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, tomando en cuenta las especificaciones y la técnica empleada.¹

Función respuesta

Calibración

La calibración es el proceso que comprende:

- Preparar y analizar una serie de estándares.
- Determinar los valores de respuesta (datos primarios).
- Encontrar el modelo estadístico para ajustar los datos y predecir la concentración de un analito en una muestra.¹

Ámbito de aplicación

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.¹

Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es preciso realizar una comprobación estadística de los datos además de inspección visual

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



preliminar que se debe realizar a la regresión lineal, es importante verificar estadísticamente la linealidad ya que a partir de ella se realizara las mediciones de los diferentes parámetros y la aleatoriedad de los valores residuales.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° de réplicas = 3) con un total de 15 determinaciones ($n=15$) Por ejemplo; 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico.¹

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.²²

| | |
|---|-------------------------------|
| 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 |

²² (The European Agency for The Evaluation Of Medical Products Human Medicines Evaluation Unit)



Sensibilidad

Cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el cambio en el estímulo correspondiente (ejemplo de estímulo: cantidad de mesurando presente) (IUPAC)

Es el cambio de la respuesta del instrumental que se corresponde con el cambio de la concentración del analito. Dentro del rango lineal de un método, si se intercepta la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en la fórmula de cuantificación.

A veces se usa la sensibilidad para referirse al límite de detección del equipo, pero esto no se aprueba generalmente.⁹

Pasos para cálculo de sensibilidad:

- Preparar estándares a diferentes concentraciones, mínimo 3 puntos para respuestas lineales y mínimo 5 para poli nómicas, preferiblemente usando alícuotas de una misma solución.
- Analizar las muestras y graficar la curva de calibración.
- Realizar una regresión lineal o polifónica según el caso.
- Registrar la pendiente para una regresión lineal, o las derivadas evaluadas para cada punto de la calibración.

⁹ (Eurachem Guide, 1998)



LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Definición y generalidades

Se entiende por límite de cuantificación (LC) dedicho 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, QZA).¹

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, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.¹

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. 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.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



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 cuál es el interés en su determinación; es decir, qué aporta a la validación del método establecer dichos límites.¹

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. Esto 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.¹

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 unas de ellas.¹

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 solo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



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.

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 inter-laboratorio).

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 óptimo a seguir de entre los posibles.¹

IDONEIDAD DEL SISTEMA

Definición

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema, (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. En la práctica, podría equipararse a una cualificación del proceso analítico (PQ) o una "revalidación en continuo", ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo, el conjunto del sistema, continúa siendo "válido" para el propósito para el que fue concebido.¹

Ámbito de aplicación

El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. Por ejemplo, en procedimientos analíticos volumétricos se incluye la evaluación del blanco y una precisión de los resultados obtenidos. Sin embargo, es en las técnicas cromatográficas donde éste tipo de pruebas se emplean con mayor asiduidad.¹

Procedimiento de determinación de la idoneidad

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.¹

Los requisitos que debe cumplir el método analítico se establecen desde la primera fase de desarrollo, aunque en esos momentos no es posible concretar la prueba que permitirá comprobarlos. Durante este período será suficiente el registro de la evolución de los distintos parámetros analíticos a lo largo del tiempo y la comprobación de la precisión del sistema realizando medidas repetidas de una misma preparación de muestra.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Posteriormente, los resultados del estudio de robustez permitirán adquirir el conocimiento necesario para establecer los factores críticos y el impacto que éstos han tenido sobre el comportamiento del método. Este es el momento de diseñar las pruebas a realizar y establecer los criterios que permitan asegurar que los requisitos establecidos se cumplirán más allá del momento concreto en el que se lleva a cabo la validación propiamente dicha.¹

Los ensayos de idoneidad del sistema que se establezcan vendrán dados por el conocimiento adquirido del método y la viabilidad de su empleo en rutina debiendo corresponderse con los valores mínimos para los que los parámetros estudiados permanecen dentro de las especificaciones establecidas.¹

Estos ensayos no sólo demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también permiten establecer el criterio por el que modificar las condiciones analíticas descritas en el procedimiento con el fin de alcanzar la idoneidad. Estas modificaciones se encontrarán siempre dentro de unos límites establecidos durante el estudio de robustez.¹

El procedimiento de realización del test de idoneidad, así como sus criterios de aceptación deben encontrarse perfectamente establecidos dentro del método de análisis, indicando las acciones a realizar en caso de no cumplirse.¹

Precisión del test de idoneidad del sistema

Se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos tras el análisis de una serie de replicados de una muestra.

La precisión es el parámetro de más amplia aplicación para la evaluación de la idoneidad del sistema. Aunque habitualmente se estudia sobre las absorbancias, también puede evaluarse sobre los espectros. Este último permite dar una idea de la estabilidad del



sistema en un momento determinado aunque será difícil utilizarlo como un referente entre días, porque sus cambios no tienen por qué afectar al resultado obtenido.¹

PRECISION

Proximidad entre valores de una magnitud obtenidos por mediciones replicadas, en condiciones específicas (IRAM 34552-1).⁹

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.¹

Las dos medidas de precisión más comunes son repetibilidad y reproducibilidad, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener.

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.¹

Repetibilidad: La más pequeña precisión esperada. Da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista en un mismo equipo a lo largo de un periodo de tiempo corto.⁹

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).¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)

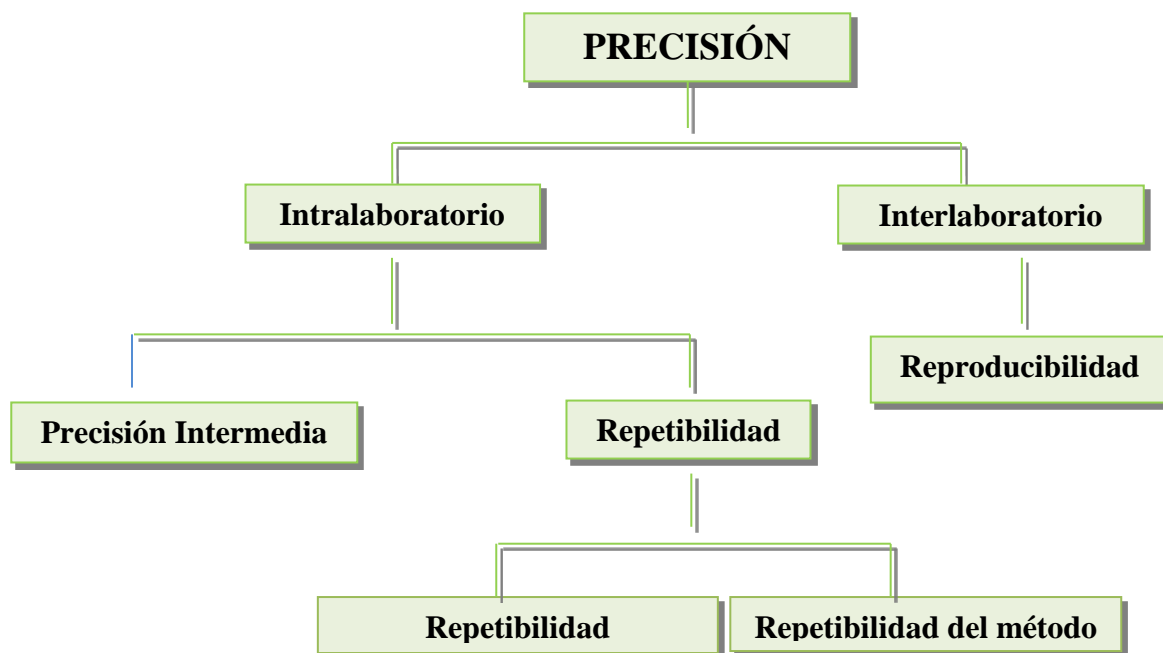
⁹ (Eurachem Guide, 1998)



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.¹

Reproducibilidad: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.¹

Organización jerárquica de estos niveles



La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de una serie de medidas.



Factores que inciden en la precisión

| Z | Repetibilidad | Precisión intermedia | Reproducibilidad |
|--|---------------|----------------------|------------------|
| Instrumento | Igual | Diferente | Diferente |
| Tiempo entre análisis | Igual | Diferente | Diferente |
| Analista | Igual | Diferente | Diferente |
| Laboratorio | Igual | Diferente | Diferente |
| Otros factores (reactivos, condiciones ambientales, columnas cromatográficas etc.) | Igual | Igual | Diferente |

Otros factores que influyen son los siguientes:

- Instrumentos de características diferentes o diferentes tecnologías.
- Variación de detalles experimentales no especificados en el método.
- Equipos de diferente antigüedad.
- Celdas diferentes calidad.
- Disolventes y reactivos de diferente calidad.
- Estado del equipo y condiciones del equipo.¹

Ámbito de aplicación

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

¹ (Asociación española de la industria farmacéutica de la industria-AEFI, 2001)



tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.¹

Repetibilidad

La Repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas. 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.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

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas.¹

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

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.¹

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

Un mínimo de seis muestras a la concentración nominal.

Un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).¹

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.¹

Como mejorar la precisión.

- Empleando un método de medida fisicoquímico más preciso.
- Empleando estándares de calibración cuyo valor medido sea igual a la concentración de la muestra.
- Realizando más réplicas de medida de la muestra.
- Incrementando el número de estándares de medida.

