

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE VALIDACION DEL METODO DE CROMATOGRAFIA  
LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACION DE  
CLORANFENICOL COLIRIO.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
JOSE OSCAR LOPEZ IRAHETA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

**SEPTIEMBRE 2017**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

MAESTRO CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENITEZ

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

## COORDINACION DE PROCESOS DE GRADUACION

### **COORDINADORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

### **TRIBUNAL CALIFICADOR**

#### **Coordinadora de Área de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

#### **Coordinadora de Área de Industria Farmacéutica, Cosmética y Veterinarios**

Lic. Mercedes Rossana Brito Mendoza

### **DOCENTE DIRECTOR**

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

## **Agradecimientos**

A mi madre, por su paciencia (...vaya que si la necesito...), por sus sabios consejos, por su amor, por siempre confiar en mí, por siempre darme una razón para seguir adelante, por hacer de mí una persona de bien, por eso y muchas cosas más, yo siempre te estaré eternamente agradecido. Te quiero mucho!

A papá, por enseñarme que para tener las manos limpias primero hay que ensuciárselas, que siempre hay que hacer lo correcto, que la humildad hace valiosa a una persona y que es mejor ser un buen hombre que un gran hombre.

A mi asesor MSc. Eliseo Ayala, por su valioso apoyo al desarrollo de este trabajo con su tiempo, paciencia y conocimientos, por su disponibilidad en todo momento, por ser para mí un ejemplo a seguir como persona y profesional.

Al licenciado Manuel Pineda, por su incondicional apoyo y apertura desde el inicio, sin el cual no hubiese sido posible llevar a cabo este trabajo.

A mis queridos maestros de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, quienes contribuyeron a mi formación profesional compartiendo día a día sus conocimientos durante toda la carrera.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron tanto al desarrollo de este trabajo, como al crecimiento personal y profesional de mi persona, a los que están y a los que ya no, a mi familia, amigos y compañeros.

A todos y cada uno de ellos infinitas gracias, atentamente:

Oscar López.

## **Dedicatoria**

A mi madre:

Dedico este logro de manera especial a ti mamá, que me ayudaste a construir un sueño que ahora se vuelve realidad, la de ser un profesional. Sé que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, siempre querías hacer de mí un hombre de bien, ahora lo sé, y te lo agradezco mucho, finalmente puedo decir que lo hemos logrado, puedes sentirte orgullosa.

Con mucho cariño:

Oscar.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	
<b>CAPITULO I</b>	
1.0 Introduccion	15
<b>CAPITULO II</b>	
2.0 Objetivos	18
<b>CAPITULO III</b>	
3.0 Marco teórico	20
3.1 Cloranfenicol	20
3.1.1 Definición	20
3.1.2 Obtención	20
3.1.3 Descripción	21
3.1.4 Solubilidad	21
3.1.5 Indicaciones terapéuticas	21
3.1.6 Efectos tóxicos	22
3.2 Preparaciones oftálmicas	23
3.2.1 Definición	23
3.2.2 Isotonicidad de las soluciones oftálmicas	23
3.2.3 Viscosidad de las soluciones oftálmicas	23
3.2.4 Esterilidad	24
3.2.5 pH	24
3.2.6 conservadores	25
3.3 Cromatografía líquida de alto desempeño	25
3.3.1 Definición	25
3.3.2 Fase estacionaria	25
3.3.3 Columna cromatográfica	25
3.3.4 Fase móvil	26

3.3.5 Equipo HPLC	26
3.3.6 Elución en gradiente	27
3.3.7 Procedimiento general de uso	27
3.4 Validación de métodos analíticos	28
3.5 Establecimiento del alcance de la validación	30
3.6 Características de desempeño analítico	32
3.6.1 Exactitud	32
3.6.2 Precisión	33
3.6.3 Especificidad	34
3.6.4 Límite de detección	36
3.6.5 Límite de cuantificación	37
3.6.6 Linealidad e intervalo	38
3.6.7 Robustez	40
3.6.8 Aptitud del sistema	41
3.7 Datos requeridos para la validación	41
3.8 Verificación de procedimientos farmacopéicos	43
3.8.1 Proceso de verificación	44
3.8.2 Requisitos de verificación	45
3.9 Documentación	46

## **CAPITULO IV**

4.0 Diseño metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 investigación bibliográfica	49
4.3 Parte experimental	50
4.3.1 Linealidad del sistema	50
4.3.2 Precisión del sistema	52
4.3.3 precisión del método	53
4.3.4 precisión intermedia	54

4.3.5 Exactitud	55
4.3.6 Selectividad ó especificidad	57
<b>CAPITULO V</b>	
5.0 Resultados y discusión de resultados	60
5.1 Elaboración de protocolo de validación	60
5.2 Resultados de la evaluación de los parámetros de desempeño	80
5.2.1 Determinación de linealidad del sistema	80
5.2.2 Determinación de la precisión del sistema	83
5.2.3 Determinación de la precisión del método	84
5.2.4 Determinación de la exactitud	86
5.2.5 Determinación de la precisión intermedia	88
5.2.6 Determinación de la selectividad ó especificidad	90
5.3 Elaboración de reporte y certificado de validación	93
<b>CAPITULO VI</b>	
6.0 Conclusiones	112
<b>CAPITULO VII</b>	
7.0 Recomendaciones	114
Bibliografía	
Anexos	



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N°</b>	<b>Pág.</b>
1. Preparación de soluciones y reactivos	117
2. Procedimiento de operación HPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000	124
3. Cromatogramas de la determinación de Linealidad del sistema	127
4. Cromatogramas de la determinación de Precisión del sistema	135
5. Cromatogramas de la determinación de Precisión del método	136
6. Cromatogramas de la determinación de Precisión intermedia	141
7. Cromatogramas de la determinación de Exactitud del método	145
8. Cromatogramas de la determinación de Selectividad	150
9. Formulas generales de calculo	152
10. Carta de aceptación de documentación presentada	155

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro N°</b>	<b>Pág.</b>
1. Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos.	29
2. Alcance de la validación para métodos analíticos normalizados	30
3. Alcance de la validación para métodos analíticos no normalizados	31
4. Alcance de la validación para métodos analíticos desarrollados	31
5. Datos requeridos para la validación	43
6. Niveles de concentración con su respectiva concentración final	51,67
7. Esquema de validación del método analítico farmacopólico	77,98
8. Resultados de la evaluación del parámetro linealidad del sistema	80
9. Cuadro resumen de tratamiento de datos para la evaluación del parámetro linealidad del sistema	81
10. Cuadro resumen de la estadística de la regresión del parámetro linealidad del sistema	83
11. Áreas y tiempos de retención de la precisión del sistema	84
12. Datos obtenidos en la precisión del método junto a su estadística	85
13. Cuadro resumen de las respuestas y porcentajes de recobro obtenidos en la exactitud del método	86
14. Cantidad añadida como concentración final con su respectiva respuesta en cada nivel de concentración	87
15. Datos obtenidos en la precisión intermedia junto con su estadística	88
16. Cuadro comparativo de datos entre analista 1 y analista 2	89

17. Cuadro resumen de los coeficientes de variación obtenidos entre analista 1 y analista 2	89
18. Respuestas obtenidas en la evaluación del parámetro de validación selectividad	90
19. Cuadro resumen de resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de validación	92
20. Resultados de la validación del método analítico cromatográfico para la cuantificación de cloranfenicol colirio 0.25%	100,103

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>		<b>Pág.</b>
1.	Estructura de la molécula de cloranfenicol	20
2.	Diagrama de flujo de un cromatógrafo líquido de alto desempeño	27
3.	Curva de regresión para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro linealidad del sistema.	82
4.	Curva de regresión para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro exactitud del método	87
5.	Cromatogramas sobrepuestos de muestra, placebo y estándar respectivamente en forma descendente	91

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto proponer la validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio, para lo cual se utilizó el método analítico descrito en la USP 38.

Se elaboró el protocolo de validación en el cual se estableció el procedimiento, parámetros a evaluar y sus respectivas especificaciones, equipos y reactivos. Se evaluaron los parámetros: Linealidad del sistema, precisión del sistema, precisión del método, precisión intermedia, exactitud, y especificidad. Posteriormente se elaboró el reporte con los resultados obtenidos y el certificado de validación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluyó que el método es seguro y fiable para su utilización bajo las condiciones de uso reales del Laboratorio de Control de Calidad del Laboratorio Farmacéutico Nacional.

Esta investigación se desarrolló en base a lo establecido en el procedimiento interno de validación del Laboratorio Farmacéutico Nacional, la guía de validación del Organismo Salvadoreño de Acreditación y la guía de validación editada por el colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. El desarrollo completo de la propuesta de validación fue llevada a cabo dentro de las instalaciones del Laboratorio Farmacéutico Nacional en el periodo de diciembre de 2016 a enero de 2017.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químico deben de ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, por lo que deben ser validados.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorios y demostrativos, que un método de análisis sea lo suficientemente fiable y reproducible para la obtención del resultado previsto dentro de intervalos definidos. Este proceso permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo; El proceso a seguir debe de estar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Actualmente la validación es un requisito indispensable para los organismos regulatorios del país, como la Dirección Nacional de Medicamentos, que todos los métodos analíticos para el análisis de medicamentos estén debidamente validados y correctamente documentados. La importancia que tiene el evaluar el comportamiento de todos los métodos analíticos oficiales y con mayor relevancia los no oficiales, es para asegurar la obtención datos confiables, y por consiguiente asegurar la calidad de todos los productos farmacéuticos usados por los pacientes.

En el presente trabajo de investigación realizó la propuesta de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol en el producto cloranfenicol colirio 0.25%, el cual es un producto que actualmente no posee un método analítico validado; Se utilizaron 40 frascos de cloranfenicol colirio 0.25% de 15 mililitros cada uno. Los parámetros evaluados: Linealidad del sistema, precisión del sistema, precisión del método, precisión intermedia, exactitud del método, y especificidad del método

mostraron resultados satisfactorios cumpliendo las especificaciones establecidas previamente en el protocolo de validación, obteniéndose así los siguientes resultados: en la precisión del sistema se obtuvo un coeficiente de variación de 0.18% para los tiempos de retención, y de 0.23% para las áreas obtenidas; En la linealidad del sistema se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9998; Para la precisión del método se obtuvo un coeficiente de variación de las concentraciones de las muestras de 1.37% y en la precisión intermedia fue de 1.01%, y un coeficiente de variación global entre analista 1 y analista 2 de 0.04%. En la exactitud del método se obtuvieron los promedios de recobro para cada uno de los niveles 80%, 100% y 120% son 98.96%, 99.44% y 99.77 respectivamente. Finalmente en la evaluación del parámetro selectividad del método, no se encontró ninguna interferencia significativa por parte de la matriz del producto.

La validación del método analítico fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad del Laboratorio Farmacéutico Nacional, en el periodo de diciembre de 2016 a enero de 2017, tomando en cuenta el método de valoración descrito en la USP 38 para ser utilizado dentro del laboratorio de control de calidad del Laboratorio Farmacéutico Nacional.



**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS.**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Proponer la validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 5.2.1 Elaborar el protocolo de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio.
- 5.2.2 Evaluar los parámetros de desempeño del método analítico: Linealidad del sistema, Precisión del sistema, precisión del método, precisión intermedia, exactitud y selectividad.
- 5.2.3 Redactar el reporte y el certificado de validación con sus respectivos resultados y criterios de aceptación.
- 5.2.4 Proporcionar toda la documentación al Laboratorio Farmacéutico Nacional, para que se acredite el proceso de validación ante las instituciones regulatorias.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

## 3.0 MARCO TEORICO

### 3.1 CLORANFENICOL

#### 3.1.1 Definición <sup>(5)</sup>

Este antibiótico, originalmente aislado de un actinomiceto de la tierra (*Streptomyces venezuelae*), es en la actualidad un producto de síntesis química, cuya estructura se presenta en la Figura N° 1. Se encuentra disponible para uso oral y tópico (preparaciones oftalmológicas y dermatológicas).

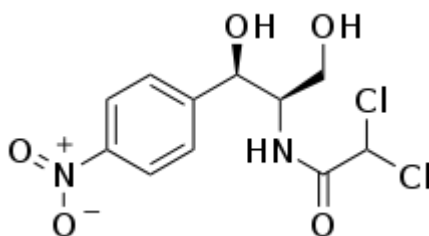


Figura N° 1: Estructura de la molécula de cloranfenicol.

#### 3.1.2 Obtención <sup>(4)</sup>

Se conoce que el cloranfenicol es el primer compuesto natural conocido que contiene un grupo nitro o que deriva del ácido dicloroacético. Su configuración estereoquímica es análoga a la de la (-)-norseudofedrina y es el único de los cuatro estereoisómeros relacionados que poseen actividad antibiótica.

Puede obtenerse del filtrado de cultivos de *Streptomyces venezuelae* por extracción con acetato de etilo. Si el extracto de carbón posee abundante

contenido de cloranfenicol, el antibiótico puede cristalizarse del acetato de etilo mediante dilución con muchos volúmenes de querosén. Hay varios métodos sintéticos para la preparación de cloranfenicol. Uno de los más conocidos comienza con p-nitroacetofenona y, después de su conversión en p-nitro-2-aminoacetofenona, continua con los siguientes pasos: a) acetilación del grupo  $-NH_2$ ; b) reacción con HCHO para introducir el grupo  $-CH_2OH$  terminal; c) reducción con isopropóxido de aluminio para obtener una mezcla racémica de las formas treo y eritro de  $p-NO_2PhCH(OH)CH(NH_2)CH_2OH$ ; d) aislamiento de la forma racémica treo con resolución de este compuesto mediante ácido d-camforsulfónico y e) condensación del (-) enantiomorfo con dicloroacetato de metilo.

### 3.1.3 Descripción <sup>(4)</sup>

Cristales finos en forma de agujas o láminas alargadas de color blanco a blanco grisáceo o blanco amarillento; inodoro; sabor amargo intenso; pH (solución saturada) entre 4.5 y 7.5; relativamente estable en soluciones neutras o moderadamente ácidas pero se descompone con rapidez en soluciones alcalinas; se funde entre 149 y 153 °C:  $pK_a$  5.5.

### 3.1.4 Solubilidad <sup>(4)</sup>

Un gramo en alrededor de 400 mL de agua; completamente soluble en alcohol; ligeramente soluble en éter o cloroformo.

### 3.1.5 Indicaciones terapéuticas <sup>(4)</sup>

El cloranfenicol es un antibiótico con un amplio espectro antibacteriano. Este agente es eficaz para el tratamiento de diferentes infecciones por rickettsias, como los tifus epidémico, murino y de los matorrales; la fiebre manchada de las

montañas rocosas; la rickettsia varioliforme y la fiebre Q; infecciones por clamidias, como psitacosis y linfogranuloma, y numerosas infecciones provocadas por bacterias grampositivas y gramnegativas, incluidos microorganismos anaerobios (sobre todo *Bacteroides fragilis*). Debido al riesgo de manifestaciones tóxicas severas, la administración de cloranfenicol por vía sistémica debe limitarse a la terapéutica de infecciones muy graves que no pueden tratarse con otros agentes. El cloranfenicol aun es el fármaco de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea. Se utiliza en forma tópica para el tratamiento de infecciones superficiales de la conjuntiva y la blefaritis causada por *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella lacunata*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus hemolyticus*. El efecto tóxico más temido es la lesión de la médula ósea. Las alteraciones hemáticas más graves asociadas con el fármaco son trombocitopenia, granulocitopenia y anemia aplásica, y estos trastornos fueron responsables de varios desenlaces fatales.

### **3.1.6 Efectos tóxicos <sup>(4)</sup>**

En los neonatos el cloranfenicol puede provocar el síndrome gris, una cianosis que a veces es fatal (el 40% de los casos) asociada con vómitos distensión abdominal y deposiciones blandas de color verde, que se debe a la incapacidad de metabolizar la droga por falta de la enzima glucoronil transferasa. En un pequeño subgrupo de pacientes (sobre todo en niños que reciben tratamiento prolongado) induce atrofia óptica y ceguera.

El cloranfenicol también se asoció con algunos efectos indeseables de menor envergadura, como euforia leve transitoria, rash y trastornos gastrointestinales; Esta contraindicado en pacientes con antecedentes de sensibilización al fármaco.

## **3.2 PREPARACIONES OFTÁLMICAS <sup>(2)</sup>**

### **3.2.1 Definición <sup>(2)</sup>**

Las soluciones oftálmicas son preparaciones estériles, libres de partículas extrañas, que contienen uno o más fármacos disueltos generalmente en agua y cuya finalidad en la aplicación tópica en los ojos, estable química y biológicamente y no irritante a la córnea. Es importante considerar la toxicidad del fármaco, la isotonicidad, la elección de los agentes amortiguadores y conservadores, la esterilización y envase apropiado.

### **3.2.2 Isotonicidad de las soluciones oftálmicas <sup>(2)</sup>**

Las soluciones oftálmicas deben ser isotónicas, viscosas, estériles y de preferencia tener un pH cercano al del líquido lagrimal entre 7.0 y 7.4.

La isotonicidad se logra agregando cloruro de sodio u otra sal en caso de existir compatibilidad. El líquido lagrimal tiene un valor de isotonicidad que corresponde a una solución al 0.9 por ciento de cloruro de sodio, idealmente una solución oftálmica deberá tener ese mismo valor de isotonicidad. Los márgenes considerados como no irritantes para el ojo, van de 0.6 a 0.2 por ciento de cloruro de sodio.

Algunas soluciones oftálmicas son necesariamente hipertónicas para favorecer la absorción y proveer una adecuada concentración de ingredientes activos para una acción terapéutica efectiva.

### **3.2.3 Viscosidad de las soluciones oftálmicas <sup>(2)</sup>**

El aumentar la viscosidad de las soluciones, reduce la posibilidad de que el fármaco sea eliminado por el lagrimeo y por lo tanto aumenta el tiempo de

contacto del fármaco con la córnea, aumentando el efecto terapéutico del producto.

Los derivados de la celulosa; metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, en concentraciones que van desde 0.25 a 1.0 por ciento son los agentes viscosantes comúnmente usados.

Existen otras sustancias que pueden ser adicionadas a las soluciones oftálmicas como el etilendiaminoacetato disódico, utilizado como secuestrante de iones y el polisorbato como tensioactivo para favorecer la solubilidad de ciertos principios activos.

#### **3.2.4 Esterilidad <sup>(2)</sup>**

La esterilidad es primordial para no agregar al ojo enfermo una nueva lesión como sería una posible infección producida por una solución oftálmica contaminada. Lo ideal sería elaborar soluciones oftálmicas estériles en frascos monodosis pero dados los problemas que esto acarrearía en el acondicionamiento y el elevado costo de elaboración, las preparaciones se presentan en el mercado como multidosis y en este caso es imprescindible, para asegurar su esterilidad durante todo el periodo de su vida útil, el agregar conservadores.

#### **3.2.5 pH <sup>(2)</sup>**

Para lograr un pH adecuado, en algunos casos se agregan algunas sustancias amortiguadoras como el acetato de sodio y ácido bórico que son soluciones isotónicas con capacidad amortiguadora mayor que la de los fosfatos y que además disminuye notablemente la irritación. Las soluciones Sorensen, son también utilizadas como vehículos en las soluciones oftálmicas, siendo éstas una combinación de sales de fosfatos monosódico y disódico, que se hacen isotónicas al agregar cloruro de sodio.



### **3.2.6 Conservadores** <sup>(2)</sup>

Los conservadores no deben ser irritantes, ni tóxicos al tejido ocular, a pesar de un uso prolongado, deben ser compatibles con los demás componentes de la fórmula y tener una alta actividad bactericida frente a un amplio espectro de microorganismos, y no deben interferir con los análisis propuestos.

## **3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO** <sup>(3)</sup>

### **3.3.1 Definición** <sup>(3)</sup>

El término cromatografía líquida, según se usa en los compendios, es sinónimo de cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

### **3.3.2 Fase estacionaria** <sup>(3)</sup>

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria usada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son las de sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga. El tipo de relleno específico necesario para completar un análisis se indica mediante la designación "L" en la monografía individual. A menudo, el tamaño de las microperlas también se escribe en la monografía.

### **3.3.3 Columna cromatográfica** <sup>(3)</sup>

El término columna incluye columnas de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro interno de la columna afectan la separación y por lo tanto, las dimensiones típicas de la columna se incluyen en la monografía individual. Las

monografías farmacopéicas no incluyen el nombre comercial de las columnas apropiadas; esta omisión evita la interpretación de cualquier tipo de respaldo para un producto de un proveedor y permite la adaptación a cambios normales en el mercado.

En los procedimientos de HPLC, se puede usar una guarda columna siempre que se cumplan los siguientes requisitos, a menos que se indique algo diferente en la monografía individual: (a) la longitud de la guarda columna debe ser no mayor de 15% de la longitud de la columna analítica, (b) el diámetro interno debe ser igual o menor que el de la columna analítica y (c) el material de relleno debe ser el mismo que en la columna analítica (p.ej., sílice) y contener la misma fase ligada (p.ej., C18). En todo caso se deben cumplir los requisitos de aptitud del sistema especificados en el procedimiento oficial con la guarda columna instalada.

#### **3.3.4 Fase móvil** <sup>(3)</sup>

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la monografía individual.

#### **3.3.5 Equipo HPLC** <sup>(3)</sup>

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos, tal como se ejemplifica en la Figura N° 2.

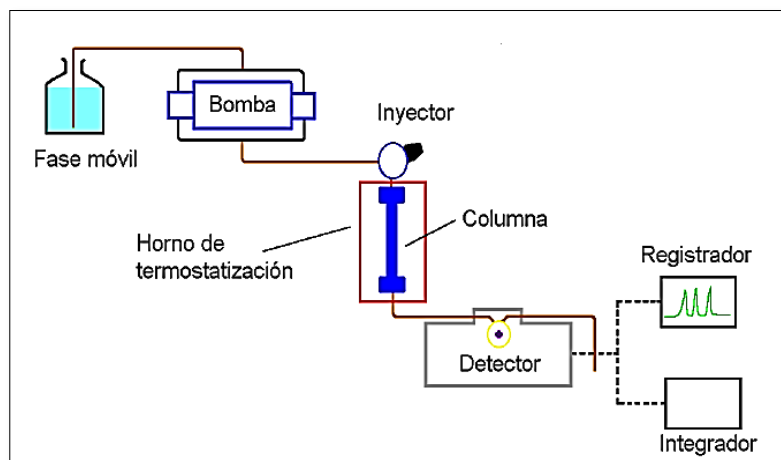


Figura 2: Diagrama de flujo de un cromatógrafo líquido de alto desempeño

### 3.3.6 Elución en gradiente <sup>(3)</sup>

Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente a la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que se indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.

### 3.3.7 Procedimiento general de uso <sup>(3)</sup>

- Equilibrar la columna y el detector con la fase móvil a la velocidad de flujo especificada hasta obtener una señal constante.
- Inyectar una muestra a través del inyector o usar un muestreador automático.
- Comenzar el programa de gradientes.
- Registrar el cromatograma.
- Analizar según se indica en la monografía.

### 3.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS <sup>(3)</sup>

La validación es un procedimiento analítico que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de procedimientos descritos, se indican en la tabla 1. Dado que las opiniones pueden diferir respecto a la terminología y al uso, cada una de las características de desempeño se definirá posteriormente en el presente trabajo. Las definiciones hacen referencia a “resultados de las pruebas”. La descripción del procedimiento analítico debe definir cuáles son los resultados de las pruebas para el procedimiento. De acuerdo con ISO 5725-1 Y 3534-1, un resultado de una prueba es “el valor de una característica que se obtiene al llevar a cabo un método de prueba específico. El método de prueba debería especificar que debe realizarse una o varias mediciones individuales, y que su promedio, u otra función apropiada (tal como la mediana o la desviación estándar), debe informarse como el resultado de la prueba. Asimismo, puede requerir que se apliquen correcciones estándar tales como corrección de los volúmenes de gas a temperatura y presión estándar. Por consiguiente, un resultado de una prueba puede ser un resultado calculado a partir de diversos valores observados. En el caso más simple, el resultado de una prueba es en si el valor observado. Aunque no necesariamente, un resultado de una prueba también puede ser el valor final informable que se compararía con los criterios de aceptación de una especificación. La validación de métodos de propiedades físicas puede implicar la evaluación de modelos quimiométricos. No obstante, las características analíticas típicas usadas en la validación de métodos se pueden aplicar a los métodos derivados del uso de modelos quimiométricos.