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

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



analista, el instrumento, etc. 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.¹

EXACTITUD

Definición y generalidades

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo. Es decir 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.¹

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar de referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.¹

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método.¹

Se recomienda que la exactitud se calcule después de que la precisión, linealidad y la selectividad hayan sido establecidas.

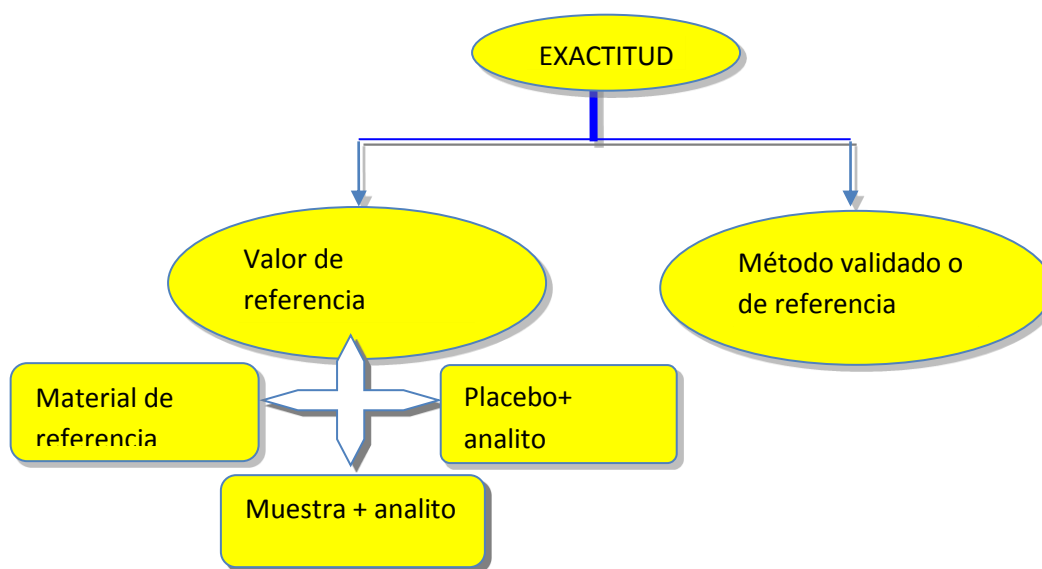
No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



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.

Existen dos procedimientos en general para determinar la exactitud de un método. El primero y más común; es realizar la comparación contra un material de referencia, que puede ser un estándar trazable, un placebo o una muestra con una cantidad de analito conocida. El segundo método es comparar los resultados con otra técnica aún más exacta o que por consenso común es referencia (métodos oficiales), este caso se usa cuando no existen materiales de referencia certificados o trazables.¹



Ámbito de aplicación.

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.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Procedimientos de determinación de la exactitud.

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo tres determinaciones por tres niveles de concentración, que podrían ser la 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:

La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación (ver ecuación) 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.¹

El uso de materiales de referencia o estándares está dado según los siguientes criterios:

- Material de referencia o patrones certificados: se usan para validación de métodos a largo plazo. Su uso no es extensivo.
- Estándares: utilizados en los cálculos de exactitud a corto plazo, verificaciones y estudios no críticos.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Expresión matemática de la exactitud

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{X_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Diferencia} = X_m - \mu$$

Dónde:

X_m = valor medio hallado

μ = valor aceptado como verdadero

Donde X_m es el valor medio encontrado y μ es el valor aceptado como verdadero.¹

En dependencia al del tipo método que se valide se deberá tener en cuenta una serie de factores de trabajo a diferentes concentraciones:

Riqueza de un principio activo.

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.¹ No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, en muchos casos no existen patrones de referencia certificados por un organismo.

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Oficial, como los patrones del NIST (National Institute of Standards and Technology) o los suministrados por las diferentes Farmacopeas (EP, USP Sandards, BP Standards) entonces la evaluación de la exactitud puede llevarse a cabo por comparación con un método de referencia validado como se describe más adelante.¹

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.

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 estándar sobre el problema.¹

Método del placebo cargado

Se prepara un placebo que contiene todos los ingredientes menos el analito, es decir, que sea la misma matriz. A este se agregan cantidades conocidas de analito, mínimo tres niveles y tres repeticiones a cada uno. Se calcula la recuperación. Este método puede presentar cierto grado de incertidumbre y constituye solo una aproximación a la muestra en casos reales.¹

El probable problema que se presente en placebo cargado es como se introduce el analito al placebo ya que el producto terminado el analito y sus excipientes se encuentran

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)



íntimamente mezclados por lo que el porcentaje de recuperado de analito en esta prueba podría ser mayor al del producto terminado.¹

Método de adición estándar

Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga el analito. Se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo tres 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.¹

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.¹

SELECTIVIDAD

Definición

Capacidad de un método analítico para medir e 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

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



pocos métodos que den respuesta solo 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 el de una u otra forma.¹¹

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. 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.¹ Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)

¹¹ (Francesc Puigventós, 2000)



potencialmente presentes en la muestra, así como sobre posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.¹

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 qué punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles.¹

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 vinculadas 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 la selectividad variará su planteamiento según el objetivo y la técnica analítica aplicada.¹

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)



Según objetivo del ensayo

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

Ensayos de impurezas.

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

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Determinación cuantitativa de la 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.

Según la técnica analítica aplicada.

Ensayos específicos.

Como se ha indicado anteriormente se considera apropiado reservar este término para aquellos métodos analíticos que proporcionen un 100% de selectividad. Este tipo de métodos representaría la situación ideal aunque en el análisis farmacéutico actual su utilización no es muy común.¹

Ensayos absolutos

El uso de métodos de valoración no específicos se debe combinar con la utilización de otros procedimientos analíticos para demostrar la idoneidad del análisis, como por ejemplo una valoración potenciométrica combinada con un test de impurezas.¹

Ensayos separativos

Son los ensayos de más amplia aplicación en la industria farmacéutica actual aunque hay que recordar que no están libres de interferencias. Por ejemplo, en cromatografía líquida no es suficiente para asegurar la selectividad del ensayo con determinar el tiempo de retención.¹

Una vez demostrada la selectividad del método se puede prescindir de la técnica complementaria. El método seguirá siendo válido mientras se aplique a muestras

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



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

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.¹

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método como se muestra a continuación:

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 evaluara a qué nivel se producen y si es preciso modificar el método o añadir alguna técnica complementaria.¹

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

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



| Determinaciones para la forma farmacéutica | Determinaciones para la materia prima |
|---|---|
| Matriz | Blanco |
| Analito | Analito |
| Matriz + Analito | Otras sustancias similares |
| Matriz + Analito + Impurezas + Productos de degradación. | Analito + productos de degradación + impurezas. |

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. Agente estabilizante) y las interferencias a su límite máximo establecido.¹

ROBUSTEZ

Definición

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.¹

La robustez (Robustness) no debe confundirse con el término Ruggedness. Este último no se menciona en las guías ICH, pero sí en la Farmacopea USP. Ésta define el término Ruggedness como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones tales como diferentes laboratorios,

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



diferentes analistas, diferentes instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, diferentes temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones habituales de laboratorio a laboratorio.

Da una idea de la influencia que tienen las variables ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que podría asimilarse al término reproducibilidad.¹

Ámbito de aplicación

Aunque tanto las guías ICH como la USP definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, no es considerado, todavía, un requisito necesario para registro de especialidades, sino que se trata de un estudio que surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provocaba serias dificultades en la equivalencia entre los resultados de ambos centros de análisis, de modo que con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de análisis.¹

Por esta misma razón, las guías ICH recomiendan incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero.¹

Incluso después de realizar el estudio de robustez podría concluirse que se debe modificar algún parámetro del método, obligando a la consiguiente revalidación de los puntos

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



necesarios. Se considera por tanto que antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar, es recomendable hacer un estudio de robustez de forma que una vez fijados los márgenes en los que el método es robusto, se pudieran incluir éstos como parte del método final, dotándolo así de una cierta flexibilidad.¹

Es decir se tendría una justificación válida que apoyaría la modificación de ciertos parámetros en el caso de que fuera necesario, por ejemplo a la hora de cumplir una idoneidad del sistema en cromatografía. Por el contrario, en el caso de los factores más críticos, debe hacerse mención especial de la importancia que tiene ajustar el valor o seguir el procedimiento al pie de la letra.¹

De hecho la consecuencia directa de los resultados del estudio de robustez ha de ser la definición razonada del test de idoneidad del método, que en muchas ocasiones es fijado de una forma arbitraria y sin saber a ciencia cierta si los requisitos que impone son realmente necesarios o limitan la realización del método a unas condiciones escasamente reproducibles.¹

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. Algunos pueden tener muchos parámetros sobre los que actuar y otros menos. Además éstos no tienen por qué ser sólo factores relacionados con la medida final, sino que pueden ser de cualquier etapa del procedimiento analítico, como por ejemplo la preparación de la muestra. Por esto, la primera etapa del estudio es precisamente analizar todo el método y definir qué factores son los que se espera que influyan más en el resultado final.¹

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



Procedimiento de determinación de la robustez

Factores y niveles de influencia

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, qué parámetros se van a medir en cada ensayo.¹

En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable sobre la concentración de analito calculada. El estudio de la influencia sobre varios parámetros nunca implica la realización de más ensayos, sino que se puede hacer a partir de los mismos.¹

Los factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tantos factores cuantitativos (ej. influencia del valor de pH, del valor de temperatura, como cualitativos (ej. fabricante de la celda de validación, fabricante de un determinado reactivo, etc.).

Factores que pueden variarse para la técnica analítica UV-VIS para determinar la robustez del método

1. La celda de validación.
2. El equipo UV-vis.
3. El solvente.
4. La longitud de onda.¹

Determinación experimental de la robustez

La robustez de un método está decidida a encontrar la influencia de las fluctuaciones leves de las condiciones de un determinado método analítico sobre el resultado de la

¹ (Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI, 2001)



determinación final. La robustez permite identificar las variables que tendrían un efecto significativo en el desempeño de un método de análisis dado. Cuanto mayor es la influencia de pequeños cambios en los parámetros en los procesos de medición en los resultados en la determinación final, mayor será las desviaciones del método.

Es por eso que la robustez es un parámetro relativo en los cambios de las condiciones internas. Sin embargo, la resistencia (flexibilidad) es un parámetro que describe la utilidad de un determinado método de análisis en diferentes condiciones, y puede ser estimado a partir de la reproducibilidad.¹

Espectrofotometría

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.²⁰

Espectro:

Se define como una representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia.¹

Los espectros pueden ser:

¹ (Asociacion Española de la Industria Farmaceuticos de la Industria-AEFI, 2001)



Emisión, que se obtienen excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética.

Absorción, obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda.

Espectrofotometría: Es un método de análisis que hace uso de la intercalación entre la materia y la energía radiante la cual se refiere a como las onda electromagnética se propagan y transporta sin transferencia de materia.²⁰

Espectrofotómetro: es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.²⁰

Principio de la espectrofotometría:

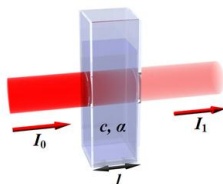
Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe radiación de longitudes de ondas que no pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del infrarrojo

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.¹⁹

²⁰ (Skoog D.A.)

¹⁹ (Shields)



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.¹⁹

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.²⁰

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.²⁰

Además, no está de menos mencionar el hecho de que la absorción y transmitancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida.²⁰

Los componentes básicos de un espectrofotómetro son:

Fuentes.

Lámparas de deuterio e hidrógeno. La excitación eléctrica de deuterio o hidrógeno a baja presión produce un espectro continuo en la región UV, que es utilizable en la región de 160 a 375 nm. Puesto que el vidrio absorbe fuertemente a longitudes de onda menores que 350 nm, las lámparas de deuterio requieren la utilización de cubetas de cuarzo.²⁰

²⁰ (Skoog D.A.



Lámparas de filamento de tungsteno. Es la fuente más común de radiación visible e infrarrojo cercano, se utiliza en la región de longitud de onda de 350 a 2500 nm.

Selectores de longitud de onda.

Es la parte más importante del equipo, determinando en gran parte su calidad. Son dispositivos que filtran el espectro producido por la fuente, dejando "pasar" sólo radiaciones en un rango de longitud de onda determinada.²⁰

Filtros de absorción.

Sirven para la región visible del espectro y funcionan absorbiendo ciertas zonas de éste. El tipo más usual es un vidrio coloreado o una suspensión de gelatina entre dos placas de vidrio. El ancho de banda proporcionado por este tipo de filtros es bastante ancho (30-250 nm).²⁰

Filtros de interferencia.

Proporciona bandas de radiación bastante más estrechas que el filtro de absorción. Su funcionamiento se basa en la interferencia óptica, esto es, la interferencia destructiva entre la radiación que se quiere eliminar.²⁰

Monocromadores.

Son superiores en calidad a los filtros. Existen dos tipos, los de red y los de prisma. Los principios de su funcionamiento están fuera de los alcances de esta guía.²⁰

Recipientes para la muestra.

Las celdas o cubetas que contienen la muestra deben fabricarse de un material que no interfiera con la radiación que estamos utilizando. Para la región del ultravioleta (bajo de

²⁰ (Skoog D.A.)



350nm) necesitamos cubetas de cuarzo. Tales cubetas son sumamente costosas, por lo tanto se deben manipular con extremo cuidado. En la región entre 350 y 2000 nm se utilizan cubetas de vidrio de silicato. El plástico se puede utilizar para el visible (400-800nm). El ancho más común de una cubeta es de un centímetro.²⁰

La calidad de los datos de absorbancia depende de manera crítica de la forma en que se usen y mantengan las cubetas. Las huellas dactilares, la grasa o la suciedad en las paredes alteran de forma notable las características de transmisión de una cubeta. La superficie de las ventanas no debe tocarse durante su manipulación. Las cubetas no se deben frotar ni limpiar con abrasivos.²⁰

Detector de radiación y procesador de señales.

El detector es un transductor que convierte la energía radiante en una señal eléctrica. El procesador es un dispositivo que amplifica la señal electrónica que recibe del detector. Algunos pueden realizar operaciones matemáticas con la señal, tales como diferenciar, integrar o convertir en logaritmo.²⁰

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.²⁰

Por ejemplo, retomando el ejemplo de los vasos, pero ahora, pensemos que ambos tiene 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 moléculasy son absorbidos por estos; de la misma forma que se explicó en la ley de Beer.²⁰

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.¹⁹

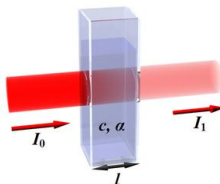
Ley de Beer

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

Si hacemos incidir un haz de luz paralela sobre una solución de una especie absorbente de concentración c contenida en una cubeta de b cm de grosor (ver figura), el haz se atenúa de P_0 hasta P . Donde P_0 y P es la cantidad de energía radiante que incide en el detector por unidad de superficie y por unidad de tiempo (potencia radiante o intensidad de radiación). La transmitancia T de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = P/P_0$$

La absorbancia A o densidad óptica de una solución se define por la ecuación



$$A = -\log_{10} T = \log P_0/P$$

²⁰ (Skoog D.A.)

¹⁹ (Shields)



La absorbancia es directamente proporcional a la longitud b que recorre la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie absorbente. Como la longitud no varía y a es una constante de proporcionalidad tenemos una relación lineal entre absorbancia y concentración. De esta manera, si medimos la absorbancia de una solución y conocemos el valor de a y el grosor de la cubeta (b) estamos en condiciones de calcular la concentración c de la especie en solución. Esta relación se conoce como la ley de Lambert-Beer y se escribe usualmente como:

$$A = a \times b \times c$$

Donde A es la absorbancia de la muestra.

a es la absorptividad o coeficiente de extinción, propio de cada compuesto. Su magnitud depende de las unidades utilizadas para b y c . Si b está en centímetros y c en gramos por litro, entonces la absorptividad tiene unidades de $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b es el grosor de la cubeta (cm)

c es la concentración del analito (g/L)

Cuando c se expresa en moles por litro (mol/L o M), entonces a se cambia por ϵ , que es la absorptividad molar o coeficiente de extinción molar. Entonces la ley de Beer queda así:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Donde ϵ tiene unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁹

Aplicaciones de la ley de Beer

La ley de Beer se puede utilizar en distintas maneras. Pueden calcularse las absorptividades molares de las especies si se conocen sus concentraciones, también se puede utilizar el valor de la absorbancia medida para conocer la concentración si es que se conocen la absorptividad

¹⁹ (Shields)



y la longitud de la trayectoria de la radiación. Sin embargo, la absorptividad es una función de diversas variables, tales como el disolvente, la composición de la solución y la temperatura, de ahí que los valores de la absorptividad que se encuentran en la literatura varíen con las condiciones en las que se hace la medición. Por esta razón, es aconsejable no depender nunca de los valores dados en la literatura para un análisis cuantitativo. Para conocer la absorptividad en las condiciones de análisis, se preparan varias soluciones patrón de analito en el mismo disolvente y una misma temperatura. Con las soluciones patrón se construye una curva de calibración, o curva de trabajo, de absorbancia frente a la concentración, o también puede obtenerse una ecuación de regresión lineal. A veces es necesario hacer por duplicados de la solución del analito para compensar los efectos debidos a la matriz, también se puede aplicar el método de las adiciones estándar para el mismo fin.¹⁹

Limitaciones de la ley de Beer

La relación lineal entre la absorbancia y longitud de la trayectoria de la radiación a una concentración fija, es una generalización para la que hay pocas excepciones. Por lo contrario, es muy frecuente encontrar desviaciones a la proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración (cuando b es constante). Algunas de estas desviaciones, denominadas desviaciones reales, son significativas y representan limitaciones reales de esta ley. A veces se observan desviaciones debidas a la forma en que se mide la absorbancia (desviaciones instrumentales) o como resultado de los cambios químicos asociados a las variaciones de concentración (desviaciones químicas).

Desviaciones reales de la ley de Beer

La ley de Beer solo describe el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas y, en este sentido es una ley limitada. Con concentraciones superiores a 0.01M, la distancia promedio entre los iones o moléculas de las especies absorbentes disminuyen al punto en

¹⁹ (Shields)



que cada partícula afecta la distribución de carga (y, por tanto la absorción) de las partículas vecinas. Como el grado de interacción depende de la concentración, cuando este fenómeno ocurre se presenta se observen desviaciones de la relación lineal entre la absorbancia y concentración.¹⁹

Esto también se observa en concentraciones diluidas de sustancias absorbentes que contienen concentraciones altas de otras especies, electrolitos en particular.