Cuadro N° 1: Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos

<b>Características de desempeño analítico.</b>
Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Linealidad
Intervalo
Robustez

Los efectos de las condiciones de procesamiento y el potencial de segregación de materiales deben considerarse durante la obtención de una muestra representativa que se usara en la validación de procedimientos.

En el caso de procedimientos farmacopéicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: una presentación a la USP de un procedimiento analítico revisado o utilización de un procedimiento general establecido con un nuevo producto o materia prima (ver más adelante en datos requeridos para la validación).

Los documentos de ICH aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias:

- Cambio en la síntesis del fármaco
- Cambios en la composición del producto farmacéutico
- Cambios en el procedimiento analítico.

La validación de procedimientos farmacopéicos puede involucrar algunas o todas las características típicas sugeridas que se usan en la validación de métodos según se especifica en el Cuadro N° 1 y se categorizan más adelante por tipo de método analítico en el Cuadro N° 5.

### 3.5 ESTABLECIMIENTO DEL ALCANCE DE LA VALIDACIÓN <sup>(6)</sup>

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

1. Se trata de un método de ensayo estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma/procedimiento.
2. Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado o cuando se use un método proporcionado por el proveedor de un equipo o sistema analítico.
3. Se trata de un método de ensayo desarrollado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos.

A continuación se describe los requerimientos para cada uno de los casos descritos anteriormente.

Cuadro N° 2: Alcance de la validación para métodos analíticos normalizados.

Parámetro	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del método	No	+	+	+
Rango	No	+	+	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de detección	+	No	No	No
Límite de cuantificación	No	+	+	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

\*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (Ej.: disolución).

Cuadro N° 3: Alcance de la validación para métodos analíticos no normalizados.

Parámetro	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/especificidad	Sí	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	+	+	+	+
Linealidad del sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del método	No	Sí	Sí	+
Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de detección	+	No	No	No
Límite de cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	+	+	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

\*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (Ej.: disolución).

Cuadro N° 4: Alcance de la validación para métodos analíticos desarrollados.

Parámetro	Identificación	Cuantificación de componentes mayoritarios	Cuantificación de componentes minoritarios o impurezas en trazas	Evaluación de características establecidas*
Selectividad/especificidad	Sí	Sí	Sí	+
Estabilidad analítica de la muestra	Sí	Sí	Sí	+
Linealidad del sistema	No	Sí	Sí	+
Linealidad del método	No	Sí	Sí	+
Rango	No	Sí	Sí	+
Exactitud	No	Sí	Sí	+
Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Precisión intermedia	No	Sí	Sí	Sí
Reproducibilidad	No	++	++	++
Límite de detección	Sí	No	+	No
Límite de cuantificación	No	+	Sí	+
Robustez	+	Sí	Sí	+

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la normativa de referencia o la naturaleza del análisis.

++: Dependerá de la disponibilidad de laboratorios.

\*: En esta categoría se hace alusión a procesos previos a la cuantificación (Ej.: disolución).

### **3.6 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO <sup>(3)</sup>**

#### **3.6.1 Exactitud <sup>(3)</sup>**

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

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

En la valoración de un fármaco de un producto formulado la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se pueden aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico como la comparación de resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo



especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente sea cercano a 1. En ambos casos el intervalo o la definición de cercanía deberá especificarse en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad, y del producto. La exactitud de los métodos de propiedades físicas se puede evaluar a través del análisis de materiales de referencia estándar o, alternativamente, se puede considerar la aptitud de las metodologías mencionadas anteriormente para cada caso en particular.

### **3.6.2 Precisión <sup>(3)</sup>**

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproductibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproductibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo.

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

Los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba.

### **3.6.3 Especificidad <sup>(3)</sup>**

Los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) definen la especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analíto en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales 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. (Nota: otras autoridades internacionales de reconocido prestigio como La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y La Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC) han preferido el término “selectividad”, reservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente

selectivos). Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes implicancias:

- Pruebas de identificación: garantizan la identidad del analíto.
- Pruebas de pureza: garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analíto (por ejemplo, pruebas de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, impurezas orgánicas volátiles).
- Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analíto en una muestra.

En análisis cualitativos (Pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analíto (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analíto, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analíto.

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

Los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) afirman que cuando se utilizan procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de purezas de picos

(ej: utilizando arreglo de diodos o espectrometría de masas) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente.

#### **3.6.4 Límite de detección <sup>(3)</sup>**

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración de analito (Ej: porcentaje, partes por billón.) en la muestra.

Para procedimientos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente.

Para procedimientos instrumentales se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados para su consideración como procedimientos farmacopéicos oficiales, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. Más bien, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores o inferiores al nivel de detección requerido. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza con una concentración del 0.1%, debería demostrarse que el procedimiento detectara de modo confiable la impureza a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan un ruido de fondo, los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH)

describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito las de muestra blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.

### **3.6.5 Límite de cuantificación <sup>(3)</sup>**

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como impurezas de fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de analito (Ej: porcentaje, partes por billón.) en la muestra.

Para procedimientos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados para su consideración como procedimientos farmacopeicos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Más bien debe demostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente

bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0,1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificará de modo confiable el analito a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que pueda cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del enfoque utilizado, el límite de cuantificación deberá validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas al límite de cuantificación.

### **3.6.6 Linealidad e intervalo <sup>(3)</sup>**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. En esta sección, la “linealidad” se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración. En algunos casos, para lograr la linealidad, puede ser necesario transformar la concentración y/o la medida. (Notar que los factores de corrección usados en el análisis de regresión puede cambiar cuando se aplica la transformación.) Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o el recíproco, aunque otras transformaciones son aceptables. Si

no se puede lograr la linealidad se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal.

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analíto (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analíto con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (ej.: porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales en función de la concentración del analíto contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (ej.: mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analíto en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

El Consejo Internacional de Armonización (ICH) recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

- Valoración de un fármaco (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.
- Determinación de una impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.
- Para uniformidad del contenido: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (ej.: inhaladores de dosis fija).
- Para pruebas de disolución:  $\pm 20\%$  por encima del intervalo especificado (ej.: Si los criterios de aceptación de un producto de liberación controlada cubren una región de 30% después de una hora, y hasta 90% después de 24 horas, el intervalo válido sería de 10% a 110% de la cantidad declarada).

La definición tradicional de linealidad, es decir, el establecimiento de una relación lineal o matemática entre la concentración de la muestra y la respuesta, no es aplicable al análisis del tamaño de partícula. Para el análisis de tamaño de partícula, se define un intervalo de concentración (que depende del instrumento y del tamaño de partícula) tal que la distribución de tamaño de partícula medida no se vea afectada por cambios en la concentración dentro del intervalo de concentración definido. Las concentraciones por debajo del intervalo de concentración definido pueden introducir un error debido a una pobre relación señal-ruido, mientras que las concentraciones que exceden el intervalo de concentración definido puede introducir un error debido a dispersiones múltiples.

### **3.6.7 Robustez <sup>(3)</sup>**

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



### **3.6.8 Aptitud del sistema <sup>(3)</sup>**

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, estas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa. Variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas. En la cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas la temperatura y la velocidad de flujo. Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento específico dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando. Son especialmente importantes en el caso de procedimientos cromatográficos.

### **3.7 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN <sup>(3)</sup>**

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación.

En el presente trabajo se cubrirán solo las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación. Estas categorías, según la Farmacopea de los Estados Unidos son las siguientes:

- Categoría I: procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
  
- Categoría II: procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación de productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.
  
- Categoría III: procedimientos analíticos para la determinación de características de desempeño (Ej.: disolución, liberación de fármacos).
  
- Categoría IV: pruebas de identificación

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En el Cuadro N° 5 se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de las siguientes categorías.

La validez de un procedimiento analítico puede verificarse solo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la conclusión exitosa de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un procedimiento es adecuado para sus aplicaciones previstas. Los procedimientos farmacopéicos oficiales también están sujetos a reglamentos que requieren la demostración de aptitud en las condiciones reales de uso. Cualquier propuesta de procedimientos farmacopéicos analíticos nuevos o revisados deben ir acompañados de la documentación adecuada.

Cuadro N° 5: Datos requeridos para la validación.

Características de desempeño analítico.	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas límite.		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

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

### 3.8 VERIFICACION DE PROCEDIMIENTOS FARMACOPEICOS <sup>(3)</sup>

La intención de la verificación de procedimientos farmacopéicos es proporcionar información general sobre la verificación de procedimientos farmacopéicos que se llevan a cabo por primera vez para lograr resultados aceptables con el personal, equipo y reactivos disponibles. De acuerdo a la validación de procedimientos farmacopéicos, tema el cual proporciona información general sobre las características que deben considerarse para las distintas categorías de pruebas así como también la documentación que debe acompañar a los procedimientos analíticos presentados. La verificación consiste en la evaluación de las características de desempeño analíticas seleccionadas, como las que se describen en la validación de procedimientos farmacopéicos, para generar datos relevantes y adecuados en vez de repetir el proceso de validación.

Los usuarios de los procedimientos analíticos farmacopéicos no necesitan validar estos procedimientos cuando los usan por primera vez en sus

laboratorios, aunque deben establecer evidencias documentadas de aptitud en las condiciones de uso reales. En los Estados Unidos, se estableció este requisito en las reglamentaciones de buenas prácticas de fabricación vigentes, que declara que “se verificará la aptitud de todos los métodos de prueba usados bajo las condiciones de uso reales.”

### **3.8.1 Proceso de verificación <sup>(3)</sup>**

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

Los usuarios deben contar con la experiencia, conocimiento y capacitación adecuadas para entender y estar en condiciones de llevar a cabo los procedimientos farmacopéicos, tal como fueron escritos. El usuario debe realizar la verificación de manera que los resultados proporcionen suficiente confianza de que el procedimiento farmacopéico será llevado a cabo con la aptitud requerida.

Si la verificación del procedimiento farmacopéico no es exitosa y la asistencia del personal de la USP no logra solucionar el problema, se puede concluir que posiblemente el procedimiento no sea apto para usar con el artículo que se está evaluando en el laboratorio. Quizás se requiera desarrollar y validar un procedimiento alternativo, según lo permitan las advertencias generales. Se puede enviar el procedimiento alternativo a la USP, conjuntamente con los datos adecuados, en apoyo de una propuesta para la inclusión o reemplazo del procedimiento farmacopéico vigente.

### 3.8.2 Requisitos de verificación <sup>(3)</sup>

Los requisitos de verificación deben basarse en la evaluación de la complejidad tanto del procedimiento como del material al que se aplica el procedimiento. Si bien para verificar la aptitud de un procedimiento en las condiciones de uso reales no se requiere la revalidación completa del método farmacopéico, para el proceso de verificación se pueden usar algunas de las características de desempeño analítico que se enumeran en el capítulo de validación de procedimientos farmacopéicos, Cuadro N° 5. Solo hay que evaluar las características que se consideran adecuadas para la verificación del procedimiento específico. El proceso mediante el cual se evalúa la aptitud de un procedimiento de prueba analítico farmacopéico puede requerir o no la ejecución, en condiciones reales, del procedimiento para cada una de las características de desempeño analítico. El grado y extensión del proceso de verificación puede depender del nivel de formación y experiencia del usuario, del tipo de procedimiento y los equipos o instrumentos asociados, los pasos específicos del procedimiento y el artículo en análisis.

La verificación debe evaluar si el procedimiento farmacopéico es apto para el fármaco y/o la matriz del producto farmacéutico, teniendo en cuenta la ruta de síntesis del fármaco, el método de fabricación del producto farmacéutico o ambos, cuando corresponda. En la verificación se deben evaluar diversos elementos, tales como el efecto de la matriz sobre la recuperación de impurezas y fármacos desde la matriz de producto farmacéutico, la aptitud de las columnas y condiciones cromatográficas, y la adecuada respuesta de la señal del detector, entre otros.

Como ejemplo, la evaluación de especificidad es un parámetro clave en la verificación de que un procedimiento farmacopéico es apto para usar en la valoración de fármacos y productos farmacéuticos. Por ejemplo se puede verificar la especificidad aceptable para un método cromatográfico por

conformidad con los requisitos de resolución de aptitud del sistema (si se especifican en el procedimiento). Sin embargo los fármacos de proveedores distintos pueden tener perfiles de impurezas diferentes que no son considerados por el procedimiento de prueba farmacopéico. De igual manera, los excipientes en un producto farmacéutico pueden variar ampliamente entre los fabricantes y tener el potencial para interferir en forma directa con el procedimiento o causar la formación de impurezas no consideradas en el procedimiento farmacopéico. Además, los productos farmacéuticos que contengan diferentes excipientes, antioxidantes, amortiguadores o material extraíble del envase, pueden afectar la recuperación del fármaco a partir de la matriz. En estos casos, puede requerirse una evaluación más profunda de los efectos de la matriz para demostrar la aptitud del procedimiento para el fármaco o producto farmacéutico específico. Otras características de desempeño analítico, como la evaluación del límite de detección o cuantificación y precisión del procedimiento para impurezas pueden ser muy útiles para demostrar la aptitud del procedimiento farmacopéico en las condiciones de uso reales.

### **3.9 DOCUMENTACIÓN <sup>(1)</sup>**

Las actividades de la validación de un método analítico deben ser sustentadas por los siguientes documentos: Protocolo, reporte y certificado;

a) Protocolo:

1. Título
2. Propósito u Objetivo.
3. Responsabilidades.
4. Plan de prueba describiendo los parámetros de desempeño que permitan verificar la aplicación analítica deseada.
5. Criterios de aceptación para cada parámetro.
6. Formato de registro de resultados.

b) Reporte:

1. Título.
2. Resultados.
3. Análisis de resultados.
4. Confrontación contra los criterios de aceptación.
5. Conclusión.

c) Certificado:

1. Resumen del protocolo de validación.
2. Responsables.
3. Resumen de los resultados obtenidos.
4. Conclusiones.
5. Dictamen.

La documentación deberá estar ordenada y disponible, en responsabilidad del área de calidad.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**



## IV. DISEÑO METODOLÓGICO.

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

- Prospectivo:** Los resultados obtenidos se podrán utilizar para estudios futuros, podrá servir como una guía para la validación de métodos analíticos similares o para su adaptación a otros métodos diferentes (Ultravioleta-visible, infrarrojo etc.)
- Exploratorio:** Porque se pretende presentar una posible solución a la problemática presentada.
- Experimental:** Porque se realizan ensayos en el laboratorio de control de calidad del Laboratorio Farmacéutico Nacional para la obtención de datos y posteriormente darles tratamiento estadístico.

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La investigación bibliográfica se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Laboratorio Farmacéutico Nacional, San Salvador.
- Internet.

### 4.3 PARTE EXPERIMENTAL

De acuerdo a la investigación bibliográfica realizada, y tomando en cuenta que el método analítico a validar es farmacopéico y de acuerdo a lo estipulado en el alcance de la validación para métodos normalizados descrito en este trabajo, así como también en el apartado de la Farmacopea de los Estados Unidos 38, verificación de procedimientos farmacopéicos, y considerando que el equipo HPLC se encuentra calibrado y calificado, se determinó que los parámetros de validación a evaluar para el método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio 0.25% son: Linealidad del sistema, Precisión del sistema, Precisión del método, Precisión intermedia, Exactitud del método y Selectividad del método; Para lo cual se utilizaron 40 frascos con capacidad de 15 mL cada uno, los cuales fueron proporcionados por la bodega de producto terminado del Laboratorio Farmacéutico Nacional.

#### 4.3.1 Linealidad del sistema. <sup>(3)</sup>

La linealidad se refiere a la relación lineal, entre la concentración y la medida de la valoración; Se realiza preparando 5 niveles de concentración por triplicado con sustancia de referencia (Estándar), por dilución a partir de una solución concentrada. Se Incluye el intervalo de especificación para el producto, que para el caso es del 90.0% al 110.0%.

##### **Procedimiento:**

- Preparar por triplicado una solución madre de estándar de cloranfenicol base con una concentración de 1.0 mg/mL en fase móvil.
- A partir de esta solución preparar por triplicado 5 niveles de concentración correspondiente a 80%, 90%, 100%, 110%, y 120% de la concentración

teórica, según el siguiente cuadro. Ver anexo N°1, preparación de soluciones para linealidad.

Cuadro N° 6. Niveles de concentración con su respectiva concentración final.

Nivel de concentración	Concentración final Cloranfenicol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración final Cloranfenicol( $\text{mg/mL}$ )
80%	80 $\mu\text{g/mL}$	0.08 $\text{mg/mL}$
90%	90 $\mu\text{g/mL}$	0.09 $\text{mg/mL}$
100%	100 $\mu\text{g/mL}$	0.10 $\text{mg/mL}$
110%	110 $\mu\text{g/mL}$	0.11 $\text{mg/mL}$
120%	120 $\mu\text{g/mL}$	0.12 $\text{mg/mL}$

- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución de estándar para cada una de las 3 series, de acuerdo a la siguiente secuencia, solución al 80%, 90%, 100%, 110% y 120%. Ver anexo N° 3, método de análisis.

#### **Cálculos:**

- Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $\text{IC}(b_1)$ ). Para todos los cálculos se utilizar la herramienta de hoja de cálculo. Ver anexo N° 11, Formulas generales de cálculo.

#### **Especificación:**

- $r^2 \geq 0.98$
- $\text{IC}(b_1)$  no debe de incluir el cero.

#### 4.3.2 Precisión del sistema. (3)

Evaluar el grado de dispersión obtenida al aplicar el método a una preparación de una solución de estándar al 100% sin tratamiento adicional y realizar 6 inyecciones consecutivas.

##### **Procedimiento:**

- Preparar una solución del estándar de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, 6 inyecciones consecutivas de 10 microlitros, de la misma solución de estándar al 100%. Ver anexo N° 3, método de análisis.

##### **Cálculos:**

- Evaluar su dispersión calculando el coeficiente de variación de los tiempos de retención y coeficiente de variación de las áreas obtenidas del pico de cloranfenicol base. Para todos los cálculos utilizar la herramienta de hoja de cálculo. Ver anexo N° 11, Formulas generales de cálculo.

##### **Especificación:**

- $CV \leq 2.0\%$  para respuestas analíticas
- $CV \leq 1.0\%$  para tiempos de retención.

### 4.3.3 Precisión del método. <sup>(3)</sup>

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. Realizar las determinaciones con 6 soluciones de estándar y 6 soluciones de prueba.

#### **Procedimiento:**

- Preparar una serie de 6 soluciones de estándar de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar una serie de 6 soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol, con una concentración final de 100 µg/mL de cloranfenicol equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba al 100%.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie. Ver anexo N° 3, método de análisis.

#### **Cálculos y análisis:**

- Determinar el contenido químico de cloranfenicol de cada una de las 6 muestras, con su respectivo estándar.
- Determinar el coeficiente de variación de las respuestas de los estándares.

- Determinar el coeficiente de variación de la valoración de las 6 muestras. Para todos los cálculos utilizar la herramienta de hoja de cálculo. Ver anexo N° 4, Formulas generales de cálculo.

**Especificación:**

- $CV \leq 2.0\%$  para respuestas de los estándares.
- $CV \leq 2.0\%$  para las concentraciones de la valoración de las muestras.

**4.3.4 Precisión intermedia.** <sup>(3)</sup>

También conocida como tolerancia o fortaleza, expresa la variación de los resultados dentro de un laboratorio, es decir:

- Días diferentes.
- Diferentes analistas.
- Equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

Esta prueba la realiza un segundo analista, utilizando como muestra el mismo lote de producto terminado, bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Ver protocolo de validación en cumplimiento de objetivos.

**Procedimiento:**

- Preparar una serie de 6 soluciones de estándar de cloranfenicol base con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar una serie de 6 soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$

de cloranfenicol base equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba al 100%.

- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie. Ver anexo N° 3, método de análisis.

#### **Cálculos y análisis:**

- Determinar el contenido químico de cloranfenicol base de cada una de las 6 muestras, con su respectivo estándar.
- Determinar el coeficiente de variación de las respuestas de los estándares.
- Determinar el coeficiente de variación de la valoración de las 6 muestras.
- Determinar el coeficiente de variación global de los promedios de las respuestas de las muestras, los miligramos obtenidos y concentraciones de las muestras, entre analista 1 y analista 2. Para todos los cálculos utilizar la herramienta de hoja de cálculo. Ver anexo N° 11, Formulas generales de cálculo.

#### **Especificación:**

- $CV \leq 3.0\%$  para promedios globales de las respuestas de las muestras, los miligramos obtenidos y concentraciones de las muestras, entre analista 1 y analista 2.

#### **4.3.5 Exactitud.** <sup>(3)</sup>

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real. Representa el grado en que un método analítico se ajusta al valor verdadero para todo propósito práctico.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a placebos al que se le han añadido

pequeñas cantidades de principio activo. A partir de los resultados luego se calcula como la exactitud como el porcentaje de analíto recuperado por medio de la valoración.

**Procedimiento:**

- Preparar una serie de 3 soluciones de estándar de cloranfenicol base con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar por triplicado las siguientes soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol (9 en total).

Matriz + principio activo al 80%  
Matriz + principio activo al 100%  
Matriz + principio activo al 120%

Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba para exactitud del método.

- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución, de acuerdo a la siguiente secuencia. Ver anexo N° 3, método de análisis.

Estándar 1  
Muestra al 80%  
Muestra al 100%  
Muestra al 120%  
Hasta terminar las 3 series.



**Cálculos y análisis:**

- Determinar para cada serie de muestras, con referencia a su estándar respectivo, el porcentaje de recobro de la cantidad conocida del analito agregado a la matriz y se comparó el valor real obtenido con el valor teórico esperado, tomando en cuenta el nivel de porcentaje utilizado.
- Determinar el coeficiente de correlación de los datos obtenidos en la regresión. Para todos los cálculos utilizar la herramienta de hoja de cálculo. Ver anexo N° 11, Formulas generales de cálculo.

**Especificación:**

- Porcentaje de recobro del 98.0% al 102.0% para métodos cromatográficos.
- Coeficiente de correlación de la regresión  $\geq 0.98\%$ .
- CV  $\leq 2.0\%$  para cada serie de muestras por nivel de concentración.

**4.3.6 Selectividad o especificidad. (3)**

La especificidad es una medida del grado (o ausencia) de interferencia de sustancias debidas a la matriz o placebo y al solvente con respecto al analito de interés.

**Procedimiento:**

- Preparar una solución del estándar de cloranfenicol base con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar una solución de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  de cloranfenicol base equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de solución de prueba al 100%.

- Preparar una solución con matriz del producto, con una cantidad equivalente de matriz a la de la muestra. Ver anexo N°1, preparación de solución con matriz del producto.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución. Ver anexo N° 3, método de análisis.

**Cálculos y análisis:**

- Evaluar la probable interferencia debido al placebo y obtuvieron los respectivos cromatogramas de estándar, muestra y placebo.

**Especificación:**

- No debe de existir interferencia significativa por parte de los componentes de la matriz.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## **5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **5.1 Elaboración de protocolo de validación**

Se elaboró un protocolo de validación el que incluye un encabezado en todas las páginas que contiene el nombre del documento, que para el caso es: Protocolo de validación de métodos analíticos.