Cuando los iones están muy cerca de analitos, alteran su absorptividad molar por interacción electrostática, ocasionando desviaciones de la ley de Beer.

Desviaciones químicas

Las desviaciones de la ley de Beer se presentan cuando las especies absorbentes experimentan asociación, disociación o reaccionan con el disolvente formando productos que tienen una absorción distinta de la del analito. La magnitud de estas desviaciones se puede predecir conociendo las absorptividades molares de las especies absorbentes y las constantes de equilibrio de las reacciones. Desafortunadamente, casi nunca se percibe que estos procesos están afectando al analito y, por tanto, es prácticamente imposible compensarlos. Los equilibrios típicos que dan origen a este efecto incluyen a los equilibrios entre monómeros y dímeros, los que forman complejos metálicos con más de un tipo de complejo, los equilibrios ácido-base y los que llevan a asociaciones del disolvente y del analito.¹⁹

Desviaciones debidas a los instrumentos

La necesidad de contar con fuentes de radiación monocromática y evitar la radiación parásita (radiación debida al instrumento y que está fuera de la banda de longitud de onda

¹⁹ (Shields)



seleccionada para hacer las mediciones) son algunos de los prácticos que restringen la aplicación de la ley de Beer. Estrictamente, esta ley se aplica sólo cuando las mediciones se hacen con una fuente de radiación monocromática, sin embargo en la práctica, se emplean las fuentes de radiación policromática junto con una rejilla o filtro para aislar una banda de longitud de onda que sea más o menos simétrica en torno a la longitud de onda que se va a utilizar. La luz policromática, literalmente luz multicolor, es la que tiene muchas longitudes de onda, como la que emite un filamento incandescente de tungsteno de una lámpara; tiene una sola longitud de onda, como la de un láser, o una sola banda estrecha de longitudes de onda. Si la banda seleccionada corresponde a una región en que el analito muestra una absorptividad casi constante, las desviaciones de la ley de Beer son mínimas.²¹

Para evitar estas desviaciones es conveniente seleccionar una banda de longitudes de onda cercana a la longitud de onda donde la absorción sea máxima y la absorptividad del analito cambie muy poco con la longitud de onda. Utilizar celdas no apareadas también puede ser una causa de desviación de la ley de Beer, que aunque es trivial, también es importante. Para evitar los problemas causados por las celdas óptimamente desiguales en instrumentos de un solo haz, se puede utilizar la misma celda para el blanco y la muestra. Después de hacer las lecturas con el blanco, la celda se vacía por aspiración, se lava, se enjagua y se llena con la solución del analito.²¹

La linealidad de la ley de Lambert-Beer está limitada por factores químicos e instrumentales. Estos pueden ser:

- Variaciones en la absorptividad a altas concentraciones ($>0.01M$) debido a interacciones electrostáticas de moléculas muy cercanas entre sí.
- Dispersión de la luz debido a la presencia de material particulado en la muestra.
- Fluorescencia o fosforescencia de la muestra.

¹⁹ (Shields)

²¹ (Skoog D.A, 1994)



- Cambios en el equilibrio químico dependientes de la concentración. Por ejemplo sí el analito se asocia, disocia o reacciona con el disolvente en función de su concentración.²¹

²¹ Skoog D.A., W. D. *Química Analítica Séptima Edición*. McGraw hill.



V. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

El estudio es de tipo analítico porque se realizarán las diferentes medidas analíticas para su realización.

Población

La población en estudio serán 50 blisters de levofloxacina capleta recubierta cuya concentración es de 500 mg el número de lote de dichos blisters es xxxx debido a políticas de la empresa.

Muestra

Se tomó 10 blisters al azar correspondiente al 16% de nuestra población total en estudio.

Alcance

Cuantificación de levofloxacina capleta de 500 mg por espectrofotometría UV-VISIBLE a una longitud de onda de 294 nm.

Variables de estudio:

- Selectividad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión

Tipos de variables: son de tipo cuantitativas.

Criterios de inclusión y de exclusión

Los criterios de inclusión que utilizaremos para el desarrollo de nuestro trabajo serán: que las Capletas sean recubiertas que sean del mismo lote de fabricaciones provenientes del laboratorio Ramos.



Los criterios de exclusión que tomaremos en cuenta serán que las Capletas no sean provenientes del laboratorio ramos que no pertenezcan al mismo lote fabricación y que estas se encuentre quebradas.

Operalización de variables

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



Materiales

Los materiales siguientes se utilizaran para la validación de la metodología analítica en la Cuantificación de Levofloxacin capleta

| DESCRIPCION | MARCA | MODELO | CAPACIDAD |
|-----------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| Agitador ultrasónico | Fisher scientific | FS60D | 0-60 min |
| Balanza analítica | Mettler Toledo | MS204S | 220 g |
| Balones aforados | - | - | 100 ml |
| Beaker | - | - | 50 y 250 ml |
| Papel filtro | - | - | - |
| Pipetas | - | Serológicas | 2 ml |
| espectrofotómetro | Agilent | 8453 | - |
| espátulas | - | - | - |
| friabulador | Electrolab | EF-2 | 2 discos |
| probetas | - | - | 1000 ml |
| Destilador de agua | - | - | - |

Reactivos y patrones.

Los reactivos siguientes se utilizaran durante la ejecución de esta validación:

| Descripción | Concentración |
|--------------------------|---------------|
| Ácido clorhídrico | ACS |
| Agua destilada | Reactivo |



Procedimiento analítico para la cuantificación de Levofloxacin capleta.
Condiciones espectrofométricas:

Muestras

Preparaciones.

Preparación de Acido clorhídrico 0.1 N (Blanco):

Medir 58.0 mL de HCl grado reactivo y adicionarlos en un recipiente con capacidad de 7 L, que contenga aproximadamente 1000 mL de agua destilada, homogenizar hasta completa disolución, aforar con el medio de disolución (agua) hasta 7 L, la concentración final será de 0.1 N.

Preparación de la solución estándar:

Pesar con precisión 25.6 mg de estándar primario de Levofloxacin hemidrato, equivalente a 25 mg de Levofloxacin base (ajustar la pureza si es menor al 100%) y transferir a un balón volumétrico de 100 ml adicionar 50 ml de acido clorhídrico 0.1 N, disolver por medio de agitación ultrasónica por 2 minutos, enfriar a temperatura ambiente y aforar hasta volumen con acido clorhídrico 0.1 N y agitar manualmente por 1 minuto. De esta solución tomar una alícuota de 2 ml y transferir a un balón de 100 ml, aforar a volumen Acido clorhídrico 0.1 N mezclar la solución manualmente por 30 segundos.

Concentración final de Levofloxacin base: 5µg/ml.

| Técnica analítica | Espectrofotometría UV-VIS |
|---|--|
| Detector | Ultravioleta visible con arreglo de diodos |
| Longitud de onda máxima | 294 nm |
| Sustancia de referencia | Estándar secundario de Levofloxacin hemidrato. |
| Solución blanco | Acido clorhídrico 0.1 N |
| Material de paso óptico | Celda cuarzo de 10 mm |
| Concentración final de la solución al 100% | 5µg/ml |



Preparación de la solución muestra:

Pesar 10 Capletas individualmente, anotar los pesos, determinar el peso promedio, morterizar hasta reducir a polvo fino.

Pesar una cantidad de polvo equivalente a 25 mg de Levofloxacina base, colocarlo en un balón volumétrico de 100 ml, agregar aproximadamente 50 ml de ácido clorhídrico 0.1 N disolver mediante agitación ultrasónica por 7 minutos, enfriar a temperatura ambiente y aforar a volumen con ácido clorhídrico 0.1 N, filtrar una porción de esta solución tomar una alícuota de 2 ml llevar a un balón de 100 ml aforar con ácido clorhídrico 0.1 N hasta volumen agitar manualmente por 30 segundos.

Concentración final de la solución: 5. μ g/ml

Lecturas:

Una vez preparadas las soluciones estándar de referencia y soluciones de muestras, proceder a la realización de las lecturas, utilizando celdas de 1 cm. de cuarzo y el equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de máxima absorbancia de 294 nm, utilizando HCl 0.1 N como blanco.

Procedimiento experimental para determinar los parámetros de la validación

Linealidad

Para la determinación experimental de la linealidad se prepararán 7 soluciones estándares de Levofloxacina (ER) pesando exactamente las cantidades de 10.3 mg, 15.4mg, 20.5mg, 25.6mg, 30.7mg, 35.8mg, 40.9mg de estándar secundario de **Levofloxacina Hemihidrato**, equivalente a 10 mg, 15mg, 20mg, 25mg, 30mg, 35mg, 40mg colocar dentro de balones de 100 ml debidamente rotulados adicionar 50 ml de ácido clorhídrico 0.1N agitar de manera manual por 30 seg. Aforar hasta volumen con ácido clorhídrico 0.1N de cada solución tomar 2 ml y llevar a un balón de 100 ml y aforar a volumen con ácido clorhídrico 0.1 agitar manualmente durante 30 seg. Las concentraciones finales de Levofloxacina base serán de 2 μ , 3 μ , 4 μ , 5 μ , 6 μ , 7 μ , 8 μ el método de ensayo. Cada solución, estándar, se preparará por triplicado, analizándose de acuerdo a las condiciones establecidas en el método de análisis desde la concentración más baja hasta la más alta.



Para la determinación de la linealidad del método; se sigue el mismo procedimiento, pero ahora trabajando con la matriz de Levofloxacin capleta.

Datos a reportar:

- Realizar el análisis de la curva de regresión.
- Realizar la grafica de residuales.
- Verificar la validez del modelo a través del Análisis de Varianza (ANOVA).

Criterio de aceptación:

- Se determinara la homoscedasticidad para determinar el tipo de regresión a utilizar.
- El porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de respuesta deben de ser menor al 2 % para el sistema instrumental y del 3 % para la linealidad del método.
- El coeficiente de regresión tanto para el sistema instrumental como para el método debe de ser mayor igual a 0.999.
- Existencia de un intercepto igual a cero $t_{cal} < t_{crit}$.
- Existencia de una pendiente distinta de cero $t_{cal} > t_{crit}$.
- Debe existir homoscedasticidad en los residuales.
- El F_1 calculado para la regresión debe ser mayor al de F_1 crítico.

Límite de detección

Determinación experimental del límite de detección.

Para estimar el límite de detección, del método de ensayo de Levofloxacin, se determinara a través de la desviación estándar residual (S_r) y la pendiente de la curva de calibración estándar.



Límite de cuantificación

Determinación experimental del límite de cuantificación

Para estimar el límite de cuantificación del método de ensayo de Levofloxacin se determinara a través de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración estándar.

Exactitud

Determinación experimental de la exactitud (recuperación) para el método de ensayo propuesto.

La exactitud de método analítico se evaluara por medio de la comparación de la curva normal estándar y la curva de calibración normal de la muestra, que abarque el porcentaje del rango especificado (40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 % respectivamente).

Método de adición de patrón: se preparará un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analíto a determinar se utilizara un blíster del cual se tomara las muestras y se preparan siete puntos a partir de la concentración nominal de 2,3,4, 5,6,7,8 μg .Sobre dichas muestras se añaden cantidades conocidas del analíto o patrón de 1 μg desde la concentración más baja a todos los niveles de concentración los cuales están dentro del rango a estudiar.

Criterios de Aceptación:

- Muestra enriquecida: porcentaje de recuperación esperado debe encontrarse entre 97-103% lo cual equivale a $\pm 3\%$ de error relativo.
- El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.9998.
- El t_{cal} debe de ser menor al t_{crit} (No hay efecto matriz).
- Si el porcentaje de recobrado es menor del 99% existe un efecto depresor; pero si el porcentaje de recobro es mayor del 101% existe un efecto amplificador en la señal de la respuesta.



Precisión

Prepararemos 10 muestras a la concentración nominal (5 µg/ml de Levofloxacin) bajo las mismas condiciones las cuales serán leídas en el espectrofotómetro durante la mañana por un periodo de 5 días. Para la repetibilidad del sistema se realizara de la misma manera nada más utilizando el estándar de referencia Se adquirirán las absorbancia de cada una de las muestras se tabularán los resultados.

Valores a reportar y criterios de aceptación:

El %RSD para la regresión no debe de ser mayor del 3%.

Precisión intermedia del sistema y método:

Se prepara una solución estándar, a la concentración nominal (5 µg/ml de Levofloxacin (para la precisión intermedia del sistema)), y una solución muestra (precisión intermedia del método) por cinco días, por un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Por lo que la ejecución de este parámetro será llevado a cabo por analistas diferentes, en días diferentes .Realizando cada analista dos lecturas al día durante un periodo de tiempo de 5 días. Se adquirirán las absorbancias tanto de la muestra y el estándar y tabularán los resultados.

Valores a reportar y criterios de aceptación

- Se realizara un análisis de Varianza (ANOVA) para obtener la precisión intermedia del método.
- El %RSD generado durante los 5 días no debe ser mayor al 3.0%.

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, 5µg/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 (5 µg/mL).



Criterios de aceptación finales:

- 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



VI. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

Linealidad del Sistema.

Para la evaluación de la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración estándar a 7 niveles de concentración diferente; los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla N°1.

TABLA N°1

Concentraciones y Absorvancias de la linealidad

| $[\mu\text{g/ml}]$ | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 |
|--------------------|---------|---------|---------|
| 2 | 0.18267 | 0.18515 | 0.19683 |
| 3 | 0.28861 | 0.30501 | 0.30342 |
| 4 | 0.40043 | 0.39997 | 0.40058 |
| 5 | 0.46643 | 0.49632 | 0.49287 |
| 6 | 0.56927 | 0.56766 | 0.56783 |
| 7 | 0.6669 | 0.68079 | 0.68077 |
| 8 | 0.75472 | 0.75439 | 0.75184 |

Comprobamos si existían datos aberrantes en las absorvancias obtenidas del estándar de referencia a través de la prueba de Huber, posteriormente realizamos el test cochran para determinar la homogeneidad de las varianzas de los distintos niveles de concentración siendo el valor de la $G_{exp} < G_{tab}$.



TABLA N° 2

En la siguiente tabla n° 2 se muestran los valores aberrantes.

| [µg/ml] | test de hubber | | | valor abst | MAD | LS | LI |
|---------|----------------|--------------|---------|------------|---------|------------|------------|
| | promedio | absorvancias | mediana | | | | |
| | 0.18821667 | 0.18267 | | 0.00248 | 0 | | |
| 2 | | 0.18515 | 0.18515 | 0 | 0.00248 | 0.19689667 | 0.17953667 |
| | | 0.19683 | | 0.01168 | 0.01168 | | |
| | 0.29901333 | 0.28861 | | 0.01481 | 0 | | |
| 3 | | 0.30501 | 0.30342 | 0.00159 | 0.00159 | 0.00159 | 0.29344833 |
| | | 0.30342 | | 0 | 0.01481 | | |
| | 0.40032667 | 0.40043 | | 0 | 0 | | |
| 4 | | 0.39997 | 0.40043 | 0.00046 | 0.00046 | 0.00015 | 0.39980167 |
| | | 0.40058 | | 0.00015 | 0.00015 | | |
| | 0.48520667 | 0.46643 | | 0.02644 | 0 | | |
| 5 | | 0.49632 | 0.49287 | 0.00345 | 0.00345 | 0.00345 | 0.47313167 |
| | | 0.49287 | | 0 | 0.02644 | | |
| | 0.56825333 | 0.56927 | | 0.00144 | 0 | | |
| 6 | | 0.56766 | 0.56783 | 0.00017 | 0.00017 | 0.00017 | 0.56765833 |
| | | 0.56783 | | 0 | 0.00144 | | |
| | 0.67615333 | 0.6669 | | 0.01387 | 0 | | |
| 7 | | 0.68079 | 0.68077 | 2E-05 | 2E-05 | 2E-05 | 0.67608333 |
| | | 0.68077 | | 0 | 0.01387 | | |
| | 0.75365 | 0.75472 | | 0.00033 | 0 | | |
| 8 | | 0.75439 | 0.75439 | 0 | 0.00033 | 0.00033 | 0.752495 |
| | | 0.75184 | | 0.00255 | 0.00255 | | |

Resultados

Al determinar, si existían datos anómalos mediante el test de Huber se encontró un dato anómalo en las absorvancias medidas del estándar de referencia interno ya que dicho dato se encuentra fuera del límite no aceptable calculado mediante la siguiente fórmula $[(X_m - 3.5 \text{ MAD}), (X_m + 3.5 \text{ MAD})]$ siendo el LS-0.4737 y LI-0.4972 para una concentración de 5µg/ml un valor aberrante de 0.46643 que se rechazó por no encontrarse dentro del límite aceptable.



La siguiente tabla N° 3 muestra los valores de varianzas por grupos de las distintas concentraciones empleadas en el análisis de levofloxacin.

TABLA N°3

Prueba del test de Cochran

| □µg/ml | Abs | F y/x | Promedio | desvt | varianza |
|--------|---------|------------|------------|------------|-------------|
| 2 | 0.18267 | 0.091335 | | | |
| 2 | 0.18515 | 0.092575 | 0.09410833 | 0.00756173 | 5.71797E-05 |
| 2 | 0.19683 | 0.098415 | | | |
| 3 | 0.28861 | 0.09620333 | | | |
| 3 | 0.30501 | 0.10167 | 0.09967111 | 0.00904456 | 8.1804E-05 |
| 3 | 0.30342 | 0.10114 | | | |
| 4 | 0.40043 | 0.1001075 | | | |
| 4 | 0.39997 | 0.0999925 | 0.10008167 | 0.00031786 | 1.01033E-07 |
| 4 | 0.40058 | 0.100145 | | | |
| 5 | 0.46643 | 0.093286 | | | |
| 5 | 0.49632 | 0.099264 | 0.09704133 | 0.01635231 | 0.000267398 |
| 5 | 0.49287 | 0.098574 | | | |
| 6 | 0.56927 | 0.09487833 | | | |
| 6 | 0.56766 | 0.09461 | 0.09470889 | 0.00088455 | 7.82433E-07 |
| 6 | 0.56783 | 0.09463833 | | | |
| 7 | 0.6669 | 0.09527143 | | | |
| 7 | 0.68079 | 0.09725571 | 0.09659333 | 0.00801363 | 6.42182E-05 |
| 7 | 0.68077 | 0.09725286 | | | |
| 8 | 0.75472 | 0.09434 | | | |
| 8 | 0.75439 | 0.09429875 | 0.09420625 | 0.00157617 | 2.4843E-06 |
| 8 | 0.75184 | 0.09398 | | | |
| | | | | suma | 0.000473968 |

Resultados.