También contiene el número de edición, la fecha de vigencia, y el número correlativo de página con el total, evitando con esto la modificación no autorizada del documento. A continuación posee el nombre del producto y un número genérico codificado de protocolo, llevando un control de todos los protocolos autorizados dentro del laboratorio.

La portada contiene nombre y firma de quien lo elaboró y autorizó. Posteriormente contiene un índice, una introducción, el objetivo, el fundamento de la validación o antecedentes, la evaluación de riesgos y los equipos que se utilizaron en la validación, incluida la fecha de última calibración de cada uno.

También establece los parámetros de validación a evaluar, con el procedimiento, cálculos y especificaciones requeridos en cada uno de los parámetros.

Se incluye además un esquema resumen de los parámetros de validación; Así como los materiales y reactivos a utilizar, finalmente la bibliografía utilizada para su redacción.

A continuación se presenta la propuesta del protocolo de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 1 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**Elaborado por:**

<b>Firma:</b>	
<b>Nombre:</b>	Oscar López
<b>Cargo:</b>	Químico Analista
<b>Fecha:</b>	Noviembre 2016

**Autorizado por:**

<b>Firma:</b>	
<b>Nombre:</b>	Lic. Eliseo Ayala
<b>Cargo:</b>	Asesor
<b>Fecha:</b>	Noviembre 2016

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 2 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**INDICE:**

1. Introducción.
2. Objetivo.
3. Fundamento de validación o antecedentes.
4. Evaluación de riesgos.
5. Equipos a utilizar.
6. Parámetros a evaluar para la validación del método analítico farmacopéico.
7. Esquema de validación del método analítico farmacopéico.
8. Materiales y reactivos.
9. Bibliografía.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 3 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

## 1. INTRODUCCION

De acuerdo a lo descrito en el apartado <1226> de la USP 38, los métodos analíticos oficiales o farmacopéicos no requieren ser validados completamente, por ello, debe de realizar una verificación documentada, para dejar una constancia que el método analítico funciona correctamente en el laboratorio donde se utilizará. El proceso de verificación de métodos analíticos farmacopéicos es la evaluación que sirve para determinar si el método puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales; Lo que permite una obtención exhaustiva de pruebas demostrativas que están debidamente documentadas, en donde, un método analítico farmacopéico debe ser lo suficientemente fiable como para poder reproducir el resultado previsto en las condiciones de uso reales.

## 2. OBJETIVO.

Establecer la evidencia documentada de la verificación del método analítico farmacopéico para la valoración de contenido de cloranfenicol colirio 0.25%, el cual debe ser capaz de producir consistentemente los mismos resultados, demostrando que es apto para el activo y matriz del

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 4 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

producto farmacéutico, en las condiciones reales de uso.

### **3. FUNDAMENTO DE VALIDACIÓN O ANTECEDENTES.**

Al realizar una verificación de un método analítico farmacopéico, se requiere el plantear ciertas ventajas que presenta su desarrollo:

- Establecer evidencias documentadas de la aptitud del método de análisis farmacopéico en las condiciones de uso reales.
- Proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.
- Permitir un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento.

### **4. EVALUACIÓN DE RIESGOS.**

En la verificación del método analítico farmacopéico de la valoración de contenido de cloranfenicol colirio 0.25%, se tomaran en cuenta ciertos factores como las condiciones de temperatura en el área de análisis y el efecto de la matriz sobre la recuperación del fármaco.

### **5. EQUIPOS A UTILIZAR.**

Los equipos a utilizar para la verificación del método analítico farmacopéico para la valoración de cloranfenicol colirio 0.25%, son los siguientes:



<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 5 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**-Balanza analítica.**

Marca: Sartorius

Modelo: Quintix 224-1S

Fecha de última calibración: 08/01/16

**-Balanza analítica.**

Marca: Mettler Toledo

Modelo: AG204-S

Fecha de última calibración: 07/03/16

**-Cromatógrafo líquido de alto desempeño (HPLC).**

Marca: Thermo Scientific

Modelo: Dionex ultimate 3000

Fecha de última calibración: 07/01/16

**-Cromatógrafo líquido de alto desempeño (HPCL).**

Marca: Shimadzu

Modelo: Prominence 20A

Fecha de última calibración: 18/01/16

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 6 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

## **6. PARAMETROS A EVALUAR PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO FARMACOPÉICO.**

### **Linealidad del sistema.**

La linealidad se refiere a la relación lineal, entre la concentración y la medida de la valoración; Se realiza Preparando 5 niveles de concentración por triplicado con sustancia de referencia (Estándar), ya sea por dilución a partir de una solución concentrada, ó por pesadas independientes cuando no sea posible por dilución. Incluir el intervalo de especificación, que para el caso será del 90.0% al 110.0%.

#### **Procedimiento:**

- Preparar por triplicado una solución madre de estándar de cloranfenicol base con una concentración de 1.0mg/mL en fase móvil.
- A partir de esta solución preparar por triplicado 5 niveles de concentración correspondiente a 80%, 90%, 100%, 110%, y 120% de la concentración teórica, según el Cuadro N° 2. Ver anexo N°1, preparación de soluciones para linealidad.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 7 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Cuadro N° 6. Niveles de concentración con su respectiva concentración final.

Nivel de concentración	Concentración final Cloranfenicol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración final Cloranfenicol(mg/mL)
80%	80 $\mu\text{g/mL}$	0.08 mg/mL
90%	90 $\mu\text{g/mL}$	0.09 mg/mL
100%	100 $\mu\text{g/mL}$	0.10 mg/mL
110%	110 $\mu\text{g/mL}$	0.11 mg/mL
120%	120 $\mu\text{g/mL}$	0.12 mg/mL

- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución de estándar para cada una de las 3 series, de acuerdo a la siguiente secuencia. Ver anexo N° 3, método de análisis.

- 1) Solución al 80%
- 2) Solución al 90%
- 3) Solución al 100%
- 4) Solución al 110%
- 5) Solución al 120%

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 8 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Cálculos:

- Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC( $b_1$ )). Si el método presenta un ajuste distinto a la línea recta, utilizar la estadística apropiada y justificarla. Ver anexo N° 11, fórmulas generales de cálculo.

Especificación:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC ( $b_1$ ) no debe de incluir el cero.

#### **Precisión del sistema.**

Evaluar el grado de dispersión obtenida al aplicar el método a una preparación de una solución de estándar al 100% sin tratamiento adicional y realizar 6 inyecciones consecutivas.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 9 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**Procedimiento:**

- Preparar una solución del estándar de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, (Ver anexo N°3, método de análisis), 6 inyecciones consecutivas de 10 microlitros, de la misma solución de estándar al 100%. Ver anexo N° 3, método de análisis.

**Cálculos:**

- Evaluar su dispersión calculando el coeficiente de variación de los tiempos de retención y coeficiente de variación de las áreas obtenidas del pico de cloranfenicol base. Ver anexo N° 11, fórmulas de cálculo.

**Especificación:**

CV ≤ 2.0% para respuestas analíticas

CV ≤ 1.0% para tiempos de retención.

**Precisión del método.**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 10 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. Las determinaciones se realizan con 6 soluciones de estándar y 6 soluciones de prueba.

Procedimiento:

- Preparar una serie de 6 soluciones de estándar de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar una serie de 6 soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol, con una concentración final de 100 µg/mL de cloranfenicol equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba al 100%.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie. Ver anexo N° 3, método de análisis.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 11 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Cálculos y análisis:

- Determinar el contenido químico de cloranfenicol de cada una de las 6 muestras, con su respectivo estándar.
- Determinar el coeficiente de variación de las respuestas de los estándares.
- Determinar el coeficiente de variación de la valoración de las 6 muestras.  
Ver anexo N° 11, fórmulas generales de cálculo.

Especificación:

$CV \leq 2.0\%$  para respuestas de los estándares.

$CV \leq 2.0\%$  para las concentraciones de la valoración de las muestras.

#### **Precisión intermedia.**

También conocida como tolerancia o fortaleza, expresa la variación de los resultados dentro de un laboratorio, es decir:

- Días diferentes.
- Diferentes analistas.
- Equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 12 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Esta prueba será realizada por un segundo analista, utilizando como muestra el mismo lote de producto terminado, bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Procedimiento:

- Preparar una serie de 6 soluciones de estándar de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar una serie de 6 soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL de cloranfenicol base equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba al 100%.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución alternando estándar y muestra, comenzando con un estándar, hasta terminar la serie. Ver anexo N° 3, método de análisis.

Cálculos y análisis:

- Determinar el contenido químico de cloranfenicol de cada una de las 6 muestras, con su respectivo estándar.



<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 13 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

- Determinar el coeficiente de variación de las respuestas de los estándares.
- Determinar el coeficiente de variación de la valoración de las 6 muestras.
- Determinar el coeficiente de variación global de los promedios de las respuestas de las muestras, los miligramos obtenidos y concentraciones de las muestras, entre analista 1 y analista 2. Ver anexo N°11, fórmulas de cálculo.

Especificación:

$CV \leq 3.0\%$  para promedios globales de las respuestas de las muestras, los miligramos obtenidos y concentraciones de las muestras, entre analista 1 y analista 2.

#### **Exactitud.**

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real. Representa el grado en que un método analítico se ajusta al valor verdadero para todo propósito práctico.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a placebos al que se le han añadido pequeñas cantidades de principio activo. A partir de los resultados luego se calcula como la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 14 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Procedimiento:

- Preparar una serie de 3 soluciones de estándar de cloranfenicol base con una concentración final de 100 µg/mL equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.
- Preparar por triplicado las siguientes soluciones de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol (9 en total).

Matriz + principio activo al 80%  
Matriz + principio activo al 100%  
Matriz + principio activo al 120%

Ver anexo N°1, preparación de soluciones de prueba para exactitud del método.

- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución, de acuerdo a la siguiente secuencia. Ver anexo N° 3, método de análisis.

Estándar 1  
Muestra al 80%  
Muestra al 100%  
Muestra al 120%  
Hasta terminar las 3 series.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 15 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Cálculos y análisis:

- Determinar para cada serie de muestras, con referencia a su estándar respectivo, el porcentaje de recobro de la cantidad conocida del analíto agregado a la matriz y comparar el valor real obtenido con el valor teórico esperado, tomando en cuenta el nivel de porcentaje utilizado.
- Determinar el coeficiente de correlación de los datos obtenidos en la regresión. Ver anexo N°11, fórmulas de cálculo.

Especificación:

Coeficiente de correlación de la regresión  $\geq 0.98\%$ .

CV  $\leq 2.0\%$  para cada serie de muestras por nivel de concentración.

Porcentaje de recobro del 98.0% al 102.0% para métodos cromatográficos.

#### **Selectividad o especificidad.**

La especificidad es una medida del grado (o ausencia) de interferencia de sustancias debidas a la matriz o placebo y al solvente con respecto al analíto de interés.

Procedimiento:

- Preparar una solución del estándar de cloranfenicol base con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de estándar al 100%.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 16 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

- Preparar una solución de prueba a partir del producto de solución oftálmica de cloranfenicol con una concentración final de 100 µg/mL de cloranfenicol base equivalente al 100% de la concentración teórica. Ver anexo N°1, preparación de solución de prueba al 100%.
- Preparar de manera similar a la solución de prueba al 100%, una solución solamente con matriz o placebo, con una cantidad equivalente a la de la muestra. Ver anexo N°1, preparación de solución de placebo.
- Realizar de acuerdo al método de análisis, una determinación de cada solución. Ver anexo N° 3, método de análisis.

Cálculos y análisis:

Evaluar la probable interferencia debido al placebo y obtener los respectivos cromatogramas de estándar, muestra y placebo.

Especificación:

No debe de existir interferencia significativa por parte de los componentes de la matriz.

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 17 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

### 7. CUADRO N° 7. ESQUEMA DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO FARMACOPEICO.

<b>Parámetro</b>	<b>Determinación</b>		<b>Reporte</b>	
1. Linealidad del sistema	Concentraciones del estándar	N° de determinaciones	Rango lineal. Análisis de regresión que demuestre: -Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ -Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	
	Valoración del fármaco			
	80%			3
	90%			3
	100%			3
	110%			3
	120%	3		
2. Precisión del sistema	6 inyecciones consecutivas de una solución del estándar al 100%.		Coeficiente de variación en cuanto a: -Área: $\leq 2.0\%$ -Tiempo de retención: $\leq 1.0\%$	
3. Precisión del método	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica.		Coeficientes de variación de: -respuestas y factores de respuesta: $\leq 2.0\%$ -Principios activos (concentración de muestra): $\leq 2.0\%$	

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 18 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

4. Exactitud	Cantidades del analíto, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método para valoración para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia). La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada. Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)	-Porcentaje de recobro: del 98.0% al 102.0%  -Coeficiente de variación: $\leq 2.0\%$  -Coeficiente de correlación: $r \geq 0.995$
5. precisión intermedia	Cada uno de dos analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes.	Coeficiente de variación global: -principios activos: $\leq 3.0\%$ -Promedio total de datos: (90.0% - 110.0%)
6. Especificidad	Evaluar la interferencia debida al placebo dentro del tiempo de retención del activo y obtener los respectivos cromatogramas	No debe haber interferencia

## 8. MATERIALES Y REACTIVOS.

Los materiales certificados a ser utilizados para la validación del método analítico farmacopéico para la valoración de contenido de cloranfenicol colirio 0.25%, son los siguientes:

<b>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Noviembre 2016	<b>Página 19 de 19</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

- Balones volumétricos de 100.0 mL
- Balones volumétricos de 50.0 mL
- Balones volumétricos de 25.0 mL
- Pipetas volumétricas de 5.0 mL
- Bureta de 25.0 mL
- beaker de 250 mL
- Probeta de 1000 mL
- Kit de filtración al vacío.
- Viales de 1.5 ml.
- Columna: Merck LiChospher 100 RP-18 endcapped 5µm (125x4.6) mm

## **9. BIBLIOGRAFIA.**

- Guía de validación de métodos analíticos (Editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos de México)
- Procedimiento interno del Laboratorio Farmacéutico Nacional, Validación de métodos analíticos.
- USP 38, Verificación de procedimientos farmacopéicos <1226>
- USP 38, Validación de métodos analíticos <1225>
- Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos. Reglamento técnico centroamericano 11.03.39:06 COMIECO-XL, 2006

## 5.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.

Se evaluaron todos los parámetros de validación, Linealidad del sistema, Precisión del sistema, Precisión del método, Precisión intermedia, Exactitud y Selectividad; Se realizó la evaluación de los parámetros de acuerdo a lo especificado en el protocolo de validación, tanto el procedimiento como los criterios de aceptación. Para la realización de la propuesta de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio 0.25%, se tomó en cuenta el método analítico más reciente que se encontró descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos 38, y se validó de acuerdo al procedimiento interno de validación del Laboratorio Farmacéutico Nacional. A continuación se presentan los resultados para cada parámetro de validación evaluado.

### 5.2.1 Determinación de Linealidad del sistema.

En la evaluación del parámetro linealidad del sistema, se evalúa la proporcionalidad que existe entre la cantidad de analito versus la respuesta instrumental obtenida en un intervalo definido. En el Cuadro N° 8 se presentan las respuestas obtenidas y el coeficiente de variación en cada nivel de concentración.

Cuadro N° 8. Resultados de la evaluación del parámetro Linealidad del sistema.

Nivel de concentración	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3	CV de las respuesta
80%	22.803	22.910	22.837	0.24
90%	25.663	25.683	25.731	0.14
100%	28.489	28.559	28.571	0.16
110%	31.503	31.410	31.519	0.19
120%	34.313	34.210	34.257	0.15



En el Cuadro N° 8 podemos ver que los coeficientes de variación en cada nivel de concentración son menores a 1, lo cual es muy importante de tomar en cuenta ya que nos está indicando que existe repetibilidad en la prueba, que tanto las soluciones fueron bien preparadas, como el equipo está funcionando correctamente. Con las respuestas obtenidas y las concentraciones finales reales se realizó una regresión lineal con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo, obteniéndose la gráfica y la ecuación que siguió el comportamiento de los datos.

Cuadro N° 9. Cuadro resumen de tratamiento de datos de la evaluación del parámetro Linealidad del sistema

Porcentaje	Concentración real (mg/mL)	Área.	Factor de respuesta
80%	0.0802	22.803	0.00351708
80%	0.0802	22.910	0.00350065
80%	0.0802	22.837	0.00351184
90%	0.0902	25.663	0.00351479
90%	0.0902	25.683	0.00351205
90%	0.0902	25.731	0.00350550
100%	0.1002	28.489	0.00351715
100%	0.1002	28.559	0.00350853
100%	0.1002	28.571	0.00350705
110%	0.1102	31.503	0.00349808
110%	0.1102	31.410	0.00350844
110%	0.1102	31.519	0.00349630
120%	0.1202	34.313	0.00350305
120%	0.1202	34.210	0.00351359
120%	0.1202	34.257	0.00350877
		$\bar{X}$	0.00350819
		CV	0.19

En la figura N° 3 se observa el comportamiento de la curva de los datos área versus la concentración de las soluciones en cada uno de los 5 niveles de concentración propuestos. Pero además de la gráfica se necesita la estadística

de la regresión obtenida por el tratamiento de los datos en la herramienta Excel la cual es presentada en el cuadro N° 10.

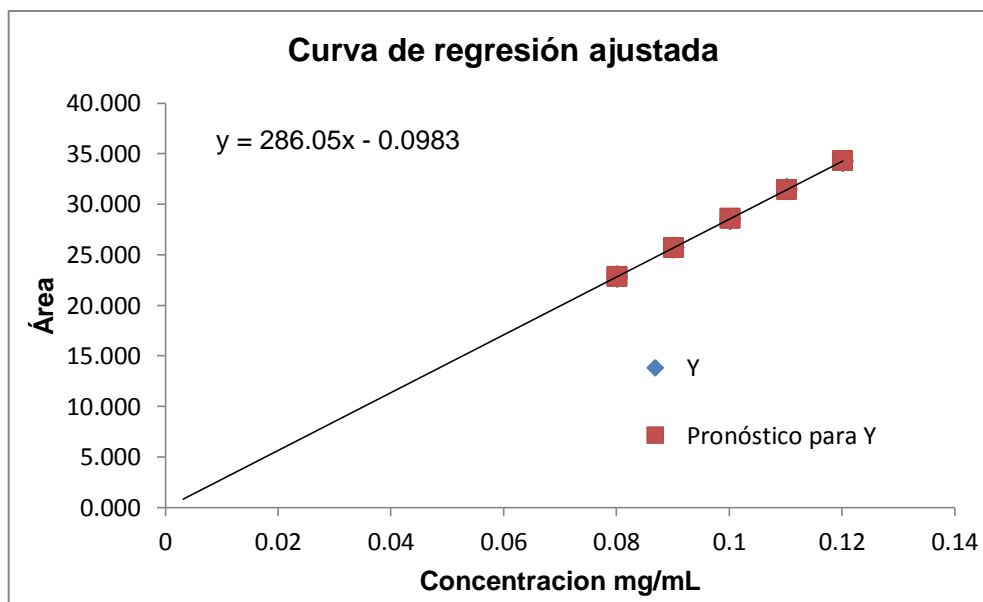


Figura N° 3. Curva de regresión para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro linealidad del sistema.

En la evaluación del parámetro linealidad del sistema, una de las especificaciones requeridas es que el coeficiente de determinación sea mayor o igual a 0.98 de acuerdo a lo especificado previamente en el protocolo de validación. El coeficiente de determinación, en este sentido, nos está indicando que entre más se acerque su valor a 1, mas relación habrá entre el conjunto de datos que componen la curva. El valor obtenido para el coeficiente de determinación de esta curva fue de 0.9998, cumpliendo la especificación.

Otro parámetro muy importante a considerar a partir de la gráfica es la obtención de la ecuación que sigue la curva, la cual en este trabajo fue obtenida en la hoja de cálculo. Mientras la pendiente nos está indicando el grado de inclinación de la curva ó la proporcionalidad entre los valores de las variables “X” y “Y”, el intercepto nos indica en que valor del eje “Y” es intercepta la curva.

Según lo estipulado en el protocolo de validación, el intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir el cero. Matemáticamente, un valor de pendiente igual a cero, está indicando que mientras “X” crece, “Y” se mantendrá constante, por lo cual no existirá proporcionalidad alguna entre las variables. En el cuadro N° 10 se presentan los intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto; Podemos ver que en el intervalo de confianza para la pendiente obtenida no está incluido el cero, cumpliendo esta especificación estipulada en el protocolo de validación.

Cuadro N° 10. Cuadro resumen de la estadística de la regresión del parámetro linealidad del sistema

<b>Estadística de la regresión</b>		
Coeficiente de correlación	0.999924367	
Coeficiente de determinación	0.999848739	
<b>Intervalos de confianza</b>	<b><i>Inferior 95.0%</i></b>	<b><i>Superior 95.0%</i></b>
Intercepto	-0.311670083	0.114983417
Pendiente	283.9418841	288.1581159

También se presenta el intervalo de confianza para el intercepto, que aunque no se requiera especificación de acuerdo al protocolo de validación, sirve de referencia adicional para conocer el comportamiento de la curva, en donde se prefiere que se incluya el cero dentro del intervalo de confianza, indicando con esto que la curva parte del origen cero.

De acuerdo al intervalo de confianza presentado en la tabla N° 10, podemos ver que el cero está incluido, concluyendo de esta manera que se tiene una linealidad del sistema aceptable.

### **5.2.2 Determinación de la Precisión del sistema.**

En la precisión del sistema se realizan 6 inyecciones consecutivas de la preparación de un estándar obteniéndose el área y el tiempo de retención de

cada inyección. En el Cuadro N° 11 se presentan las áreas y tiempos de retención de la evaluación del parámetro de validación precisión del sistema.

Cuadro N° 11. Áreas y tiempos de retención de la precisión del sistema.

N° de inyección	Tiempo de retención (Minutos)	Área
1	3.527	28.453
2	3.530	28.393
3	3.537	28.440
4	3.527	28.501
5	3.518	28.586
6	3.525	28.498
$\bar{X}$	3.527	28.478
CV	0.18	0.23

Se puede observar que el coeficiente de variación de los tiempos de retención es de 0.18%, el cual cumple la especificación del protocolo de validación donde se establece que debe ser menor a 1.0% para los tiempos de retención, mientras para las áreas se estableció un coeficiente de variación de menor o igual al 2.0%, obteniéndose en el presente estudio un coeficiente de 0.23%, cumpliendo también ésta especificación.

Cumplidas ambas especificaciones para el parámetro de validación precisión del sistema, nos indica que el sistema instrumental constituido por los diferentes módulos que componen el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia están trabajando efectivamente como un sistema.

### 5.2.3 Determinación de la Precisión del método

En la precisión del método se está evaluando la capacidad de repetibilidad intraensayo que tiene el método al ser aplicado tanto a muestras como a estándares sin verse alterado, alternando en el equipo preparaciones de 6 estándares y 6 muestras. En la cuadro N° 12 se presentan los datos obtenidos

en la evaluación del parámetro de validación precisión del método junto con su estadística obtenida con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo.

Cuadro N° 12. Datos obtenidos en la precisión del método junto con su estadística.

N°	Áreas de estándares	Áreas de muestras	Concentración de estándares (mg/mL)	FR de estándares	Concentración de muestras	
					mg/mL	%
1	28.531	27.531	0.1002	0.003511969	2.42	96.69
2	28.965	27.050	0.1002	0.003459347	2.34	93.58
3	28.650	27.557	0.1002	0.003497382	2.41	96.38
4	28.584	27.330	0.1002	0.003505458	2.40	95.80
5	28.546	27.619	0.1002	0.003510124	2.42	96.94
6	28.620	27.750	0.1002	0.003501048	2.43	97.15
$\bar{X}$	28.649	27.473	0.1002	0.003497555	2.40	96.09
CV	0.56	0.90	0.0	0.56	1.36	1.37

Primeramente observamos el coeficiente de variación tanto para las áreas de los estándares como para las áreas de las muestras, los cuales son 0.56% y 0.90% respectivamente. La especificación del coeficiente de variación de las respuestas de estándares y muestras establecido en el protocolo de validación es que debe ser menor o igual a 2.0%, cumpliendo esta especificación de acuerdo a los coeficientes de variación obtenidos, de 0.56 para los estándares y de 0.90 para las muestras.