G_{exp} del test sin omitir el valor anomalo dio un valor de **0.5641692** y un G_{tab} de **0.5612** calculado mediante la siguiente fórmula:

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2_{\text{máxima}}}{\sum S_i^2} :$$



Gexp del test al omitir el valor anomalo dio un valor de **0.02800311** y un Gtab de **0.5612** por lo que se demuestra que el valor anómalo influye en la homogeneidad de las varianzas de los grupos.

TABLA N° 4

Linealidad para el método de análisis de cuantificación de levofloxacin capleta 500 mg

| [µg/ml | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Promedio | S ² | F y/x | y-bo | F y/x |
|--------|---------|---------|---------|------------|----------------|------------|----------|-------------|
| 2 | 0.18267 | 0.18515 | 0.19683 | 0.18821667 | 5.71797E-05 | 0.09410833 | 0.174 | 0.091578947 |
| 3 | 0.28861 | 0.30501 | 0.30342 | 0.29901333 | 8.1804E-05 | 0.09967111 | 0.285 | 0.095 |
| 4 | 0.40043 | 0.39997 | 0.40058 | 0.40032667 | 1.01033E-07 | 0.10008167 | 0.386 | 0.094146341 |
| 5 | 0.46643 | 0.49632 | 0.49287 | 0.48520667 | 5.95125E-06 | 0.09704133 | 0.471 | 0.0942 |
| 6 | 0.56927 | 0.56766 | 0.56783 | 0.56825333 | 7.82433E-07 | 0.09470889 | 0.554 | 0.093898305 |
| 7 | 0.6669 | 0.68079 | 0.68077 | 0.67615333 | 6.42182E-05 | 0.09659333 | 0.662 | 0.093239437 |
| 8 | 0.75472 | 0.75439 | 0.75184 | 0.75365 | 2.4843E-06 | 0.09420625 | 0.740 | 0.093670886 |
| | | | | Suma | 0.000212521 | | Promedio | 0.093676274 |
| | | | | | Promedio | 0.09663013 | S | 0.001071326 |
| | | | | | S | 0.00249188 | %CV | 1.143647046 |
| | | | | | %CV | 2.57878634 | | |

En esta tabla se muestran los diferentes concentraciones a la cual fueron preparadas las soluciones por triplicado dando las diferentes absorvancias el promedio de estas mismas, la varianza de las absorvancias por grupo y el %CV del factor respuesta mayor al **2.57%**.

Por lo que hizo necesario realizar test de linelidad los factores respuesta $f = \frac{y_i}{x_i}$ para verificar la linelidad ya que deben ser menores del 2% para una buena linealidad por lo que hubo que demostrarse la concentracion real de los analitos mediante la ecuacion de la pendiente $y = b \cdot x + a$ y sus respectivas correcciones de las respuestas mediante $(y_i - a)$ y el coeficiente de variacion del factor respuesta proporcionandonos un %CV mejorado del **1.14%**.

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2_{\text{máxima}}}{\sum S_i^2}$$

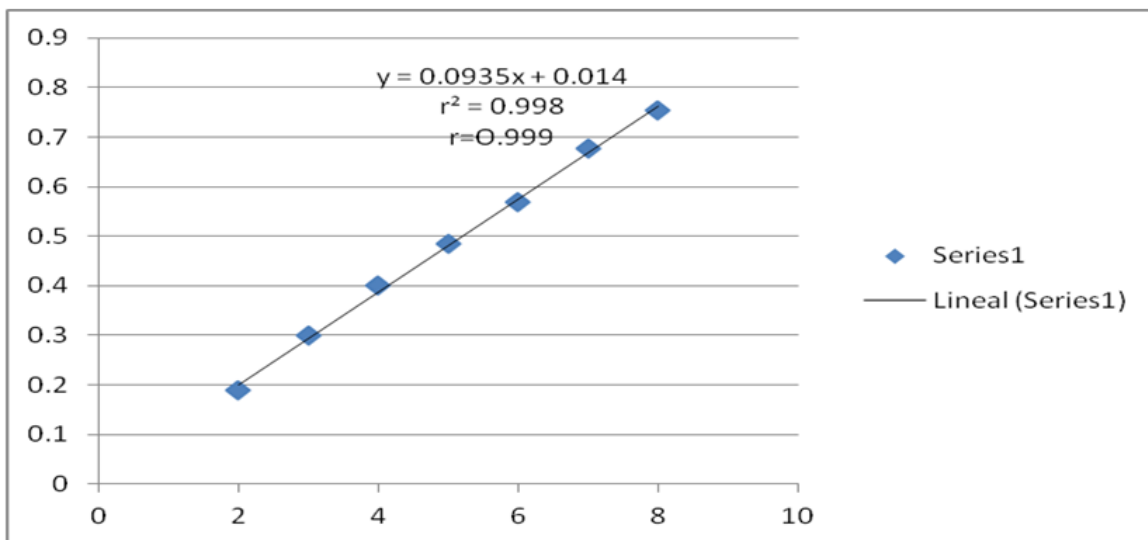
Se realizo la Test de cochran el cual se determina por medio de la formula de

Para determinar la homogeneidad entre las absorvancias de los grupos proporcionando un valor de Gexp de **0.02800311** y un Gtab para siete grupos con tres replicas con un nivel de confianza del 95% de **0.5612** por lo que el criterio $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ demuestra que hay homogeneidad entre las absorvancias de los grupos.



GRAFICO N°1

Linealidad del sistema



Este gráfico se realizó graficando las concentraciones frente al promedio de sus absorbancias donde se logra observar el coeficiente de determinación pendiente y intercepto dando un valor de coeficiente de determinación r^2 de 0.998 que al realizar el ajuste para determinar el coeficiente de correlación de la recta proporciona un coeficiente de correlación r igual a 0.999 por lo que se deduce que las absorbancias son directamente proporcionales a la concentración y valores de la pendiente de la recta de 0.0935 y de intercepto de 0.014 determinando de esta manera la linealidad del sistema.

Para verificar la validez del modelo, se aplicó el Análisis de varianza (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, para verificar el ajuste del modelo se presenta en la tabla N°5. Donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F_c es mayor al F de tabla.



TABLA N° 5

Análisis de varianza (ANOVA)

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|------------|---------------------------|
| | <i>Grados de libertad</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Valor crítico de F</i> |
| Regresión | 1 | 0.244877756 | 0.244877756 | 2339.92606 | 7.13365E-08 |
| Residuos | 5 | 0.00052326 | 0.000104652 | | |
| Total | 6 | 0.245401015 | | | |

Al verificar los resultados del analisis de regresion de varianzas (ANOVA) determinamos que el valor $F_{cal} > F_{crit_{0,95}}$ por lo que se demuestra que no hay una diferencia significativa en los analistas o respuestas de las concentraciones.

TABLA N°6

Resultado de la evaluación de la pendiente y intercepto

| | |
|---|---------------|
| Pendiente | 0.0935 |
| Intercepto | 0.014 |
| r² | 0.998 |
| Var. Res. | 0.01022995 |
| $t_{exp} = \frac{abs(b1)}{sb}$ | 4.8995 |
| $t_{exp} = \frac{abs(b1)}{sb}$ | 0.1356 |
| Tcrit n-2Gl $\alpha=0.05$ | 2.57 |



Esta tabla refleja los valores encontrados y calculados para la determinación de significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente y el intercepto donde se demuestra que la pendiente es distinta de cero cumpliendo con el criterio ya que el valor de $T_{cal} > T_{crit}$.

De esta misma maenra se demuestra también la existencia de un intercepto diferente de cero cumpliendo con el criterio de que el valor de $T_{cal} < T_{crit}$.

La normalidad de los residuales se muestran en la grafica 2, se puede obsevar que los residuales se distribuyen de una forma aletoria presentado una linealidad aunque no muy buena.

GRAFICO N°2



Limite de deteccion y cuantificacion.

El limite de deteccion y cuantificacion calculados a partir de la desvacion estandar de la residual y pendiente de la curva normal del patron se muestran en la siguiente tabla N°7.



TABLA N° 7

| Parametro | Valor |
|------------------------------|-----------|
| Desviacion estandar residual | 0.01023 |
| Pendiente | 0.0935 |
| LD (mg/ml) | 0.3598934 |
| LC (mg/ml) | 1.0939008 |

En la estimacion del limite de deteccion y cuantificacion del sistema logramos determinar que el valor minimo capaz de detectarse es de 0.3598934 y el valor mínimo capaz de cuantificarse para el análisis de cuantificación de levofloxacin a una longitud de 294 nm es de 1.0939008.

PRESICION INTERMEDIA DE LAS MEDICIONES ANALITICAS DEL METODO.

La tabla N° 8 muestra los resultados para el análisis de varianza (ANOVA), de dos factores con una sola muestra por grupo.

TABLA N°8

Análisis de varianza de la precisión intermedia.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|---------|--------------|----------------------|
| Analista | 3.07787E-05 | 9 | 3.42E-06 | 0.34774 | 0.934271 | 3.178893 |
| Ambiente | 8.65557E-05 | 1 | 8.66E-05 | 8.80118 | 0.015787 | 5.117355 |
| Error | 8.85111E-05 | 9 | 9.83E-06 | | | |
| Total | 0.000205846 | 19 | | | | |



En esta tabla se logra observar que no existe diferencia significativa entre los analistas pero si una diferencia significativa entre el ambiente de análisis ya que el valor del Fc para el ambiente es mayor que Fcrit.

Varianza entre dias $s_D^2 = \frac{CM_D - CM_r}{n} = 8.5572 \exp^{-5}$

Varianza (operador $S_{op}^2 = (MC_{op} - MC_r) / ni = 2.4364 \exp^{-6}$

Precision intermedia $S_r = 0.00938129$

Varianza de reproducibilidad $S_{pl}^2 = S_d^2 + S_{op}^2 + S_r^2 = 0.00322402$

Varianza de la repetibilidad $S_l = \sqrt{(S_d^2 + S_{op}^2)} = 0.003136$

Desviacion estandar de la reproducibilidad $S_{pl} = \sqrt{S_D^2 + S_{op}^2 + S_r^2} = 0.0098916$

Varianza de la media $S_{xm}^2 = (S_d^2 + S_{op}^2 + S_r^2) / n = 9.7843 \exp^{-5}$

SRD_R% $= (S_r / \text{promtotal}) * 100 = 0.6586\%$

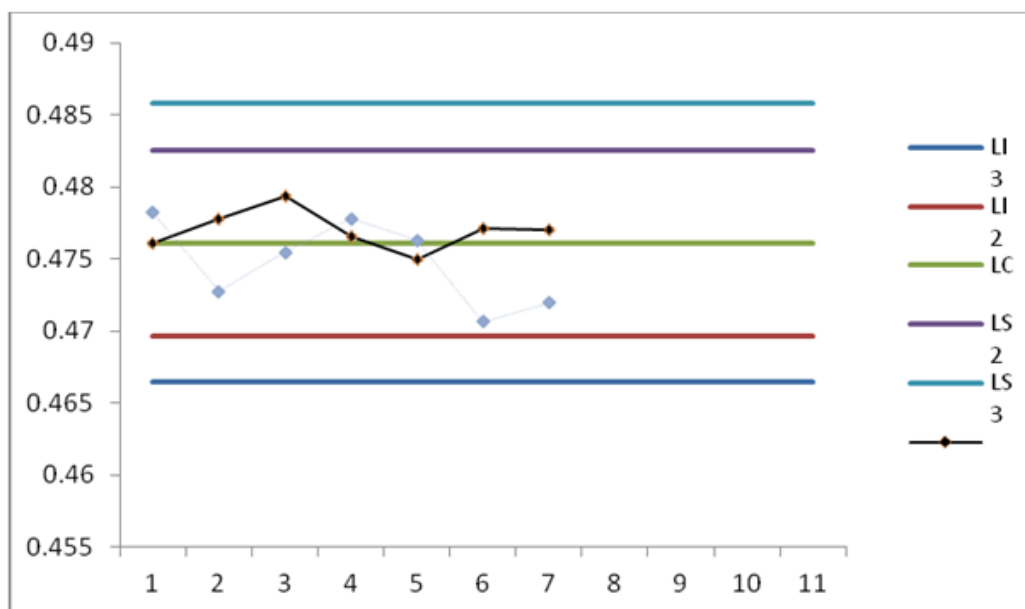
La precision intermedia de la mediciones analíticas calculados a partir de sus desviacion estandar, expresada como %RSD es de 0.6586 según los porcentaje de desviacion estandar relativa el metodo es capaz de producir resultados precisos, esto es debido a que a estas concentraciones el %RSD debe ser menor del 2%.

Para identificar los cambios en el proceso de medicion en el tiempo, y llevar un control de la calidad en las mediciones de rutina, se ha elaborado la carta de control para la exactitud en la mediciones del sistema. La figura, se presenta el grafico de control para los promedios estandar para los 5 dias. Se puede observar que los promedios de los resultados por dia, se encuentran dentro de los limites de control establecidos.



GAFICO N°3

Carta control de la precision intermedia



Este grafico representa cada una de las absorvancias obtenidas durante los cinco dias de analisis para la precision intermedia donde se logra observar la tendencia de las muestras a permanecer entre el limite de confianza dando entre el valor del limite superior y el limite inferior aun un nivel de confianza de 95%.

PRESICION INTERMEDIA DE LAS MEDICIONES ANALITICAS DEL SISTEMA.

Se determino de la misma forma con la que se determino la precision intermedia del metodo realizando un analisis de varianzas (ANOVA) y se calculo %RSD generado durante los cinco dias que duro el parametro.



La tabla N° 9 muestra los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que no existe diferencia significativa entre los día de análisis.

TABLA N°9

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Dias | 1.88947E-05 | 9 | 2.09942E-06 | 0.3256317 | 0.94497798 | 3.1788931 |
| Ambiente | 1.52112E-05 | 1 | 1.52112E-05 | 2.35934202 | 0.15890939 | 5.11735501 |
| Error dentro de los grupos | 5.80249E-05 | 9 | 6.44721E-06 | | | |
| Total | 9.21308E-05 | 19 | | | | |

Varianza entre dias $s_D^2 = \frac{CM_D - CM_r}{n} = 0.423846983$

Varianza (operador $S^2_{op} = (MC_{op} - MC_r) / ni = -4.34779 \exp^{-7}$

Precision intermedia $S_r = 0.651034983$

Varrianza de reproducibilidad $S^2_{pl} = S^2_d + S^2_{op} + S^2_r = 0.002539135$

Desviacion estandar de la reproducibilidad $S_{pl} = \sqrt{S^2_D + S^2_{op} + S^2_r} = 0.426385684$

Varianza de la media $S^2_{xm} = (S^2_d + S^2_{op} + S^2_r) / n = 0.651039934$

SRD_R% $= (S_r / \text{promtotal}) * 100 = 0.528231$

La precision intermedia de la mediciones analiticas del sistema calculados a partir de sus desviacion estandar, expresada como %RSD es de 0.528231 según los porcentaje de desviacion estandar relativa el sistema es capaz de producir resultados precisos, esto es debido a que a estas concentraciones el %RSD debe ser menor del 2%.



Evaluación de la exactitud del método

Estudio del efecto de matriz

Se preparó una curva de calibración normal de la muestra a 7 niveles de concentración y una curva de adición patrón. El gráfico muestra las curvas, y los parámetros de regresión para las curvas se muestran en la tabla

GRAFICO N°4
Curva de calibración
normal (CCN)

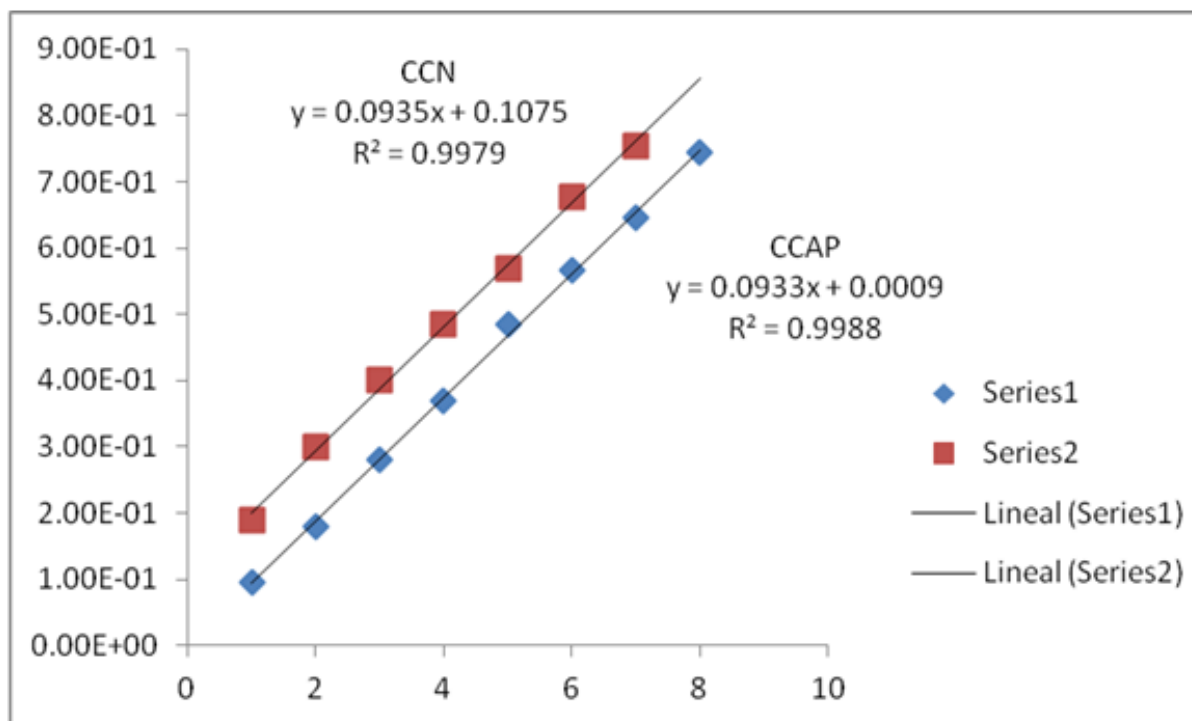




TABLA N° 10

Parámetros de las curvas de calibración.