El siguiente requerimiento establecido en el protocolo de validación para la evaluación de este parámetro de validación es que el coeficiente de variación de la concentraciones de las muestras sea menor o igual a 2.0%. De acuerdo al cuadro N° 12 los coeficientes de variación obtenidos en las concentraciones de las muestras fueron de 1.36% para los miligramos obtenidos por mililitro, y de 1.37% para los porcentajes sobre lo rotulado, cumpliendo con esto las especificación requerida para el cumplimiento de este parámetro de validación. En este caso también se calculó el factor de respuesta de cada estándar, el cual aunque no es requerido, sirve de parámetro para evaluar el comportamiento de la relación entre la concentración de cada estándar y la

respuesta de cada uno. El coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenido es bajo, lo cual indica que se tiene una relación concentración versus respuesta muy buena.

#### 5.2.4 Determinación de la Exactitud.

En la exactitud del método se evalúa el porcentaje de la cantidad añadida versus la cantidad recuperada con la adición de placebos enriquecidos con el principio activo. En el cuadro N° 13 se presentan los datos obtenidos en la evaluación de éste parámetro de validación como un cuadro resumen.

Los porcentajes de recobro especificados en el protocolo de validación tomando en cuenta que es un método analítico cromatográfico, es del 98.0% al 102.0% de la cantidad añadida. Podemos ver en el cuadro N° 13 que en todos los niveles de concentración incluyendo los promedios se cumple la especificación previamente establecida en el protocolo de validación. También se especifica que los coeficientes de variación de las respuestas en cada nivel de concentración sea menor o igual a 2.0% por ser un método cromatográfico.

Cuadro N° 13. Cuadro resumen de las respuestas y porcentajes de recobro obtenidos en la exactitud del método.

Muestra (respuestas)	Respuesta Muestra 1	Respuesta Muestra 2	Respuesta Muestra 3	CV de las respuestas.
80%	22.951	22.617	22.522	0.99
100%	28.969	28.298	28.310	1.35
120%	34.058	34.073	34.754	1.16
Muestra (%recuperado)	%Recuperado Muestra 1	%Recuperado Muestra 2	%Recuperado Muestra 3	$\bar{X}$ %Recuperado
80%	99.48	99.28	98.11	98.96
100%	100.40	99.32	98.61	99.44
120%	98.50	99.79	101.01	99.77
<b>Estadística de correlación de datos</b>				
Coeficiente de correlación		0.9982		
Coeficiente de determinación		0.9965		

Adicional también se realizó una regresión utilizando los datos de la exactitud del método específicamente la cantidad añadida como la concentración real final y la respuesta obtenida, evaluando con esto la correlación de los datos obtenidos. En el cuadro N° 14 se presenta un cuadro resumen de los datos utilizados en la regresión.

Cuadro N° 14. Cantidad añadida como concentración final con su respectiva respuesta en cada nivel de concentración.

Porcentaje	Concentración final (Mg/mL)	Área.
80%	0.0801	22.951
80%	0.0801	22.617
80%	0.0801	22.522
100%	0.1002	28.969
100%	0.1002	28.298
100%	0.1002	28.310
120%	0.1201	34.058
120%	0.1201	34.073
120%	0.1201	34.754

En la figura N° 4 se presenta la gráfica obtenida con los datos de la exactitud del método, en la cual se puede evidenciar el comportamiento de la curva.

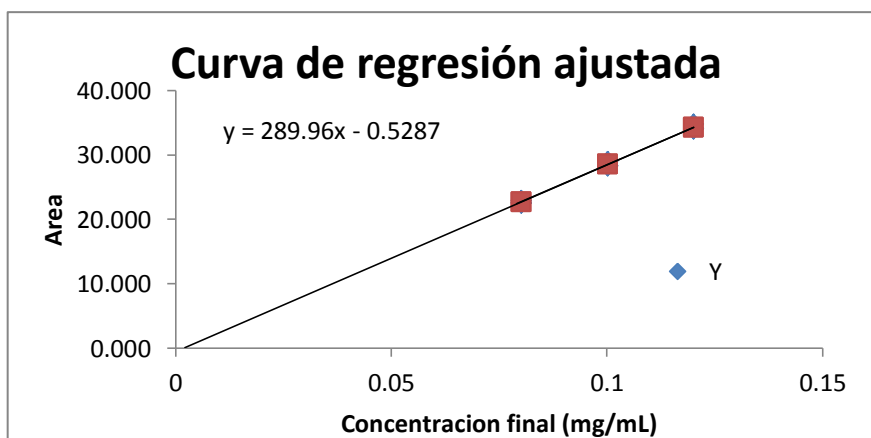


Figura N° 4. Curva de regresión para los datos obtenidos en la evaluación del parámetro Exactitud del método.

La especificación establecida en el protocolo de validación para la regresión de la exactitud del método es que el coeficiente de correlación sea mayor o igual a 0.98. En este caso se obtuvo un coeficiente de correlación para la regresión de 0.99 cumpliendo la especificación requerida para la exactitud del método.

### 5.2.5 Determinación de la Precisión intermedia.

En la precisión intermedia se evalúa la capacidad de repetibilidad interensayo del método, realizado diferente día, en diferente equipo y por un analista diferente. En este caso primeramente hay que tener en cuenta que este parámetro es una segunda precisión del método por lo tanto intrínsecamente deben cumplirse las mismas especificaciones. En el cuadro N° 15 se presentan los datos de igual manera que se hizo con la precisión del método.

Cuadro N° 15. Datos obtenidos en la precisión intermedia junto con su estadística

N°	Áreas de estándares	Áreas de muestras	Concentración de estándares (mg/mL)	FR de estándares	Concentración de muestras	
					mg/mL	%
1	28.530	27.510	0.1002	0.003512093	2.42	96.62
2	28.492	27.022	0.1002	0.003516777	2.38	95.03
3	28.704	27.525	0.1002	0.003490803	2.40	96.08
4	28.536	27.076	0.1002	0.003511354	2.38	95.07
5	28.747	27.484	0.1002	0.003485581	2.39	95.80
6	28.302	27.557	0.1002	0.003540386	2.44	97.56
$\bar{X}$	28.552	27.362	0.1002	0.003509499	2.40	96.03
CV	0.56	0.89	0.0	0.56	1.00	1.01

Podemos ver que en efecto se cumplen todas las especificaciones como una precisión del método, las cuales son que el coeficiente de variación de las respuestas de estándares y muestras sean menor o igual a 2.0% al igual que con las concentraciones de las muestras por ser un método cromatográfico.



En el cuadro N° 16 se presenta un consolidado de los datos de las muestras obtenidos entre el analista 1 y analista 2, en el cual se puede observar una leve diferencia entre los resultados obtenidos entre el analista 1 y el analista 2, evidenciando que el método presenta una muy buena repetibilidad dentro del mismo laboratorio realizado por diferente analista, en diferente día y equipo.

Cuadro N° 16. Cuadro comparativo de datos en la entre analista 1 y analista 2

N°	Analista 1 / Equipo 1 / Día 1			Analista 2 / Equipo 2 / Día 2		
	Áreas de Muestras	Concentración de muestras		Áreas de muestras	Concentración de muestras	
		Mg/mL	%		mg/mL	%
1	27.531	2.42	96.69	27.510	2.42	96.62
2	27.050	2.34	93.58	27.022	2.38	95.03
3	27.557	2.41	96.38	27.525	2.40	96.08
4	27.330	2.40	95.80	27.076	2.38	95.07
5	27.619	2.42	96.94	27.484	2.39	95.80
6	27.750	2.43	97.15	27.557	2.44	97.56
$\bar{X}$	27.473	2.40	96.09	27.362	2.40	96.03
CV	0.90	1.36	1.37	0.89	1.00	1.01

En el Cuadro N° 17 se presenta el resumen de la variación global de las respuestas y concentraciones promedio obtenidas por cada uno de los dos analistas.

Cuadro N° 17. Cuadro resumen de los coeficientes de variación obtenidos entre analista 1 y analista 2

Variación global	Respuesta	mg/mL	%
Analista 1	27.473	2.40	96.09
Analista 2	27.362	2.40	96.03
$\bar{X}$ global	27.418	2.40	96.06
CV global	0.29	0.0	0.04

La especificación establecida en el protocolo de validación para la precisión intermedia es que el coeficiente de variación para las respuestas de las muestras, los miligramos obtenidos y los porcentajes sobre lo rotulado entre analista 1 y analista 2 sea menor o igual a 3.0. En el presente estudio de precisión intermedia se obtuvo un coeficiente de variación de 0.29 para las respuestas, de 0.00 para los miligramos obtenidos por mililitro y de 0.04 para

los porcentajes sobre lo rotulado, con lo cual se cumple la especificación establecida para este parámetro.

### 5.2.6 Determinación de Selectividad o especificidad.

En el parámetro de validación especificidad se evaluó el grado de interferencia al analizar el principio activo en presencia de los componentes de la matriz. Esta evaluación se realiza sobreponiendo los cromatogramas en busca de interferencias. En la Figura N° 3 se presentan los cromatogramas sobrepuestos de las soluciones de muestra, matriz y estándar de que se prepararon para la evaluación de la selectividad del método; La especificación establecida en el protocolo de validación para esta prueba es que no debe existir interferencia significativa por parte de los componentes de la matriz. En el Cuadro N° 18 se presentan las respuestas obtenidas de placebo, principio activo y producto.

Cuadro N° 18. Respuestas obtenidas en la evaluación del parámetro de validación Selectividad

Tipo de muestra	Respuesta
Matriz (Placebo)	0.074
Estándar (Principio Activo)	29.606
Producto (Cloranfenicol colirio 0.25%)	27.762

Se puede observar en la figura N° 5 que la matriz (placebo) no presenta ninguna interferencia en el análisis del principio activo cloranfenicol, el cual posee un tiempo de retención de 3.5 minutos. Cumpliendo con la especificación para la evaluación de la selectividad del método. Sin embargo se encontró que la matriz presenta un pico cercano al del pico del principio activo de cloranfenicol, con un tiempo de retención aproximado de 4.2 minutos, el cual

aunque actualmente no interfirió en la validación, podría interferir por ejemplo si no se tiene cuidado en la preparación exacta de las proporciones de la fase móvil o si se cambia el tipo de columna especificada en el método analítico validado por otra diferente.

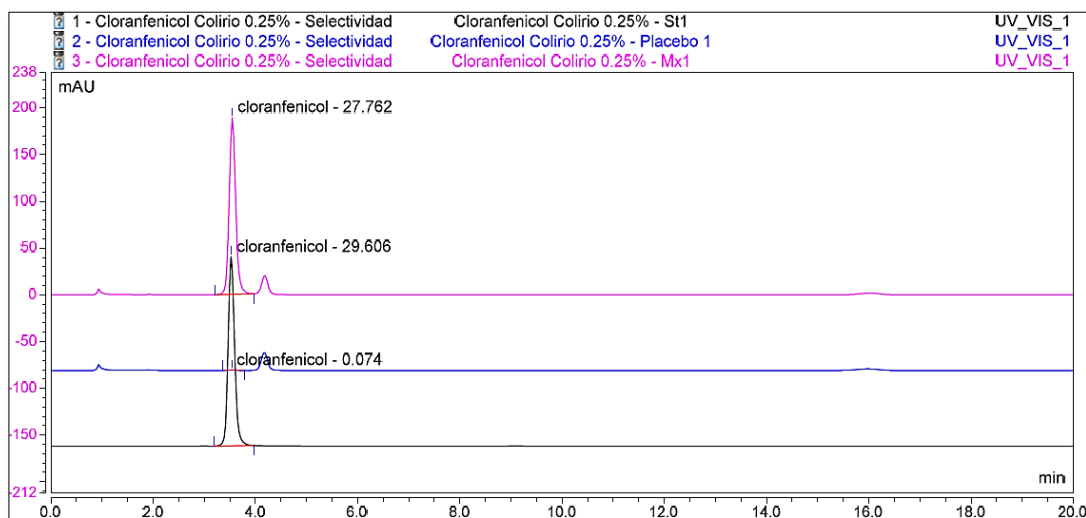


Figura N° 5. Cromatogramas sobrepuestos de muestra, placebo y estándar respectivamente en forma descendente.

También se encontró un pico perteneciente a la matriz con un tiempo de retención aproximado de 15.9 minutos el cual también, aunque no interfirió con la validación realizada, podría hacerlo si se cambia el tiempo de corrida del análisis y podría traslaparse en los cromatogramas dando lugar a interferencias. En el Cuadro N° 19 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio 0.25%

Cuadro N° 19. Cuadro resumen de resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de validación

Parámetro	Especificación	Resultados	cumple	
			si	no
Linealidad del sistema	- Rango lineal. Análisis de regresión que demuestre: - Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ - Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	- Rango lineal: (0.0802 – 0.1202) mg/mL - Coeficiente de determinación: $r = 0.9999$ - Coeficiente de correlación: $r = 0.9998$	√	
Precisión del sistema	Coefficiente de variación en cuanto a: - Factor de respuesta : < 2.0 % - Área: $\leq 2.0\%$ - Tiempo de retención: $\leq 1.0\%$	- Áreas: $cv = 0.23\%$ - tiempo de retención: $cv = 0.18\%$	√	
Precisión del método	Coefficiente de variación de: - Respuestas y factores de respuesta: $\leq 2.0\%$ - Concentración del activo: $\leq 2.0\%$	- Factor de respuesta: $cv = 0.56\%$ - Área de estándares: $cv = 0.56\%$ - Área de muestras: $cv = 0.90\%$ - principio activo: $cv = 1.37\%$	√	
Exactitud del método	- Porcentaje de recobro: 98.0% - 102.0% - coeficiente de variación: $\leq 2.0\%$ - Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ - Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	Porcentajes de recobros: - 80 %: 99.68%, $cv = 0.33\%$ - 100 %: 100.61%, $cv = 0.23\%$ - 120 %: 100.74%, $cv = 0.36\%$  - Coeficiente de determinación: $r = 0.9998$ - Coeficiente de correlación: $r = 0.9997$	√	
Precisión intermedia	Coefficiente de variación global: - principios activos: $\leq 3.0\%$ Promedio total de datos: 90% – 110%	Principio activo: $cv\ global = 0.04\%$  Promedio global de datos: 2.40 mg/mL ; 96.06 %	√	
Especificidad	No debe existir interferencia significativa entre el principio activo y el placebo.	No se encontró interferencia significativa	√	

### **5.3 ELABORACION DE REPORTE Y CERTIFICADO DE VALIDACION**

Se redactó el reporte de validación en el cual se incluyó una introducción, los resultados de la evaluación de riesgos, los equipos que se utilizaron, un esquema resumen del proceso que se llevó a cabo derivado del protocolo de validación, un cuadro de resultados conteniendo por cada parámetro de validación realizado, la especificación junto con el resultado obtenido y el dictamen. A continuación se presenta el reporte, certificado y técnica validada.

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 1 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**Elaborado por:**

<b>Firma:</b>	
<b>Nombre:</b>	Oscar López
<b>Cargo:</b>	Químico Analista
<b>Fecha:</b>	Febrero 2017

**Autorizado por:**

<b>Firma:</b>	
<b>Nombre:</b>	Lic. Eliseo Ayala
<b>Cargo:</b>	Asesor
<b>Fecha:</b>	Febrero 2017

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 2 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**INDICE:**

1. Introducción.
2. Resultado de la evaluación de riesgos.
3. Equipos utilizados.
4. Esquema de validación del método analítico farmacopéico.
5. Resultados de la validación del método analítico farmacopéico.
6. Conclusiones y dictamen.
7. Bibliografía.
8. Complemento

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 3 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

## **1. INTRODUCCION.**

De acuerdo a lo descrito en el apartado <1226> de la USP 38, los métodos analíticos oficiales o farmacopéicos no requieren ser validados completamente, por ello, debe de realizar una verificación documentada, para dejar una constancia que el método analítico funciona correctamente en el laboratorio donde se utilizara. El proceso de verificación de métodos analíticos farmacopéicos es la evaluación que sirve para determinar si el método puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales; lo que permite una obtención exhaustiva de pruebas demostrativas que están debidamente documentadas, en donde, un método analítico farmacopéico debe ser lo suficientemente fiable como para poder reproducir el resultado previsto en las condiciones de uso reales. Por lo que se procedió a la validación del método analítico farmacopéico cromatográfico para la valoración de cloranfenicol colirio 0.25%.

## **2. RESULTADOS DE LA EVALUACION DE RIESGOS.**

En la validación del Método Cromatográfico para la valoración de Cloranfenicol Colirio 0.25%, se tomaron en cuenta ciertos factores como las condiciones de temperatura en el área de análisis y tiempo de preparación



<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 4 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

de la muestra, dichos factores no interfirieron en los resultados finales de la validación.

### **3. EQUIPOS UTILIZADOS.**

Los equipos a utilizar para la verificación del método analítico farmacopéico para la valoración de cloranfenicol colirio 0.25%, son los siguientes:

**-Balanza analítica.**

Marca: Sartorius

Modelo: Quintix 224-1S

Fecha de última calibración: 08/01/16

**-Balanza analítica.**

Marca: Mettler Toledo

Modelo: AG204-S

Fecha de última calibración: 07/03/16

**-Cromatógrafo líquido de alto desempeño (HPLC).**

Marca: Thermo Scientific

Modelo: Dionex ultimate 3000

Fecha de última calibración: 07/01/16

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 5 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**-Cromatógrafo liquido de alto desempeño (HPCL).**

Marca: Shimadzu

Modelo: Prominence 20A

Fecha de última calibración: 18/01/16

**4. CUADRO N° 7. ESQUEMA DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO FARMACOPEICO.**

<b>Parámetro</b>	<b>Determinación</b>		<b>Reporte</b>	
1. Linealidad del sistema	Concentraciones del estándar	N° de determinaciones	Rango lineal. Análisis de regresión que demuestre: -Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ -Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	
	Valoración del fármaco			
	80%			3
	90%			3
	100%			3
	110%			3
	120%	3		
2. Precisión del sistema	6 inyecciones consecutivas de una solución del estándar al 100%.		Coeficiente de variación en cuanto a: -Área: $\leq 2.0\%$ -Tiempo de retención: $\leq 1.0\%$	

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 6 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

3. Precisión del método	6 determinaciones: Cada una consiste de un estándar y una muestra preparada al 100% de la concentración teórica.	Coeficientes de variación de: -respuestas y factores de respuesta: $\leq 2.0\%$ -Principios activos (concentración de muestra): $\leq 2.0\%$
4. Exactitud	Cantidades del analito, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método para valoración para obtener niveles del 80%, 100% y 120% de la concentración teórica de la sustancia). La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada. Número de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)	-Porcentaje de recobro: del 98.0% al 102.0%  -Coeficiente de variación: $\leq 2.0\%$  -Coeficiente de correlación: $r \geq 0.995$
5. Precisión intermedia	Cada uno de dos analistas efectúa la precisión del método, utilizando como muestra el mismo lote del producto terminado, en dos días diferentes y en equipos diferentes.	Coeficiente de variación global: -principios activos: $\leq 3.0\%$ -Promedio total de datos: (90.0% - 110.0%)
6. Especificidad	Evaluar la interferencia debida al placebo dentro del tiempo de retención del activo y obtener los respectivos cromatogramas.	No debe haber interferencia

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 7 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

**5. CUADRO N° 20. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO  
ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
CLORANFENICOL COLIRIO 0.25%.**

Parámetro	Especificación	Resultados	cumple	
			si	no
Linealidad del sistema	- Rango lineal. Análisis de regresión que demuestre: - Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ - Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	- Rango lineal: (0.0802 – 0.1202) mg/mL - Coeficiente de determinación: $r = 0.9999$ - Coeficiente de correlación: $r = 0.9998$	√	
Precisión del sistema	Coeficiente de variación en cuanto a: - Área: $\leq 2.0\%$ - Tiempo de retención: $\leq 1.0\%$	- Áreas: $cv = 0.23\%$ - tiempo de retención: $cv = 0.18\%$	√	
Precisión del método	Coeficiente de variación de: - Respuestas y factores de respuesta: $\leq 2.0\%$ - Concentración del activo: $\leq 2.0\%$	- Factor de respuesta: $cv = 0.56\%$ - Área de estándares: $cv = 0.56\%$ - Área de muestras: $cv = 0.90\%$ - principio activo: $cv = 1.37\%$	√	

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 8 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Exactitud del método	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de recobro: 98.0% - 102.0%</li> <li>- coeficiente de variación: ≤ 2.0%</li> <li>- Coeficiente de determinación: <math>r \geq 0.98 &lt; 1</math></li> <li>- Coeficiente de correlación: <math>r \geq 0.98 &lt; 1</math></li> </ul>	Porcentajes de recobros: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 80 %: 99.68%, cv = 0.33 %</li> <li>- 100 %: 100.61%, cv = 0.23 %</li> <li>- 120 %: 100.74%, cv = 0.36 %</li> </ul> - Coeficiente de determinación: $r = 0.9998$ - Coeficiente de correlación: $r = 0.9997$	√	
Precisión intermedia	Coeficiente de variación global: <ul style="list-style-type: none"> <li>- principios activos: ≤ 3.0%</li> </ul> Promedio total de datos: 90% – 110%	Principio activo: cv global = 0.04 %  Promedio global de datos: 2.40 mg/mL ; 96.06 %	√	
Especificidad	No debe existir interferencia significativa entre el principio activo y el placebo.	No se encontró interferencia significativa	√	

## 6. CONCLUSIONES Y DICTAMEN

Cumplidas las especificaciones de las pruebas de Linealidad del sistema, Precisión del Sistema, Precisión del Método, Precisión Intermedia, Exactitud del método y especificidad del método, queda establecido que el método analítico Cromatográfico para la Valoración de Cloranfenicol colirio 0.25%, funciona correctamente, en las condiciones reales de uso, cuando se aplica a

<b>REPORTE DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 9 de 9</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

muestras que contienen el analíto a concentraciones iguales a las establecidas, por lo que, se concluye que éste método, queda VALIDADO y es apto para ser utilizado en las condiciones reales de uso

## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Guía de validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación
- Guía de Validación de Métodos Analíticos (editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, equivalente a:  
Guideline for industry: Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A.
- Procedimiento interno de Validación de Métodos Analíticos, Laboratorio Farmacéutico Nacional.
- USP 38, Verificación de Procedimientos Farmacopéicos <1226>
- USP 38, Validación de Métodos Analíticos <1225>

## **8. COMPLEMENTO**

- Certificado de Validación del Método Analítico Cromatográfico para la valoración de Cloranfenicol colirio 0.25%.
- Técnica de Análisis validada para la valoración de Cloranfenicol colirio 0.25%.

<b>CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 1 de 3</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

### 1. Resumen

La presente Validación del Método Analítico Farmacopéico realizada, se evaluaron los parámetros: Linealidad del sistema, Precisión de sistema, Precisión del método, Precisión Intermedia, Exactitud del método y Especificidad del método la cual se llevó a cabo con la finalidad de obtener pruebas documentadas que demuestren que el método cromatográfico de análisis utilizado para la Valoración de Cloranfenicol colirio 0.25%, produce resultados confiables.

### 2. Responsables

Lic. Eliseo Ayala.