| Parametro | Calibracion normal (CCN) | Calibracion adiccion patron (CAP) |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Pendiente (b1) | 0.0935 | 0.0933 |
| Intercepto(b0) | 0.1075 | 0.0009 |

La estimacion de recobro se hizo por comparacion de pendientes entre curvas adiccion patron y normal, en la que se demuestra que existen un efecto depresor, con un porcentaje de recobro de 99.79% por lo que se deduce que los excipientes influyen en la concentración del analíto



VII. CONCLUSION

1. El método propuesto es lineal, preciso y exacto en el rango del 40% al 160 % de la concentración de trabajo ya que su límite de cuantificación se encuentra por debajo de la concentración mínima utilizada; también es específico, se logró probar que hay interferencia del placebo o excipientes utilizados en la formulación de medicamento ya que produce un efecto depresor en la recuperación del analito por que los resultados obtenidos prueban la fiabilidad del método para la cuantificación del principio activo en Capletas de 500 mg de levofloxacina.
2. Se validó de un método analítico por espectrofotometría ultravioleta visible que cumplió con los requerimientos y normas ICH y Farmacopea Estadounidense (USP 34) para la cuantificación del principios activos de levofloxacina.
3. Se determinó y demostró que la metodología propuesta cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, Repetibilidad y precisión según lo establece la Farmacopea Estadounidense (USP 34).
4. Se proporcionó una metodología validada que se utilizó como guía a la industria farmacéutica para la cuantificación del principio activo y considerando que si se emplea en el producto debe ser ensayada y validada nuevamente.
5. El método de análisis para la cuantificación del principio activo levofloxacina en su forma farmacéutica de capleta, demuestra ser preciso, exacto y lineal cuando existan variaciones dentro del laboratorio como la preparación de muestras por diferentes analistas y el desarrollo del análisis en diferentes días.



VIII. RECOMENDACIONES

1. Establecer la técnica correcta de emplear las pipetas volumétricas al liberar el solvente, es decir sin soplar y dar golpe.
2. Filtrar las soluciones de la muestra para tomar las alícuotas.
3. Ante de iniciar el análisis cuantitativo realizar los cálculos respectivo para saber la verdadera normalidad del ácido clorhídrico que se va a trabajar y tomar el volumen adecuado para la solución que se va a preparar.
4. Utilizar los equipos calibrados y cualificados para el análisis en formas farmacéuticas.
5. Para la sustancia referencia o sea el estándar ajustar la pureza si es menor de 100%.
6. Si este método pretende ser utilizado para futuras cuantificaciones para esta forma farmacéutica es necesario tomar en cuenta que los parámetros exactitud y linealidad del método se deben evaluar, por las posible interferencia de los excipientes empleados.



IX. BIBLIOGRAFÍAS

1. Asociación Española de la Industria Farmacéutica de la Industria-AEFI. (2001). *Validación de Métodos Analíticos*. Barcelona: AEFI
2. British Pharmacopoeia Volume I & II. (2009). *Documento Digital*. London: The Stationery Office.
3. C., M. J. (2002). *Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica*. Madrid: Pearson Education S.A
4. Cecilia Barbara, I. S. (6 de NOV de 2005). *FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES*. Obtenido de http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP_24_3_3_2_3JW40CNEE7.pdf
5. Cué Manuel, M. M. (2005). *Actualidad De Las Quinolonas*. Recuperado el 08 de Mayo de 2012, de Actualidad De Las Quinolonas: http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_01_05/far11105.pdf
6. Daniel, h. *Análisis Químico Cuantitativo. Tercera Edición (sexta edición original)*. Michelson Laboratory
7. Delgado, G. (Julio del 2008). *Documentación del Curso de Validación de Métodos Analíticos*.
8. Esteban., B. L. (Agosto 2009). *Informe De Práctica Profesional. Homologación De Métodos De Análisis Físicoquímico Empleado En POSTÓN S.A. Para Materias Primas y Producto Terminado, y Validación del Método Para la Determinación de Grados BRIX*. Universidad de Antioquia. Medellín.
9. Eurachem Guide. (1998). *Validación de Métodos*. Recuperado el 16 de Mayo de 2012, de www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf
10. Food and Drug Administration. (2000). "Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation". (Draft Guidance).
11. Francesc Puigventós, R. J. (Enero de 2000). <http://www.elcomprimido.com/FARHSD/EVALEVOFLOX.htm>. Recuperado el 20 de Junio de 2012, de <http://www.elcomprimido.com/FARHSD/EVALEVOFLOX.htm>
12. García, F. L. (Abril de 2009). *Tripartita Sobre Armonización ICH Q2B*. Recuperado el Julio de 2012



13. Harvey, D. (2000). *Química Analítica Moderna*. McGraw-Hill
14. Jesus, F. (2005). *Farmacología Humana*. Barcelona: Masson
15. Kenneth.A, C. Ensayo Del Medicamento. En C. Kenneth.A. Reverté S.A.
16. Laboratorios Ramos. (2012). *Técnica Analítica de Espectrofotometría UV-Visible Co-79*. Managua-Nicaragua.
17. Marunata, y. (2004). *Desarrollo y Validación De Una Metodología Por HPLC Para Vitaminas En Una Formula de Uso Topico Tesis Para Optar al Titulo de Químico Farmaceutico y al Grado Academico de Licenciado en Química y Farmacia*. Santiago Pontificia.: Universidad de Chile.
18. Morales de La Cruz, C. (Octubre de 2003). *Desarrollo y Validación De Una Técnica Analítica Por HPLC Para Enalapril 10 Mg*. Recuperado el 2012, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/morales_cc/contenido.htm
19. Shields, R. (. (s.f.). *Espectrofotometria*. Recuperado el 2012, de Espectrofotometria: <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometr%C3%ADa>
20. Skoog D.A, J. (1994). *Analisis Instrumental*. McGrawhill.
21. Skoog D.A., W. D. *Química Analítica Séptima Edición*. McGraw hill.
22. The European Agency for The Evaluation Of Medical Products Human Medicines Evaluation Unit. (s.f.). *ICH Q2A*. Recuperado el 20 de Julio de 2012, de ICH Harmonise Guidelene " Validación Of analitical Methods: Difiniton And Terminoloy: [http:// www.pharma. gally.ch/ich/q2a038195 en.pdf](http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195_en.pdf)
23. The United States Pharmacopeia Conventioal USP XXXIV-NF29 Volumen 3. (2011). *Levofloxacin Materia Prima*. United States: TwinkBook Parkway, Rocville.MD.
24. The United States Pharmacopeial Convention USP 30 NF 25. (2007). *Spanish Supplement 1 Capítulos Generales Estandares USP*. Estados Unidos de America: Twinbrook Parkway, Rockville, MD.



X. ANEXOS

GRAFICO N°5

PLACEBO

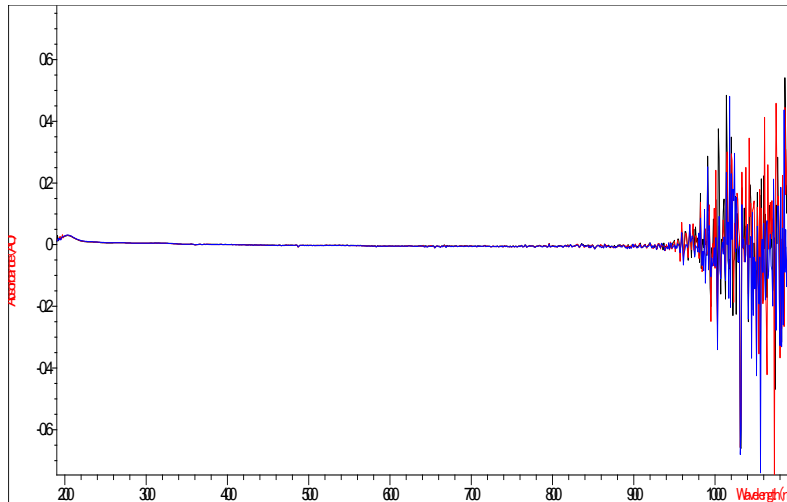


GRAFICO N°6

ESTANDAR

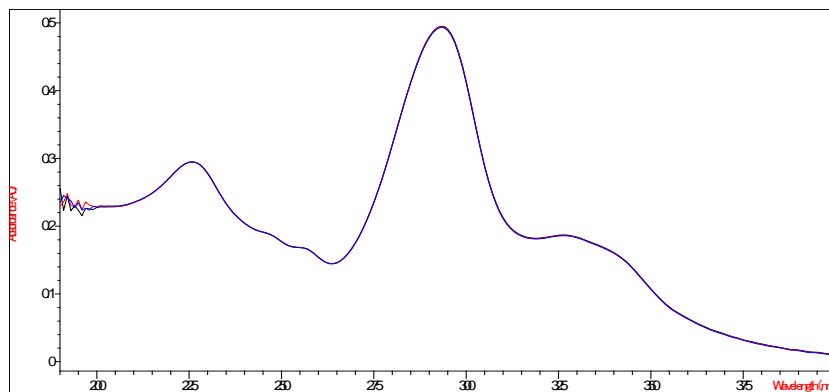




GRAFICO N°7

MUESTRA