Oscar López

### 3. Cuadro N° 20. Resultados de la validación del método analítico.

Parámetro	Especificación	Resultados	cumple	
			si	no
Linealidad del sistema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango lineal.</li> <li>Análisis de regresión que demuestre:</li> <li>- Coeficiente de determinación: <math>r \geq 0.98 &lt; 1</math></li> <li>- Coeficiente de correlación: <math>r \geq 0.98 &lt; 1</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango lineal: (0.0802 – 0.1202) mg/mL</li> <li>- Coeficiente de determinación: <math>r = 0.9999</math></li> <li>- Coeficiente de correlación: <math>r = 0.9998</math></li> </ul>	√	

<b>CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 2 de 3</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Precisión del sistema	Coeficiente de variación en cuanto a: - Área: $\leq 2.0\%$ - Tiempo de retención: $\leq 1.0\%$	- Áreas: cv = 0.23% - tiempo de retención: cv = 0.18%	√	
Precisión del método	Coeficiente de variación de: - Respuestas y factores de respuesta: $\leq 2.0\%$ - Concentración del activo: $\leq 2.0\%$	- Factor de respuesta: cv = 0.56% - Área de estándares: cv = 0.56% - Área de muestras: cv = 0.90% - principio activo: cv = 1.37%	√	
Exactitud del método	- Porcentaje de recobro: 98.0% - 102.0% - coeficiente de variación: $\leq 2.0\%$ - Coeficiente de determinación: $r \geq 0.98 < 1$ - Coeficiente de correlación: $r \geq 0.98 < 1$	Porcentajes de recobros: - 80 %: 99.68%, cv = 0.33 % - 100 %: 100.61%, cv = 0.23 % - 120 %: 100.74%, cv = 0.36 % - Coeficiente de determinación: $r = 0.9998$ - Coeficiente de correlación: $r = 0.9997$	√	
Precisión intermedia	Coeficiente de variación global: - principios activos: $\leq 3.0\%$ Promedio total de datos: 90% – 110%	Principio activo: cv global = 0.04 % Promedio global de datos: 2.40 mg/mL ; 96.06 %	√	



<b>CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.</b>		
<b>Edición: 01</b>	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 3 de 3</b>
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	
<b>Código de protocolo:</b>	PT0001-01	

Especificidad	No debe existir interferencia significativa entre el principio activo y el placebo.	No se encontró interferencia significativa	√	
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------	---	--

#### 4. Conclusión.

Cumplidas las especificaciones de las pruebas de Linealidad del sistema, Precisión del Sistema, Precisión del Método, Precisión Intermedia, Exactitud del método y especificidad del método, queda establecido que el método analítico Cromatográfico para la Valoración de Cloranfenicol colirio 0.25%, funciona correctamente, en las condiciones reales de uso, cuando se aplica a muestras que contienen el analíto a concentraciones iguales a las establecidas, por lo que, se concluye que éste método, queda VALIDADO y es apto para ser utilizado en las condiciones reales de uso.

Elaborado por:	Revisado por:
F.	F.
Oscar López.	Lic. Eliseo Ayala.

<b>Método de análisis validado</b>		
<b>Código:</b> MAV-001	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 1 de 5</b>
<b>Edición:</b> 01		
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	

**1. Alcance:**

El presente método de análisis aplica para el producto registrado con el siguiente nombre:

- Cloranfenicol Colirio 0.25%

**2. Referencia bibliográfica:**

USP 38

**3. Principio activo:**

Cada 1 mL contiene:

Cloranfenicol.....2.5 mg

**4. Descripción:**

Líquido transparente incoloro ligeramente amarillo, inodoro, libre de partículas extrañas.

**5. Contenido Químico Cloranfenicol Colirio 0.25%**

5.1 Método: Cromatografía Líquida de alta eficiencia.

**5.2 Sistema cromatográfico:**

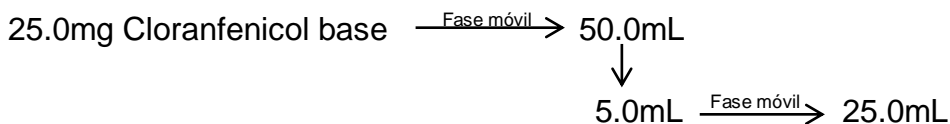
Columna:	C18 (L1), 5µm, (125x4.6)mm
Longitud de onda:	280nm
Velocidad de flujo:	1.0 mL/min.
Volumen de inyección:	10 microlitros
Tiempo de corrida:	20 minutos
Temperatura del horno:	30°C

**5.3 Preparación de fase móvil:** Mezclar agua grado HPLC, Metanol HPLC, Y ácido acético glacial en proporción de (55:45:0.1) v/v respectivamente y homogenizar. Filtrar al vacío por membrana de nylon de poro 0.45 µm.

<b>Método de análisis validado</b>		
<b>Código:</b> MAV-001	<b>Vigente a partir de:</b>	<b>Página 2 de 5</b>
<b>Edición:</b> 01	Febrero 2017	
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	

#### 5.4 Preparación de solución estándar:

- Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 25.0mg de cloranfenicol base y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 50mL.
- Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
- Tomar una alícuota de 5mL y transferirla a un balón de 25mL y aforar con fase móvil.
- Filtrar la solución mediante un filtro jeringa con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y transferir a un vial de 1.5mL de capacidad.
- Preparar por duplicado.



Concentración final = 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol base
-------------------------------------------------------------------------

#### 5.5 Preparación de solución muestra:

- Tomar una alícuota de 20.0mL de solución oftálmica de cloranfenicol 0.25%, con pipeta volumétrica, equivalentes a 50.0 miligramos de cloranfenicol base y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 100mL.
- Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
- Tomar una alícuota de 5mL y transferirla a un balón de 25mL, aforar con fase móvil y homogenizar.
- Filtrar la solución mediante un filtro jeringa con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y transferir a un vial de 1.5mL de capacidad, descartando los primeros 5mL.



<b>Método de análisis validado</b>		
<b>Código:</b> MAV-001	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 4 de 5</b>
<b>Edición:</b> 01		
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	

**5.7 Especificación:**

Contiene no menos del 90.0% y no más del 110.0% de la cantidad declarada de cloranfenicol base

**5.8 Cálculos y formulas:**

Ajuste de pureza del estándar al 100%:

$$\begin{array}{rcl} \text{Peso teórico del estándar} & \longrightarrow & \% \text{Pureza} \\ X & \longrightarrow & 100\% \end{array}$$

X = Cantidad a pesar de estándar

**Factor de correlación:**

$$F_c = (A_2 \times W_1) / (A_1 \times W_2) \times 100$$

Donde:

A<sub>1</sub>: Área del pico del activo en el cromatograma de la solución estándar 1

A<sub>2</sub>: Área del pico del activo en el cromatograma de la solución estándar 2

W<sub>1</sub>: Peso del activo usado en la preparación de la solución estándar 1

W<sub>2</sub>: Peso del activo usado en la preparación de la solución estándar 2

**Concentración final del estándar y Factor de respuesta:**

$$C_{st} = (P_{st} \times \text{pureza} / 100) / FD \quad ; \quad FR = C_{st} / A_{st}$$

<b>Método de análisis validado</b>		
<b>Código:</b> MAV-001	<b>Vigente a partir de:</b> Febrero 2017	<b>Página 5 de 5</b>
<b>Edición:</b> 01		
<b>Nombre del producto:</b>	Cloranfenicol colirio 0.25%	

Donde:

$C_{st}$  : Concentración del estándar.

$P_{st}$  : Peso real del estándar.

$A_{st}$  : Área del estándar.

FD : Factor de dilución

FR : Factor de respuesta.

#### Concentración de la muestra:

$$C_{mx} = A_{mx} \times FR \times FD_{mx} \quad ; \quad \%SR = C_{mx} / 50 \times 100$$

Donde:

$C_{mx}$  : Concentración de la muestra en mg / 20 mL

$A_{mx}$  : Área de la muestra.

FR : Factor de respuesta.

$FD_{mx}$  : Factor de dilución de la muestra.

%SR : Porcentaje sobre lo rotulado.

Elaborado por:	Revisado por:
F.	F.
Oscar López.	Lic. Eliseo Ayala.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## VI. Conclusiones.

1. En la evaluación del parámetro de Linealidad del sistema se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.99 el cual se encuentra dentro del intervalo especificado en el protocolo de validación de ser mayor o igual a 0.98 y menor a 1.0, y el intervalo de confianza obtenido para la pendiente no incluyó el cero. El método es lineal en el intervalo de concentración de 0.0802 a 0.1202 mg/mL.
2. El equipo HPLC utilizado en la validación funciona correctamente ya que en la evaluación de la precisión del sistema se obtuvo un coeficiente variación de áreas de 0.23% y de 0.18% para los tiempos de retención los cuales cumplen la especificación de ser menor o igual a 2.0% para áreas y menor o igual a 1.0% para tiempos de retención.
3. El método analítico para la cuantificación de cloranfenicol demostró ser exacto obteniéndose todos los porcentajes de recobro dentro de la especificación del 98.0% al 102.0%.
4. La matriz utilizada en la formulación de cloranfenicol colirio 0.25% no interfiere en la cuantificación de su principio activo permitiendo que el método analítico empleado sea selectivo.
5. El método analítico cromatográfico para la cuantificación de cloranfenicol se validó correctamente bajo las condiciones, equipos, reactivos y analistas cumpliendo todas las especificaciones requeridas en el protocolo de validación y es apto para ser usado dentro del Laboratorio de Control de Calidad del Laboratorio Farmacéutico Nacional



**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## VI. Recomendaciones

Al Laboratorio Farmacéutico Nacional se recomienda:

1. Que se utilice el método de análisis validado propuesto siguiendo todas las indicaciones a cabalidad para la obtención de resultados confiables.
2. Que se incluya en el procedimiento interno de validación, la realización del parámetro Linealidad del sistema para métodos analíticos normalizados incluyendo los proporcionados por la Farmacopea de los Estados Unidos
3. Realizar una calificación técnica a los analistas encargados de la validación de los métodos analíticos, la cual quede amparada en un documento formal y anexado dentro de las validaciones realizadas.
4. Que el jefe del departamento de validación realice una revisión de las especificaciones de cada parámetro de validación establecidas en el procedimiento interno del Laboratorio Farmacéutico Nacional y actualizarlas, ó adecuarlas a las condiciones de uso reales de nuestro país según sea el caso.
5. Que se gestione un plan de calificación propio de los equipos utilizados tanto para la validación de métodos analíticos, como los utilizados para los análisis de rutina del Laboratorio de Control de Calidad.

## Bibliografía

1. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos. México A.C.
2. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de la Salud (2011). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (10 ed.). Tomo II pág. 1406-1407
3. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Farmacopea de los Estados Unidos. (2015). Trigésima octava revisión y Formulario Nacional trigésima tercera edición. Estados Unidos de América.
4. Genaro, A. (2003). Remington farmacia (20 ed.). Tomo II Buenos Aires: Medica Panamericana.
5. Lorenzo, P.; Moreno, A.; Lizasoain I.; Leza, J.; Moro, M. y Portoles, A. (2008). Velásquez Farmacología básica y clínica (18 ed.). Buenos aires: Medica panamericana.
6. Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA) (2010). Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos versión 1. El salvador
7. Procedimiento interno de validación de métodos analíticos del Laboratorio Farmacéutico Nacional.

**ANEXO N° 1**  
**PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS <sup>(1)</sup>**

## **PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL:**

### **Agua : Metanol : Ácido acético glacial en proporción: (550:450:1)**

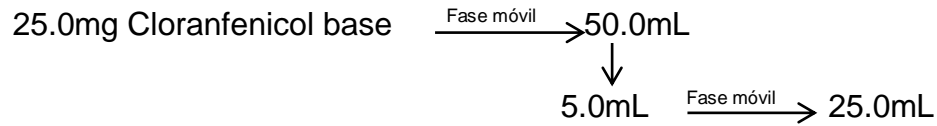
1. Rotular adecuadamente un balón volumétrico de 1000mL como "Fase móvil para validación de cloranfenicol colirio", y llevarlo a la cámara de extracción de gases.
2. Medir con probeta exactamente 550mL de agua grado HPLC y agregarlos al balón volumétrico previamente rotulado con la ayuda de un embudo.
3. Medir con probeta exactamente 450mL de metanol grado HPLC y agregarlos con cuidado al balón volumétrico con la ayuda del embudo.
4. Medir con una pipeta, 1mL de ácido acético glacial y agregarlo con cuidado al balón volumétrico, tapar y agitar suavemente.
5. Filtrar la solución al vacío con la ayuda de un equipo de filtración con un filtro de tamaño de poro de 0.45µm, posteriormente trasladar a un reservorio de vidrio para HPLC. No es necesario desgasificar la fase móvil, ya que el equipo a utilizar posee módulo desgasificador incluido.

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE PRUEBA.**

\* Para la preparación de todas las soluciones se utilizara un estándar con una pureza de 99.40%.

### **Preparación de solución de estándar al 100%:**

1. Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 25.0mg de cloranfenicol base y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 50.0mL.
2. Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
3. Tomar una alícuota de 5.0mL y transferirla a un balón de 25.0mL y aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración final de 100µg/mL.



Concentración final = 100µg/mL de cloranfenicol base

### Cálculos:

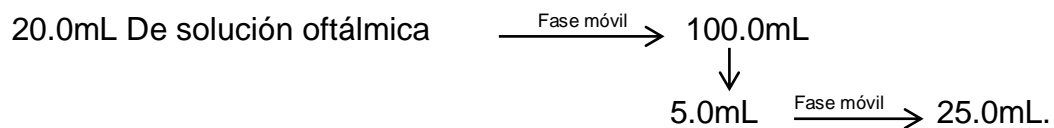
Ajuste al 100% de pureza.

$$\begin{array}{l}
 99.40\text{g} \longrightarrow 100.0\text{g} \\
 0.0250\text{g} \longrightarrow X \text{ g}
 \end{array}$$

$$X = 0.0252 \text{ g a pesar de estándar. (25.2mg)}$$

### Preparación de solución de prueba al 100%.

1. Tomar una alícuota de 20.0mL de solución oftálmica de cloranfenicol, con pipeta volumétrica, equivalentes a 50.0 miligramos de cloranfenicol base y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 100.0mL.
2. Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
3. Tomar una alícuota de 5.0mL y transferirla a un balón de 25.0mL y aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración final de 100µg/mL.



Concentración final = 100µg/mL de cloranfenicol base

### Cálculos:

Calculo de alícuota equivalente a 50.0 mg de cloranfenicol base a partir de la solución oftálmica de cloranfenicol al 0.25% (p/v).

250.0 mg cloranfenicol base  $\longrightarrow$  100.0 mL  
 50.0 mg cloranfenicol base.  $\longrightarrow$  X mL

X = 20.0 mL de solución oftálmica (50.0 mg de cloranfenicol base)

**Soluciones de prueba para exactitud al 80%.**

1. Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 40.0mg de cloranfenicol base equivalentes al 80% de la concentración teórica y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 100mL.
2. Tomar una alícuota de 20.0mL de placebo de solución oftálmica de cloranfenicol, con pipeta volumétrica, equivalentes a la matriz y agregarlos con cuidado al mismo balón volumétrico de 100.0mL que contiene los 40.0mg de cloranfenicol base.
3. Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
4. Tomar una alícuota de 5.0mL y transferirla a un balón de 25.0mL y aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración final de 80µg/mL equivalentes al 80% de la concentración teórica.

40.0 mg de cloranfenicol base + 20.0 mL de matriz  $\xrightarrow{\text{Fase móvil}}$  100.0mL  
 $\downarrow$   
 5.0mL  $\xrightarrow{\text{Fase móvil}}$  25.0mL.  
 Concentración final = 80µg/mL de cloranfenicol base

**Cálculos:**

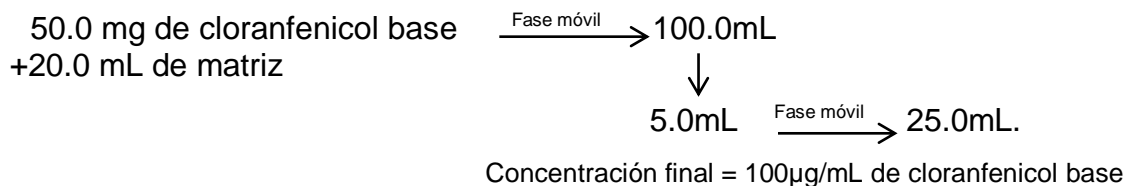
Ajuste al 100% de pureza.

99.40g  $\longrightarrow$  100.0g  
 0.0400g  $\longrightarrow$  X g

X = 0.0403 g a pesar de estándar. (40.3mg)

### Soluciones de prueba para exactitud al 100%.

1. Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 50.0mg de cloranfenicol base equivalentes al 100% de la concentración teórica y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 100.0mL.
2. Tomar una alícuota de 20.0mL de placebo de solución oftálmica de cloranfenicol, con pipeta volumétrica, equivalentes a la matriz y agregarlos con cuidado al mismo balón volumétrico de 100.0mL que contiene los 50.0mg de cloranfenicol base.
3. Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
4. Tomar una alícuota de 5.0mL y transferirla a un balón de 25.0mL y aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración final de 100µg/mL equivalentes al 100% de la concentración teórica.



### Cálculos:

Ajuste al 100% de pureza.

$$99.40g \longrightarrow 100.0g$$

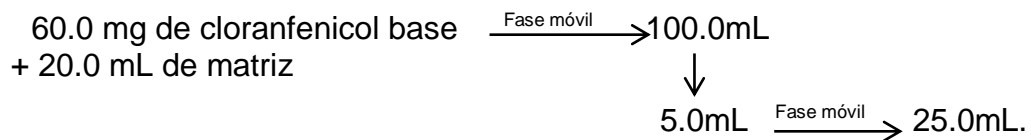
$$0.0500g \longrightarrow X g$$

$$X = 0.0504 g \text{ a pesar de estándar. (50.4mg)}$$



### Soluciones de prueba para exactitud al 120%.

1. Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 60.0mg de cloranfenicol base equivalentes al 120% de la concentración teórica y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 100.0mL.
2. Tomar una alícuota de 20.0mL de placebo de solución oftálmica de cloranfenicol, con pipeta volumétrica, equivalentes a la matriz y agregarlos con cuidado al mismo balón volumétrico de 100.0mL que contiene los 60.0mg de cloranfenicol base.
3. Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil.
4. Tomar una alícuota de 5.0mL y transferirla a un balón de 25.0mL y aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración final de 120µg/mL equivalentes al 120% de la concentración teórica.



Concentración final = 120µg/mL de cloranfenicol base

### Cálculos:

Ajuste al 100% de pureza.

$$\begin{array}{ccc} 99.40\text{g} & \longrightarrow & 100.0\text{g} \\ 0.0600\text{g} & \longrightarrow & X \text{ g} \end{array}$$

$$X = 0.0604 \text{ g a pesar de estándar. (60.4mg)}$$

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

### **Preparación de solución madre para linealidad.**

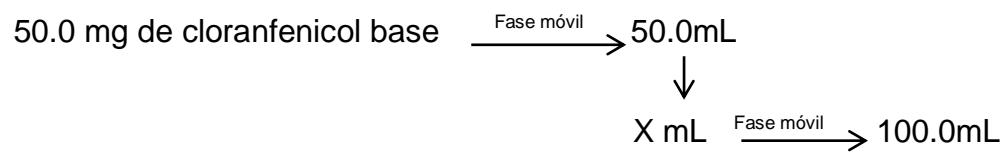
- Pesar con exactitud y ajustado al 100% de su pureza, 50.0mg de cloranfenicol base y agregarlos con cuidado a un balón volumétrico de 50.0mL.
- Agregar 30mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 15 minutos a 450 rpm.
- Posteriormente aforar con fase móvil. Esta solución contendrá una concentración de 1000µg/ml. Preparar por triplicado.

### **Preparación de soluciones para linealidad.**

- Ambientar una bureta de 25.0mL y posteriormente llenarla con la solución madre preparada anteriormente.
- Agregar a cada balón volumétrico de 100.0mL, una alícuota correspondiente a cada nivel de concentración de acuerdo a la siguiente tabla:

Nivel de concentración	Alícuota "x" a añadir de solución madre	Concentración final (Vol. final 100mL)
80%	8.0mL	80 µg/mL
90%	9.0mL	90 µg/mL
100%	10.0mL	100 µg/mL
110%	11.0mL	110 µg/mL
120%	12.0mL	120 µg/mL

- Agregar 50mL de fase móvil y someter a agitación mecánica durante 10 minutos a 450 rpm, posteriormente aforar con fase móvil. Preparar cada solución por triplicado



**Cálculos:**

Ajuste al 100% de pureza.

$$\begin{array}{l} 99.40\text{g} \longrightarrow 100.0\text{g} \\ 0.0500\text{g} \longrightarrow X \text{ g} \end{array}$$

$$X = 0.0504 \text{ g a pesar de estándar. (50.4mg)}$$

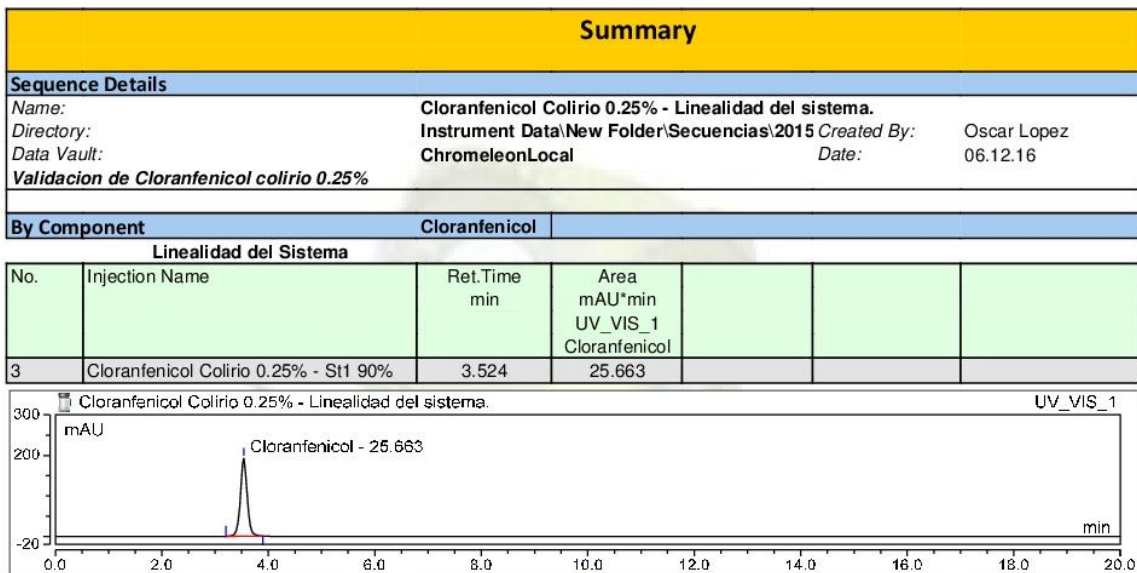
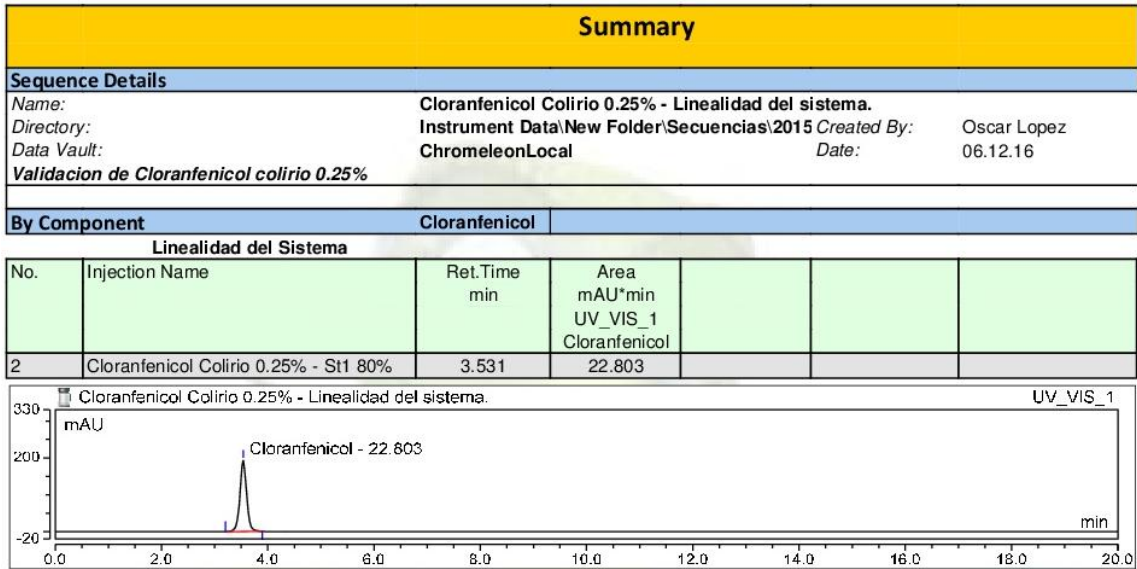
**ANEXO N° 2**  
**PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN HPLC**  
**THERMO SCIENTIFIC DIONEX ULTIMATE 3000 <sup>(3)</sup>**

## **Procedimiento de operación HPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000:**

1. Encender la fuente de poder del equipo presionando la tecla ON/OFF, ubicado en la parte posterior del equipo.
2. Encender cada módulo del equipo a utilizar, presionando el botón ON/OFF, ubicado en la parte posterior de cada unidad.
3. Observar y esperar que el equipo realice un chequeo automáticamente.
4. Encender la computadora y abrir el software Chromeleon 7.
5. En la ventana desplegada del software del equipo seleccionado, dar clic en la categoría de "instrument", y luego en "sampler", en esta ventana dar clic en cada una de las pestañas "prime syringe", "wash buffer loop", y "wash needle externally", para purgar la jeringa y el puerto de inyección.
6. Preparar la fase móvil de acuerdo a la técnica de análisis y transferir a un reservorio HPLC.
7. Colocar la fase móvil en la bandeja del equipo HPLC y ubicar la línea "A" designada para la fase móvil. (líneas B, C y D son destinadas para los solventes puros HPLC metanol, agua y acetonitrilo respectivamente).
8. Abrir la válvula de drenaje y realizar desde el software Chromeleon 7 el Purgado de todas las líneas de solvente incluyendo la fase móvil, con la opción "purge". (terminara el purgado automáticamente en 5 minutos)
9. Cerrar la válvula de drenaje.
10. Abrir la compuerta del horno y colocar la columna cromatográfica, enroscando las férulas en cada extremo de la columna.
11. Cerrar la compuerta del horno.
12. Encender el horno y la lámpara UV desde el software Chromeleon 7.
13. Ambientar la columna cromatográfica con la misma proporción de solventes que la fase móvil durante una hora como mínimo a un flujo de 1.0ml/min. (Nota: Controlar la presión del equipo que ésta no exceda de 4000psi mientras se ambienta y se esté realizando el análisis)

14. Posteriormente ambientar la columna cromatográfica con la fase móvil durante una hora como mínimo con el mismo flujo de 1.0ml/min.
15. Preparar las muestras y estándares según la metodología analítica, filtrar y colocar en viales HPLC.
16. Colocar los viales de muestras y estándares en el portaviales del HPLC en el orden requerido.
17. Crear en el software Chromeleon 7, el método de análisis, especificando las condiciones HPLC. (Duración de la corrida en minutos, temperatura del horno, longitud de onda, flujo y proporción de solventes o fase móvil).
18. Crear en el software Chromeleon 7, la secuencia a utilizar por el automuestreador, especificando el orden, el nombre, el número de muestras y estándares a analizar, el número de repeticiones. el volumen de inyección y el método de análisis creado anteriormente.
19. Verificar que la línea base del cromatograma se encuentre estable antes de iniciar el análisis.
20. Iniciar la corrida de la secuencia creada anteriormente haciendo clic en el botón "START" en el software Chromeleon 7. (El equipo iniciara a analizar estándares y muestras en el orden especificado).
21. Una vez finalizada la secuencia de análisis, proceder al lavado de la columna utilizando un gradiente con los mismos solventes de la fase móvil.
22. Proceder a la obtención de los cromatogramas así como la integración de las áreas obtenidas del pico de interés, y posterior generación de reportes.

**ANEXO N° 3**  
**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE LINEALIDAD DEL**  
**SISTEMA**





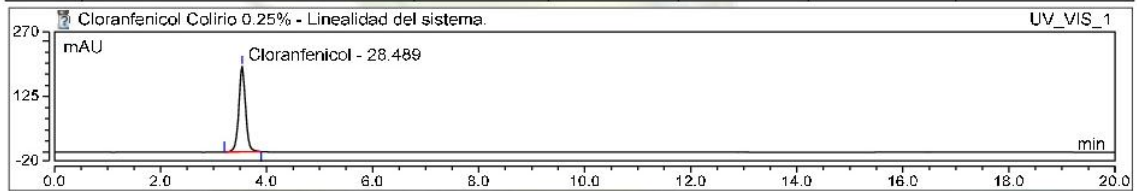
## Summary

### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal **Date:** 06.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
4	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St1 100%	3.526	28.489			



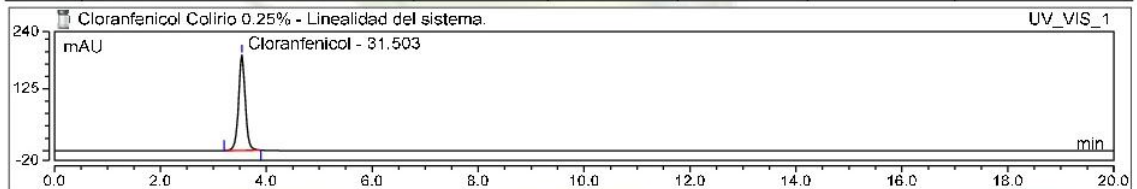
## Summary

### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal **Date:** 06.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
5	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St1 110%	3.527	31.503			



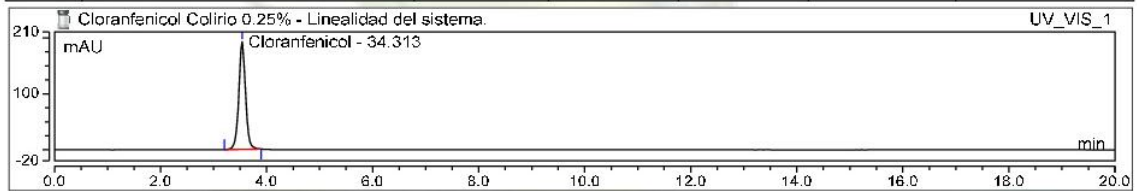
## Summary

### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 06.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
6	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St1 120%	3.532	34.313			



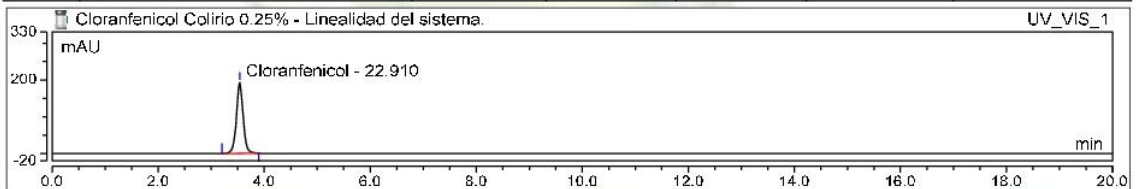
## Summary

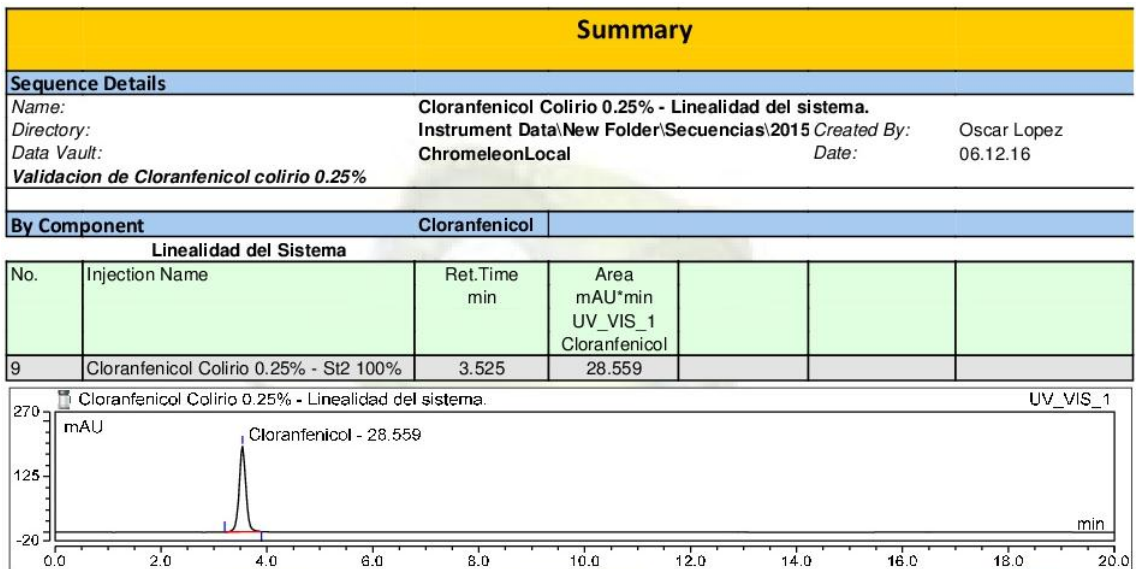
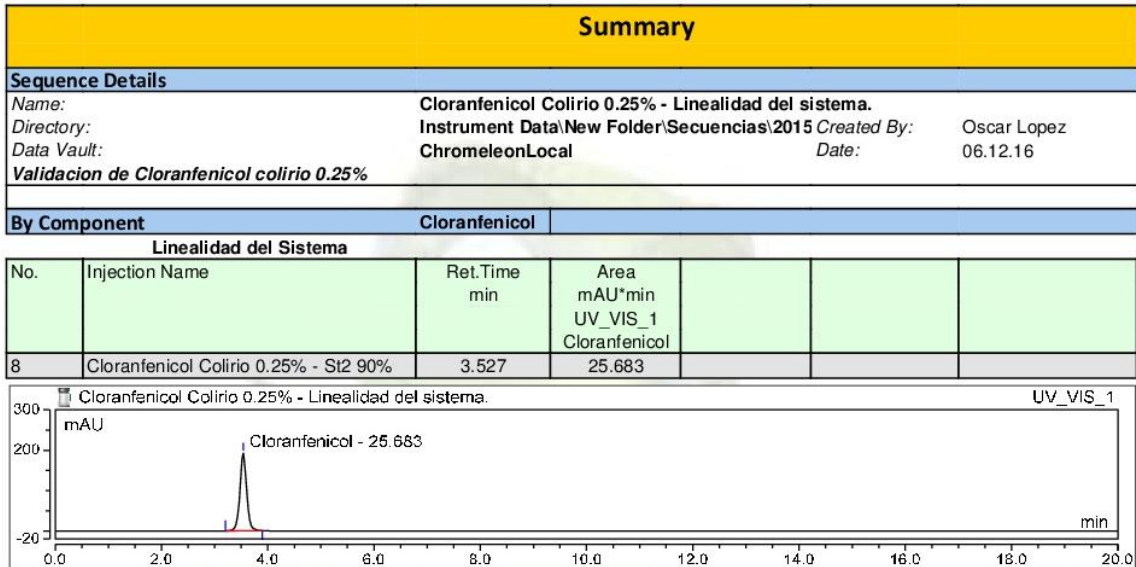
### Sequence Details

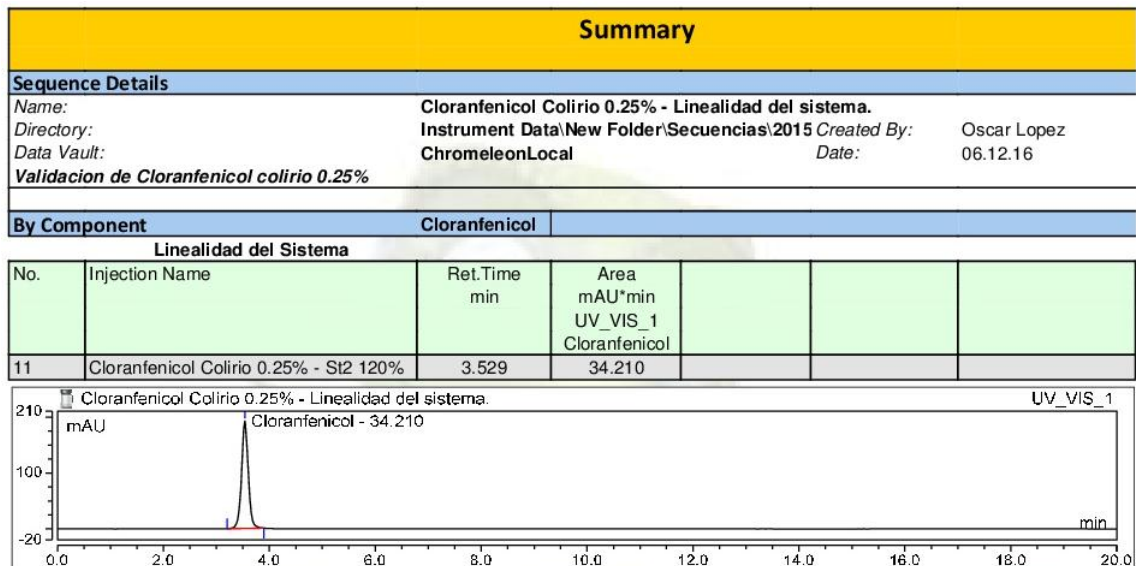
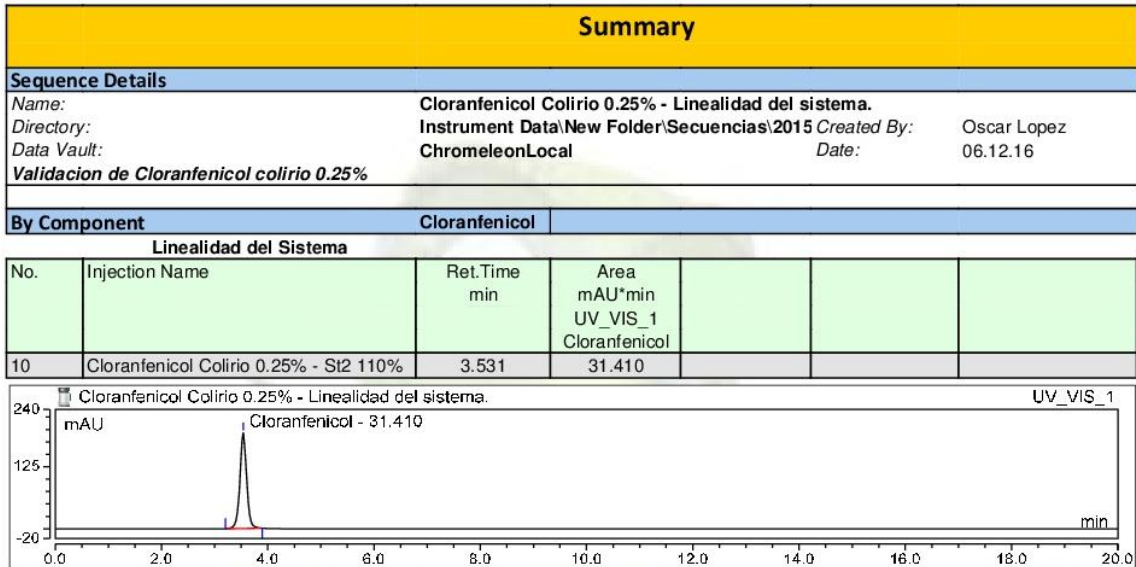
**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 06.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
7	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St2 80%	3.527	22.910			





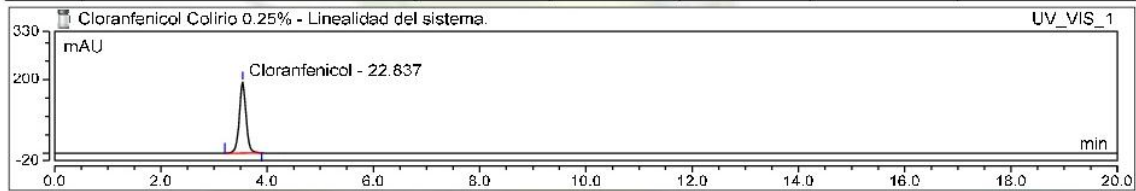


## Summary

Sequence Details			
Name:	Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.		
Directory:	Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015		Created By: Oscar Lopez
Data Vault:	ChromeleonLocal	Date:	06.12.16
<b>Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%</b>			

By Component	Cloranfenicol
--------------	---------------

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
12	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St3 80%	3.529	22.837			

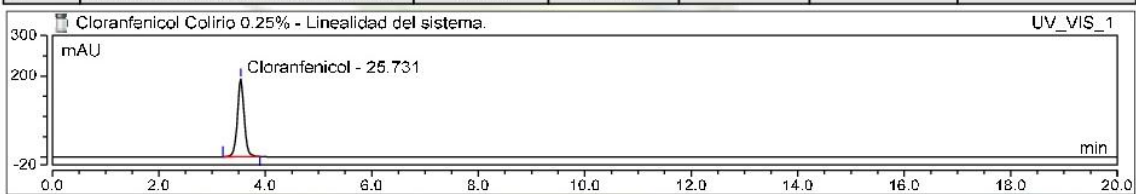


## Summary

Sequence Details			
Name:	Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.		
Directory:	Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015		Created By: Oscar Lopez
Data Vault:	ChromeleonLocal	Date:	06.12.16
<b>Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%</b>			

By Component	Cloranfenicol
--------------	---------------

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
13	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St3 90%	3.530	25.731			

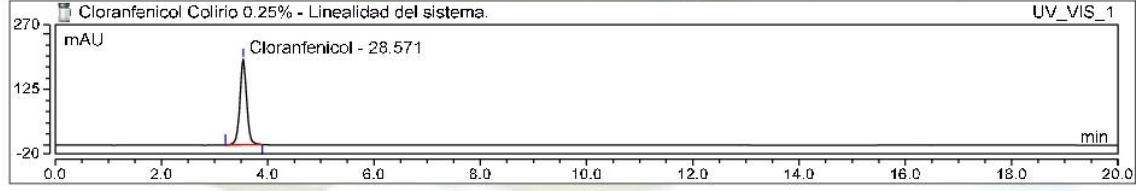


## Summary

**Sequence Details**  
 Name: Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
 Directory: Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: ChromeleonLocal Date: 06.12.16  
 Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%

**By Component** Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
14	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St3 100%	3.527	28.571			

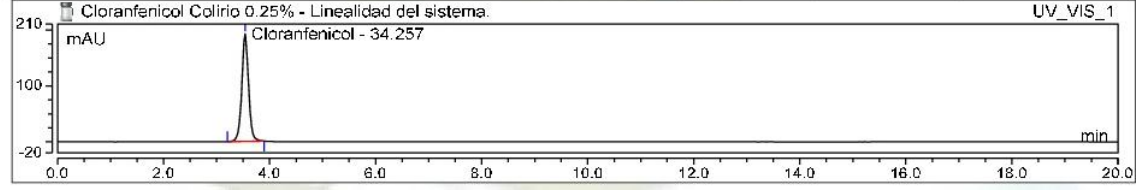


## Summary

**Sequence Details**  
 Name: Cloranfenicol Colirio 0.25% - Linealidad del sistema.  
 Directory: Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: ChromeleonLocal Date: 06.12.16  
 Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%

**By Component** Cloranfenicol

Linealidad del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol			
16	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St3 120%	3.527	34.257			



**ANEXO N° 4**  
**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE PRECISION DEL**  
**SISTEMA**



## Summary

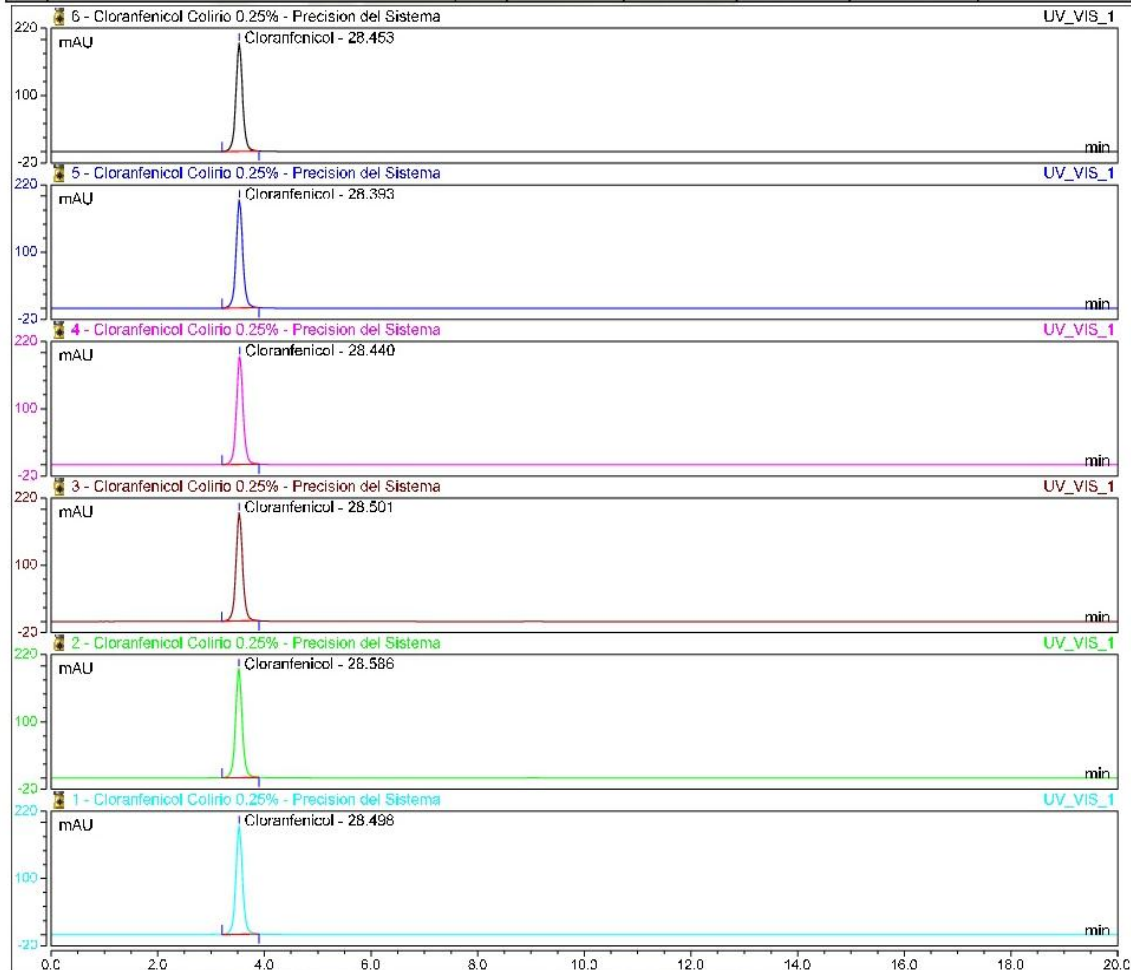
### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Precision del Sistema  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016  
**Data Vault:** ChromeleonLocal  
**Created By:** Oscar Lopez  
**Data:** 06.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component

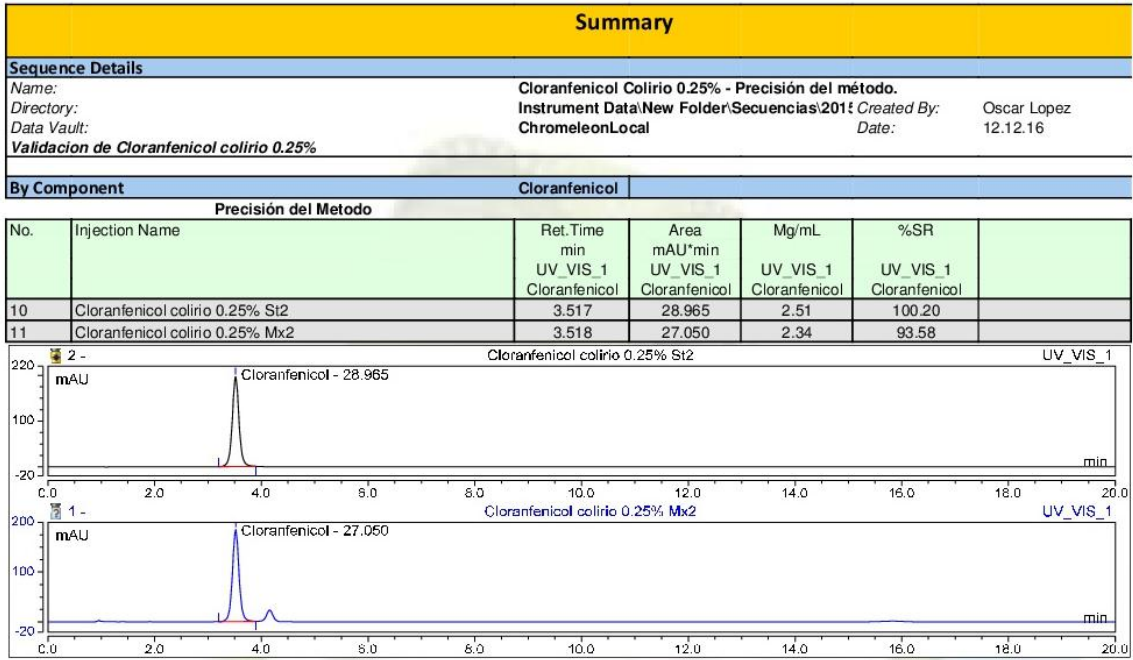
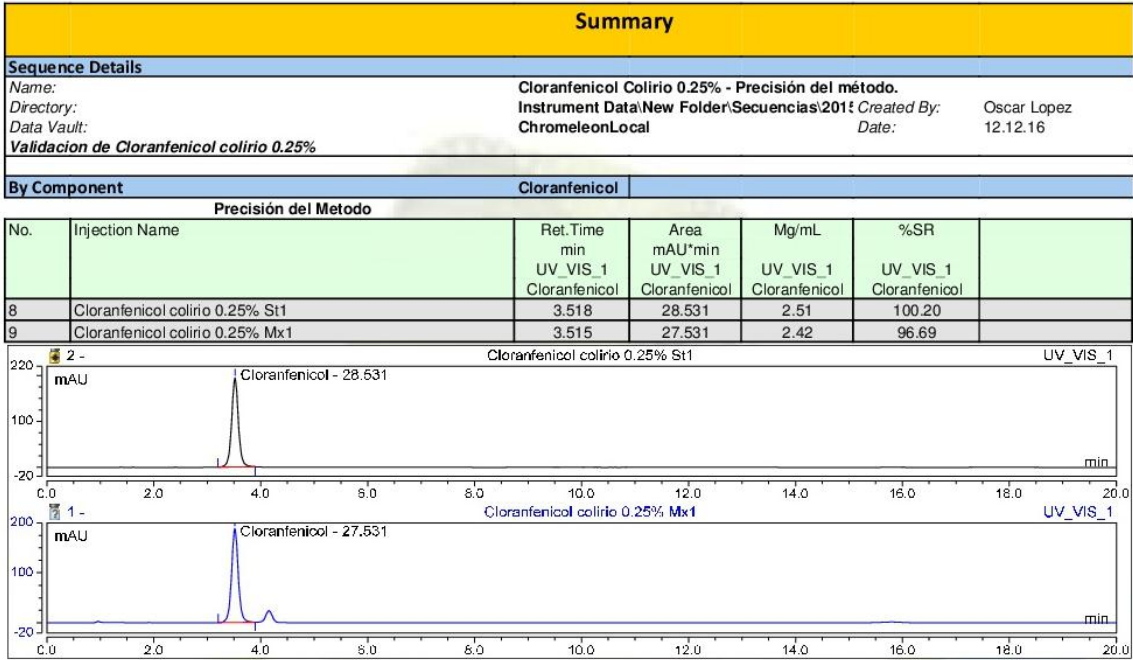
#### Cloranfenicol

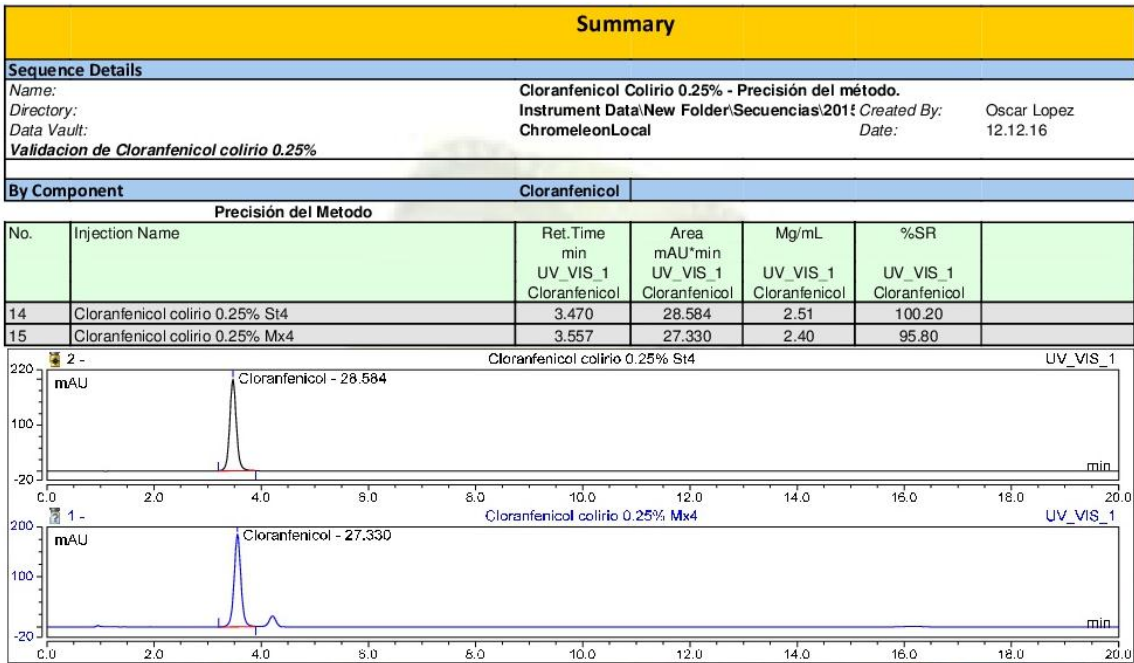
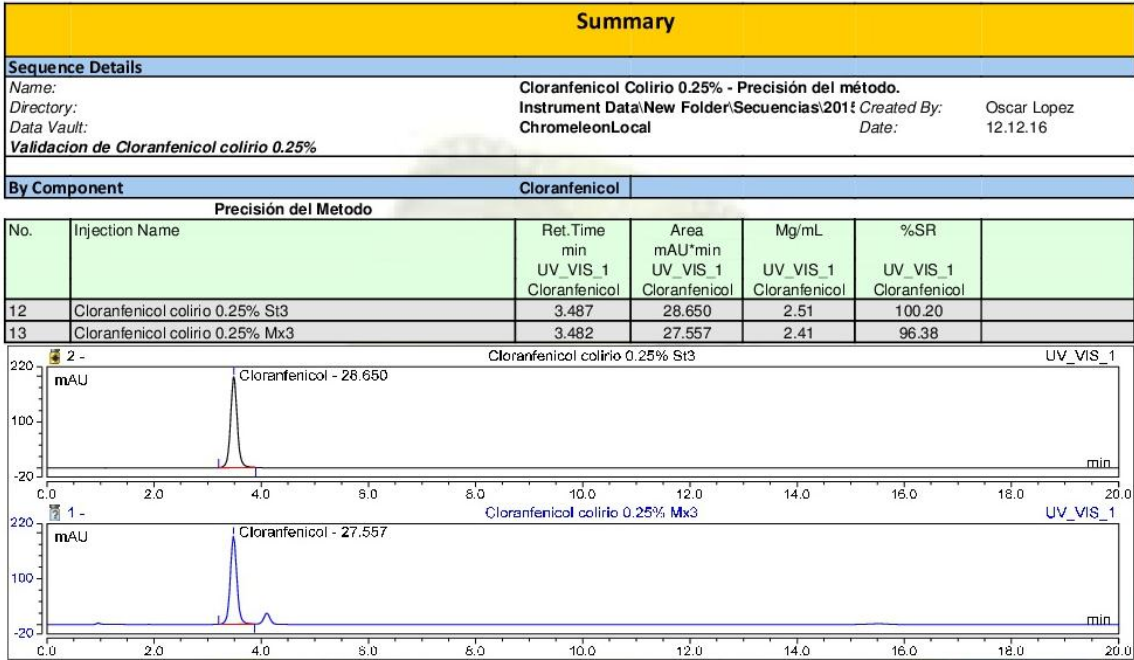
Precisión del Sistema						
No.	Injection Name	Ret.Time min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Promedio Areas	RSD Areas	
2	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 1	3.527	28.453			
3	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 2	3.530	28.393			
4	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 3	3.537	28.440			
5	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 4	3.527	28.501			
6	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 5	3.518	28.586			
7	Cloranfenicol Colirio 0.25% Precision del sistema St1 - rep 6	3.525	28.498	28.4784	0.2325	

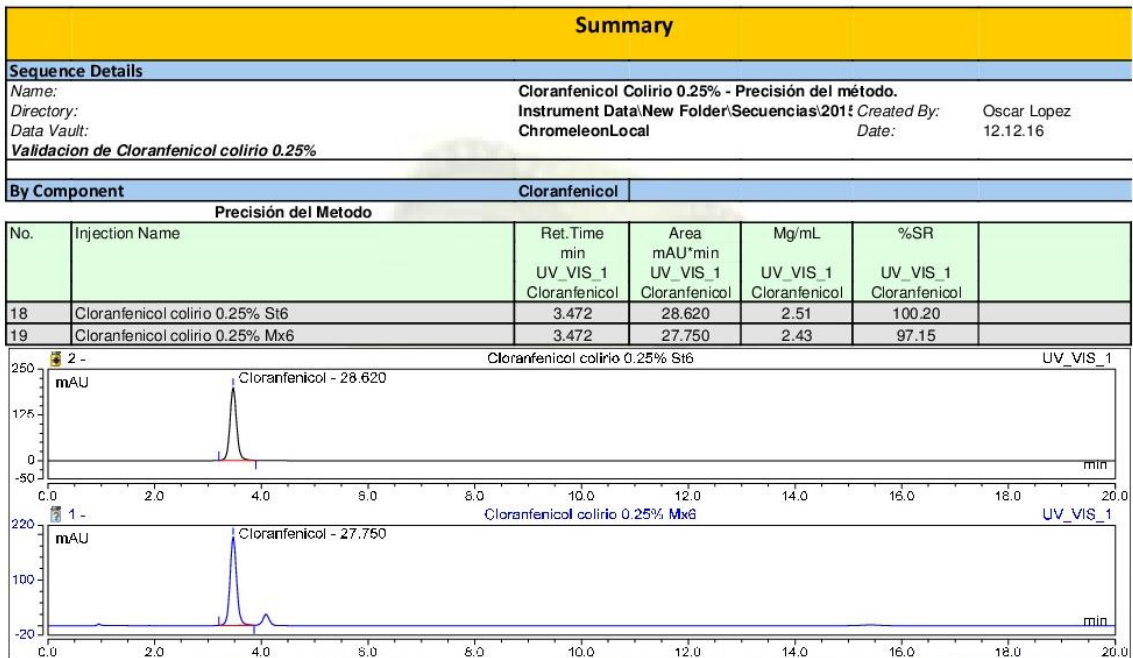
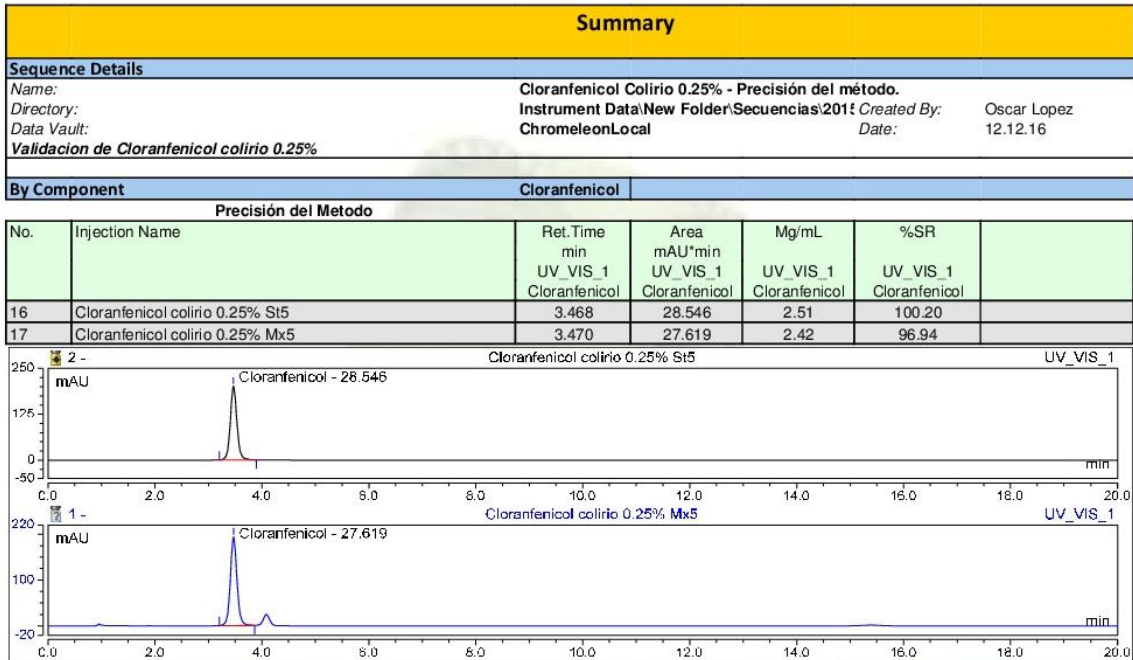




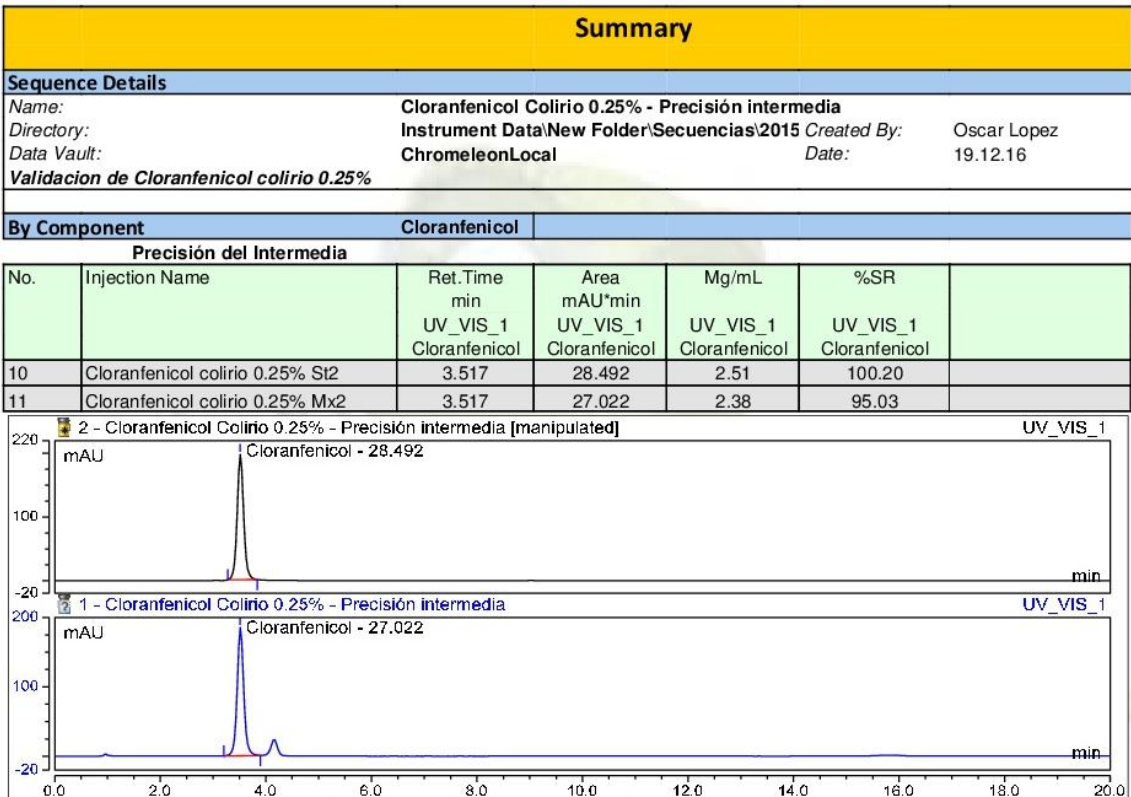
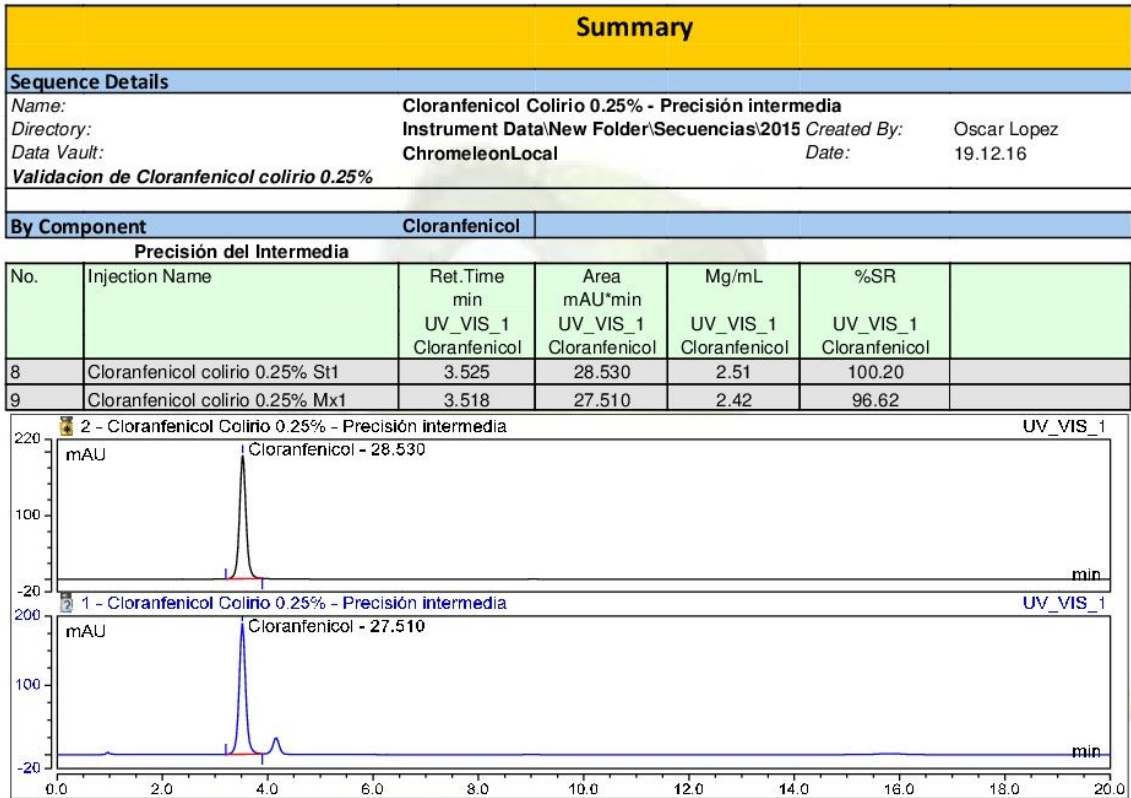
**ANEXO N° 5**  
**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE PRECISION DEL**  
**METODO**







**ANEXO N° 6**  
**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE PRECISION**  
**INTERMEDIA**





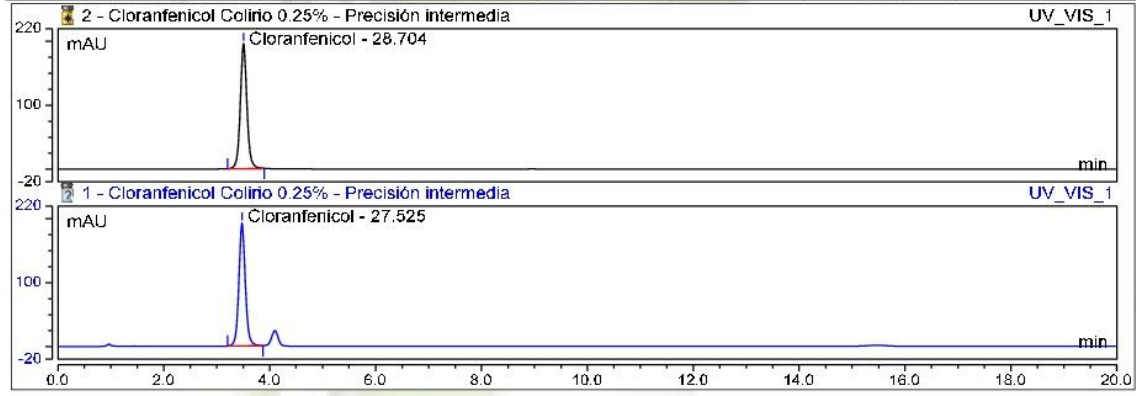
## Summary

**Sequence Details**  
 Name: **Cloranfenicol Colirio 0.25% - Precisión intermedia**  
 Directory: **Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015** Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: **ChromeleonLocal** Date: 19.12.16  
 Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%

**By Component** Cloranfenicol

**Precisión del Intermedia**

No.	Injection Name	Ret.Time min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Mg/mL UV_VIS_1 Cloranfenicol	%SR UV_VIS_1 Cloranfenicol
12	Cloranfenicol colirio 0.25% St3	3.505	28.704	2.51	100.20
13	Cloranfenicol colirio 0.25% Mx3	3.475	27.525	2.40	96.08



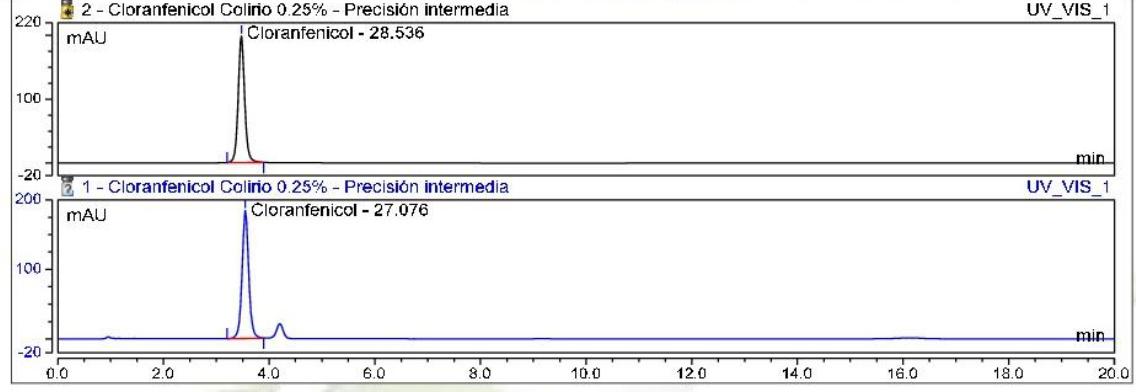
## Summary

**Sequence Details**  
 Name: **Cloranfenicol Colirio 0.25% - Precisión intermedia**  
 Directory: **Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015** Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: **ChromeleonLocal** Date: 19.12.16  
 Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%

**By Component** Cloranfenicol

**Precisión del Intermedia**

No.	Injection Name	Ret.Time min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 Cloranfenicol	Mg/mL UV_VIS_1 Cloranfenicol	%SR UV_VIS_1 Cloranfenicol
14	Cloranfenicol colirio 0.25% St4	3.473	28.536	2.51	100.20
15	Cloranfenicol colirio 0.25% Mx4	3.550	27.076	2.38	95.07



### Summary

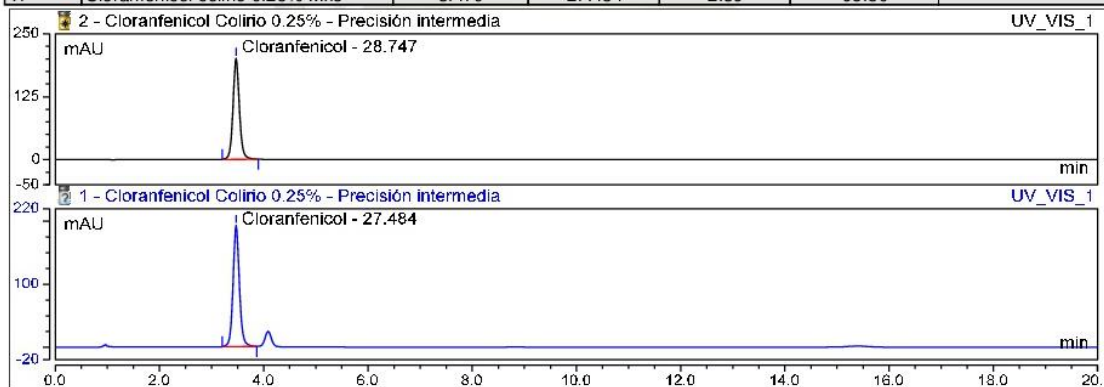
#### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Precisión intermedia  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 19.12.16  
**Validación de Cloranfenicol colirio 0.25%**

#### By Component Cloranfenicol

##### Precisión del Intermedia

No.	Injection Name	Ret. Time	Area	Mg/mL	%SR
		min	mAU*min		
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1
		Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol
16	Cloranfenicol colirio 0.25% St5	3.468	28.747	2.51	100.20
17	Cloranfenicol colirio 0.25% Mx5	3.470	27.484	2.39	95.80



### Summary

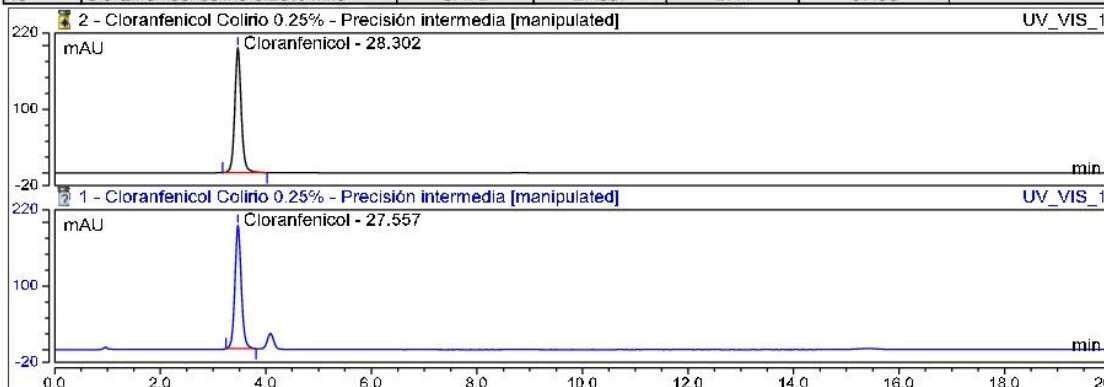
#### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Precisión intermedia  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2015 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 19.12.16  
**Validación de Cloranfenicol colirio 0.25%**

#### By Component Cloranfenicol

##### Precisión del Intermedia

No.	Injection Name	Ret. Time	Area	Mg/mL	%SR
		min	mAU*min		
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1
		Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol
18	Cloranfenicol colirio 0.25% St6	3.470	28.302	2.51	100.20
19	Cloranfenicol colirio 0.25% Mx6	3.472	27.557	2.44	97.56





**ANEXO N° 7**  
**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE EXACTITUD DEL**  
**METODO**

### Summary

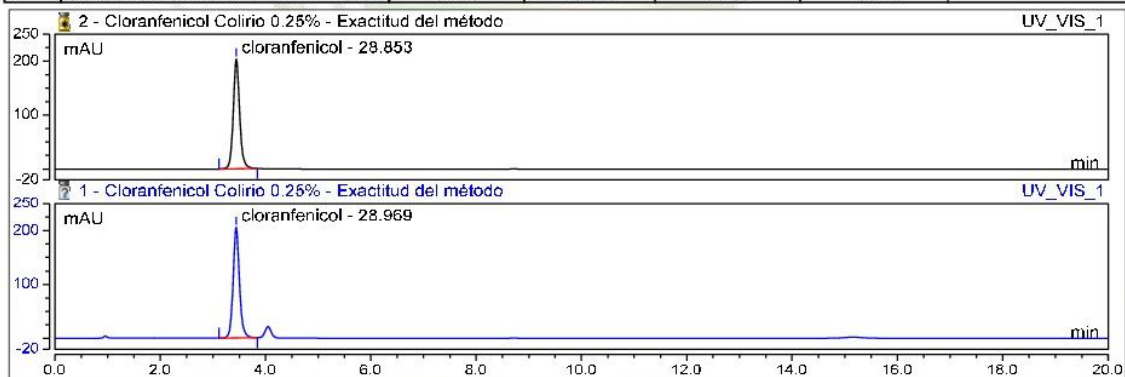
#### Sequence Details

Name: Cloranfenicol Colirio 0.25% - Exactitud del método  
 Directory: Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016\ Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: ChromeleonLocal Date: 14.12.16

#### By Component cloranfenicol

##### Exactitud del Método.

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol	Mg Recuperados UV_VIS_1 cloranfenicol	%Recuperado UV_VIS_1 cloranfenicol
2	Cloranfenicol Colirio 0.25% St1	3.443	28.853	50.10	100.00
4	Cloranfenicol Colirio 0.25% Mx1 - 100%	3.440	28.969	50.30	100.40



### Summary

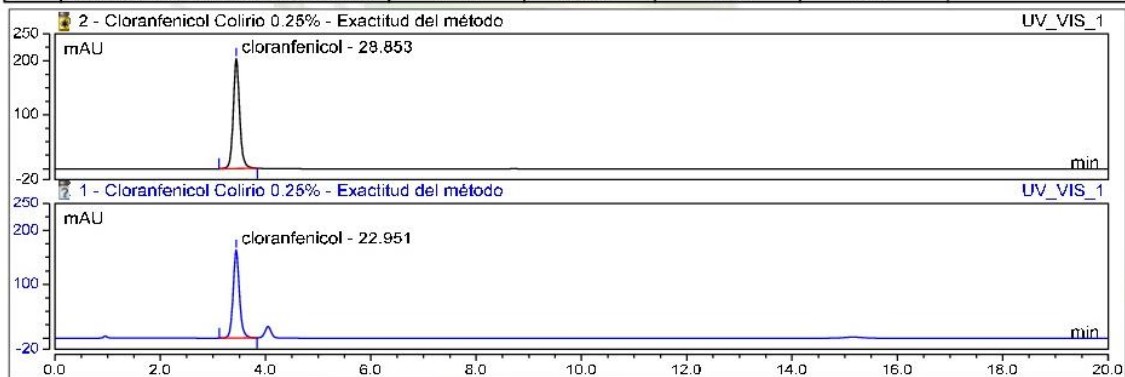
#### Sequence Details

Name: Cloranfenicol Colirio 0.25% - Exactitud del método  
 Directory: Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016\ Created By: Oscar Lopez  
 Data Vault: ChromeleonLocal Date: 14.12.16

#### By Component cloranfenicol

##### Exactitud del Método.

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol	Mg Recuperados UV_VIS_1 cloranfenicol	%Recuperado UV_VIS_1 cloranfenicol
2	Cloranfenicol Colirio 0.25% St1	3.443	28.853	50.10	125.06
3	Cloranfenicol Colirio 0.25% Mx1 - 80%	3.440	22.951	39.85	99.48



### Summary

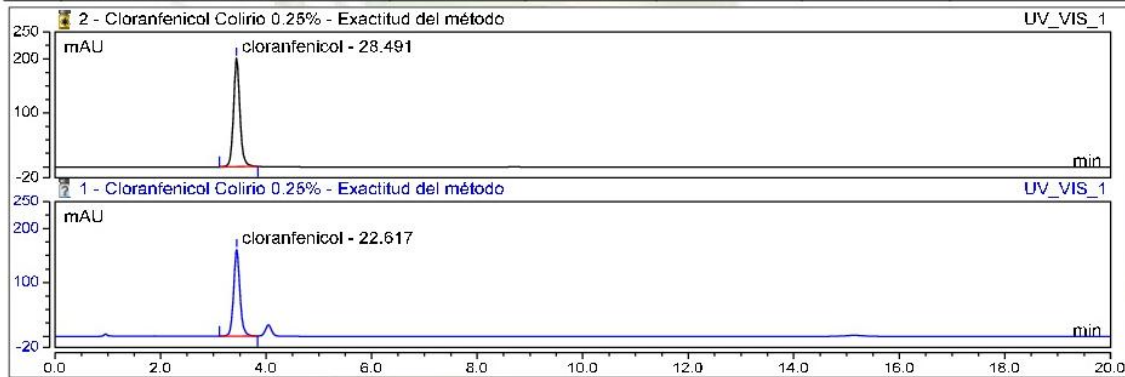
#### Sequence Details

Name: **Cloranfenicol Colirio 0.25% - Exactitud del método**  
 Directory: **Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016\** Created By: **Oscar Lopez**  
 Data Vault: **ChromeleonLocal** Date: **14.12.16**

**By Component** cloranfenicol

#### Exactitud del Método.

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol	Mg Recuperados UV_VIS_1 cloranfenicol	%Recuperado UV_VIS_1 cloranfenicol
6	Clorafenicol Colirio 0.25% St2	3.438	28.491	50.10	125.06
7	Clorafenicol Colirio 0.25% Mx2 - 80%	3.440	22.617	39.77	99.28



### Summary

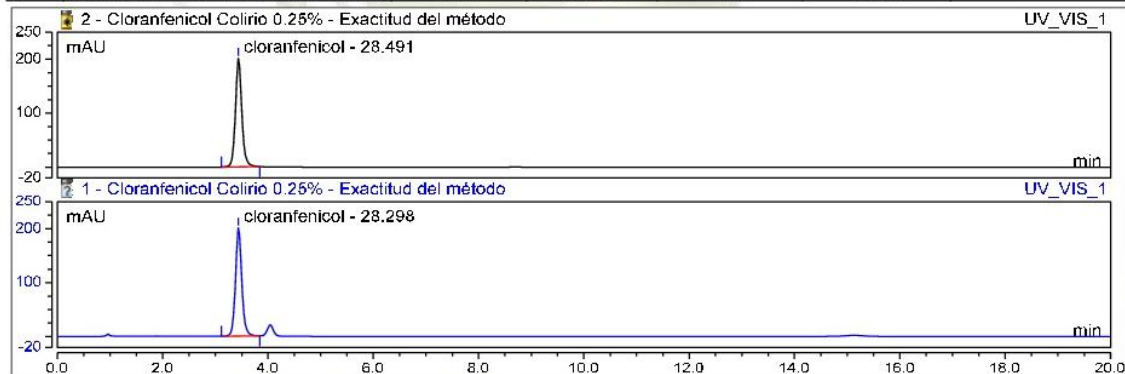
#### Sequence Details

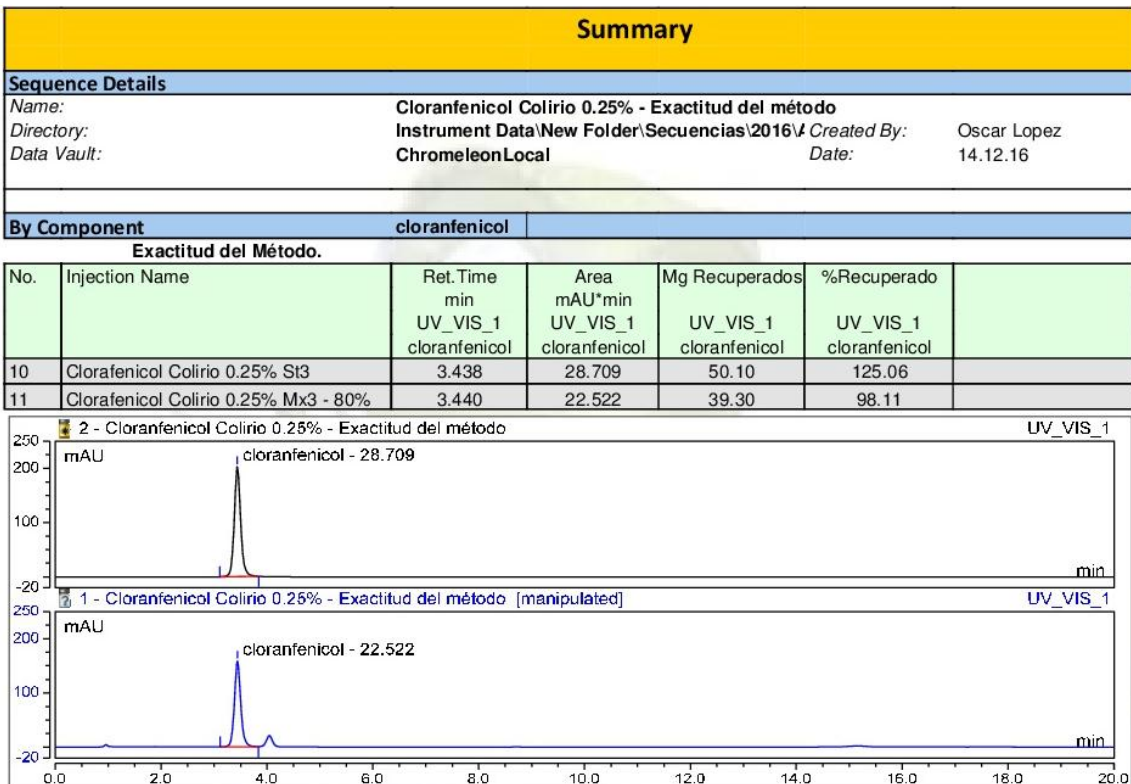
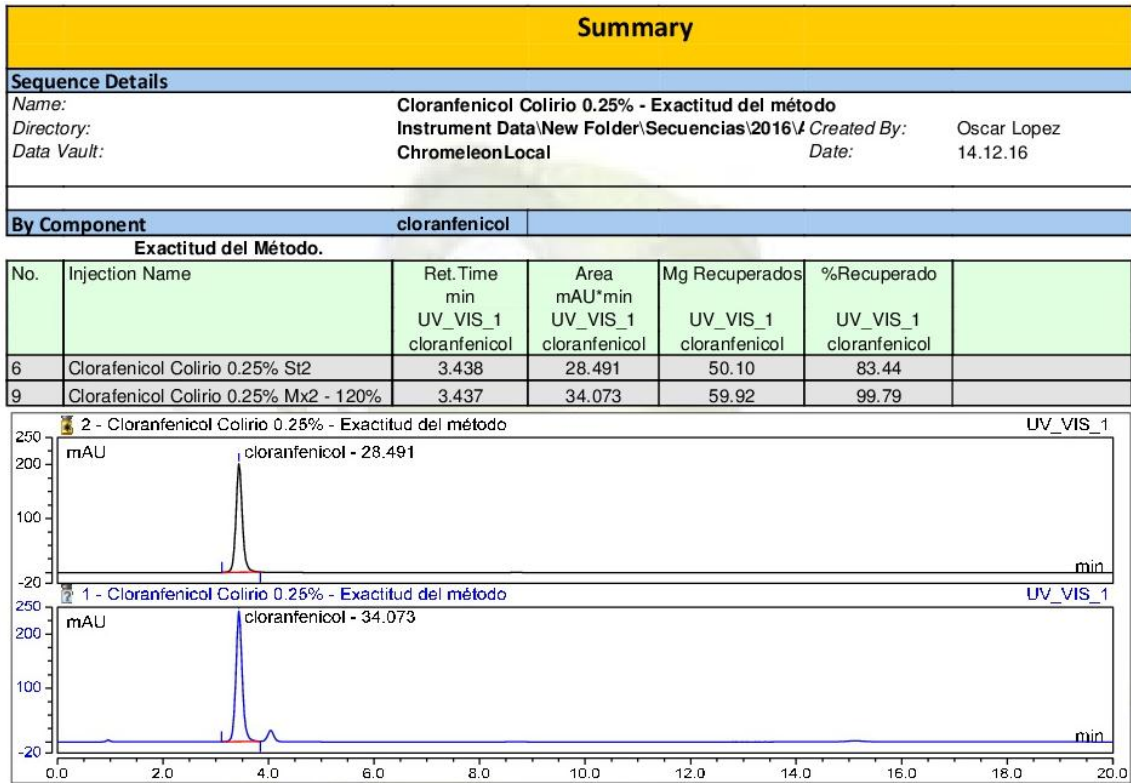
Name: **Cloranfenicol Colirio 0.25% - Exactitud del método**  
 Directory: **Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016\** Created By: **Oscar Lopez**  
 Data Vault: **ChromeleonLocal** Date: **14.12.16**

**By Component** cloranfenicol

#### Exactitud del Método.

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol	Mg Recuperados UV_VIS_1 cloranfenicol	%Recuperado UV_VIS_1 cloranfenicol
6	Clorafenicol Colirio 0.25% St2	3.438	28.491	50.10	100.00
8	Clorafenicol Colirio 0.25% Mx2 - 100%	3.438	28.298	49.76	99.32





## Summary

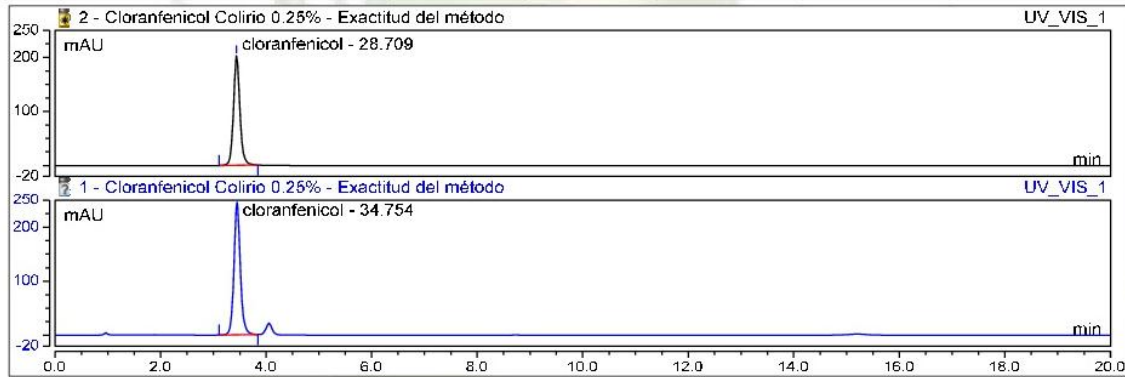
### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Exactitud del método  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2016\ Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 14.12.16

### By Component cloranfenicol

#### Exactitud del Método.

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol	Mg Recuperados UV_VIS_1 cloranfenicol	%Recuperado UV_VIS_1 cloranfenicol
10	Cloranfenicol Colirio 0.25% St3	3.438	28.709	50.10	83.44
13	Cloranfenicol Colirio 0.25% Mx3 - 120%	3.447	34.754	60.65	101.01



**ANEXO N° 8**

**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE SELECTIVIDAD**

## Summary

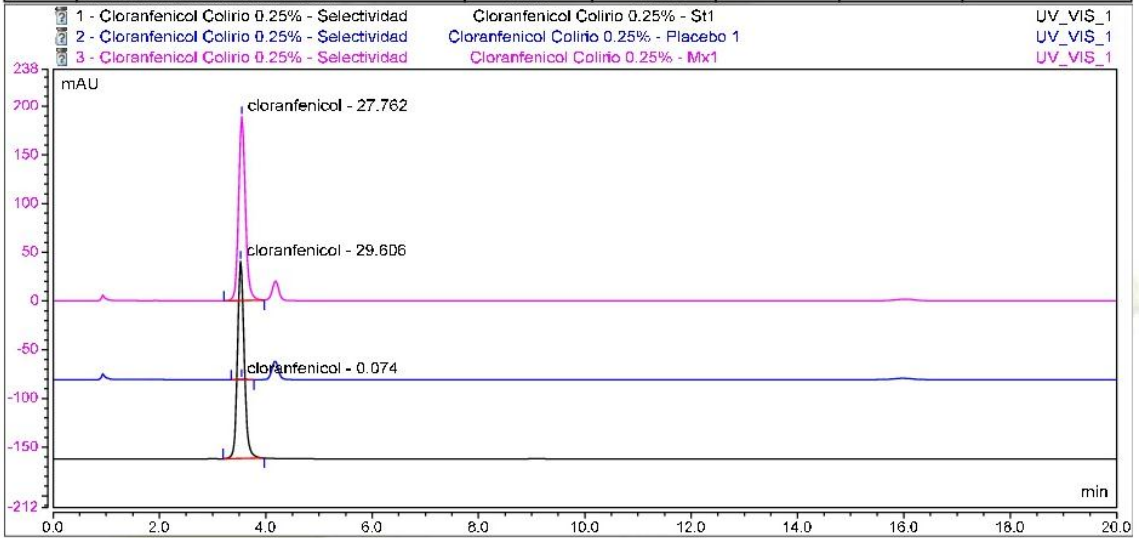
### Sequence Details

**Name:** Cloranfenicol Colirio 0.25% - Selectividad  
**Directory:** Instrument Data\New Folder\Secuencias\2011 Created By: Oscar Lopez  
**Data Vault:** ChromeleonLocal Date: 15.12.16  
**Validacion de Cloranfenicol colirio 0.25%**

### By Component

cloranfenicol

No.	Injection Name	Ret. Time min UV_VIS_1 cloranfenicol	Area mAU*min UV_VIS_1 cloranfenicol			
2	Cloranfenicol Colirio 0.25% - St1	3.527	29.606			
5	Cloranfenicol Colirio 0.25% - Placebo 1	3.542	0.074			
7	Cloranfenicol Colirio 0.25% - Mx1	3.548	27.762			



**ANEXO N° 9**  
**FORMULAS GENERALES DE CÁLCULO <sup>(2)</sup>**



## FORMULAS GENERALES DE CÁLCULO.

-Media aritmética:

$$\gamma = \frac{\sum \gamma}{n}$$

-Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

-Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\gamma} * 100$$

-Ecuación linealidad:

$$y = bx + a$$

-Cálculo de b:

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

-Cálculo de a:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

-Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \left( \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} \right)^2$$

**ANEXO N° 10**

**CARTA DE ACEPTACION DE DOCUMENTACION PRESENTADA**

San salvador, 22 de agosto de 2017

Universidad de El Salvador, Facultad de Química y farmacia:

Por medio de la presente se hace su conocimiento que se ha recibido satisfactoriamente por parte del bachiller José Oscar López Iraheta la siguiente documentación presentada:

- Protocolo de validación
- Reporte de validación
- Certificado de validación
- Resultados obtenidos

La cual corresponde al desarrollo del trabajo de graduación denominado "Propuesta de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio", realizado en el periodo de Diciembre de 2016 a Enero de 2017 dentro de nuestras instalaciones como Laboratorio Farmacéutico Nacional.

Sin otro particular que tratar, se extiende la presente.



Departamento de Desarrollo y Validación  
de Métodos Analíticos