

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO
PARA ENSAYO Y DISOLUCION DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA 500
mg

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
JORGE ALBERTO ESCOBAR RODRIGUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORA DE ÁREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS**

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

DOCENTES ASESORES

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía
Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

Agradecimientos

Primeramente, darle las gracias a Dios por darme el coraje, la fuerza, la salud y la sabiduría para poder finalizar esta etapa de mi formación profesional.

A mi madre que ha sido un gran apoyo, sus consejos, la motivación que me ha dado durante todo este proceso, me ha impulsado a salir adelante y no rendirme, gracias Mamá.

A mi padre que se esforzó mucho para apoyarme moral y económicamente, nunca le faltaron sus consejos, sus palabras alentadoras para hacerme entrar en razón en momentos difíciles de pensamientos negativos, a pesar de las recaídas que tuve siempre confió en mí y pensó que podía lograr mis metas.

De igual manera estoy muy agradecido con mi compañera de vida Vanessa Paniagua y mi hija Kimberly Escobar por ayudarme a cumplir mi sueño de ser un profesional.

A mis docentes asesores, Licda. Zenia Arévalo y MSc. Eliseo Ayala por su enorme paciencia y siempre estar disponibles para ayudarme en el desarrollo de mi trabajo de graduación.

A licenciado Oscar López por compartirme sus conocimientos que fueron muy importantes en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros, familiares y amigos que fueron parte de una u otra forma de este logro muy importante en mi vida infinitas gracias.

Dedicatoria

A mis padres:

Dedico este logro ya que fueron el apoyo incondicional, me apoyaron desde un inicio y no han dejado de acompañarme en mi formación académica, siempre soñamos como equipo familiar que sería un profesional y juntos lo hemos logrado, me siento muy feliz de poder honrarlos con esta etapa tan importante en mi vida.

Los amo mucho y nunca voy a olvidar todo el esfuerzo que hicieron y que hacen para guiarme y formarme como un hombre de bien.

Atte.

Jorge Escobar

INDICE

	Pág. N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xv
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	20
3.1 Clorhidrato de Ciprofloxacina	20
3.1.1 Mecanismo de acción	20
3.1.2 Farmacología clínica	21
3.1.3 Indicaciones	21
3.1.4 Posología	21
3.1.5 Contraindicaciones y advertencias	22
3.1.6 Precauciones	22
3.1.7 Eventos adversos	22
3.1.8 Interacciones farmacológicas	23
3.1.9 Embarazo y lactancia	23
3.1.10 Sobredosis	24
3.1.11 Recomendaciones generales	24
3.2 Aspectos teóricos de validación y características de desempeño analítico	24
3.2.1 Validación	25
3.2.1 Validación de un procedimiento analítico	25
3.3 Procedimientos analíticos que son objeto de validación	25
3.4 Cuando deben validarse los métodos analíticos	27
3.5 Etapas para realizar la validación de un método analítico	30

3.6 Equipos utilizados en la validación de un método analítico o determinación de parámetros de desempeño analítico.	32
3.7 Características de desempeño analítico	41
3.7.1 Exactitud	41
3.7.2 Precisión	43
3.7.3 Especificidad	44
3.7.4 Limite de detección	45
3.7.5 Limite de cuantificación	47
3.7.6 Linealidad e intervalo	48
3.7.7 Robustez	50
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	52
4.1 Tipo de estudio	52
4.2 investigación bibliográfica	52
4.3 Investigación de Campo	52
4.4 Parte Experimental	52
4.4.1 Prueba de Ensayo	53
4.4.1.1 Precisión	56
4.4.1.2 Exactitud	57
4.4.1.3 Linealidad del Sistema	59
4.4.1.4 Linealidad del Método	60
4.4.2 Disolución	63
4.4.2.1 Precisión (Repetibilidad)	65
4.4.2.2 Exactitud	67

CAPITULO V

5.0 Resultados y discusión de resultados	70
5.1 Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico para ensayo y disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.	71
5.2 Resultados de Evaluación de parámetros de desempeño analítico Precisión, Exactitud, y Linealidad para Ensayo	97
5.2.1 Precisión (repetibilidad)	97
5.2.2 Exactitud	98
5.2.3 Linealidad del sistema	99
5.2.4 Linealidad de método	100
5.3 Resultados de evaluación los parámetros de desempeño Exactitud y Precisión para Disolución de tabletas de ciprofloxacina en presentación 500 mg.	102
5.3.1 Precisión (repetibilidad)	102
5.3.2 Exactitud	103
5.4 Comparación de los parámetros de desempeño para Ensayo y Disolución con los criterios de aceptación especificados en el Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA)	105
5.5 Informe final para la asignatura de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos de los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño.	106

CAPITULO VI

6.0 Conclusiones	121
------------------	-----

CAPITULO VII

7.0 Recomendaciones	123
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figuras N°	Pág.
1. Estructura de la molécula de Ciprofloxacina	17
2. Disolutor Erweka DT6	34
3. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, serie 1100	36
4. Espectrofotómetro Shimadzu Modelo 1800	40

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Precisión (repetibilidad) en el ensayo.	97
2.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Exactitud en el ensayo.	98
3.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Linealidad del sistema en el ensayo.	99
4.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Linealidad del método en el ensayo.	100
5.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Precisión en la disolución.	102
6.	Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Exactitud en la disolución	103

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Datos requeridos para la Validación.
2. Material, equipo y reactivos utilizados para la determinación de características de desempeño analítico.
3. Cálculos para 5 niveles de concentración utilizados para ensayo en linealidad del sistema y cálculos de compensación de ciprofloxacina HCL a ciprofloxacina base.
4. Preparación de reactivos para prueba de ensayo y disolución según monografía USP 38 NF 33 de Ciprofloxacina tableta
5. Cascadas de dilución para preparación de estándar y preparación de muestra en la prueba de ensayo y disolución
6. Preparación de soluciones para ensayo
7. Cascadas de dilución utilizadas para linealidad del método en ensayo
8. Resultados de prueba de ensayo según monografía USP 38 NF 33
9. Resultados obtenidos en la evaluación de parámetros de desempeño analítico precisión, exactitud, y linealidad para ensayo de ciprofloxacina tableta en presentación de 500 mg.
10. Resultados obtenidos en la evaluación de parámetros de desempeño analítico precisión y exactitud para disolución de ciprofloxacina tableta en presentación de 500 mg.
11. Cromatogramas de la determinación de precisión (repetibilidad) en ensayo
12. Cromatogramas de la determinación de exactitud en ensayo

13. Cromatogramas de la determinación de linealidad del sistema en ensayo
14. Cromatogramas de la determinación de linealidad del método en ensayo
15. Variables estadísticas a determinar y criterios de aceptación
16. Fórmulas utilizadas en la determinación de parámetros de desempeño analítico

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto la determinación de parámetros de desempeño analítico para ensayo y disolución de tabletas de ciprofloxacina de 500 mg. Se calcularon los parámetros de desempeño analítico Precisión, Exactitud, y linealidad para ensayo y para disolución se calcularon Precisión y Exactitud.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la asignatura de Control de Calidad de la Universidad de El Salvador de la facultad de Química y Farmacia, en el periodo comprendido de septiembre 2017 a diciembre 2018. debido a que actualmente no existen métodos analíticos Validados en la asignatura de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, estos fueron comparados con Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos versión 1 2010 del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), donde se comprobó el cumplimiento de los parámetros de desempeño analítico; así también se puede comprobar que las condiciones como: ambientales, equipos utilizados, cristalería, instrumentos, reactivos entre otros, del Laboratorio de Control de Calidad de la Facultad de Química y Farmacia cumplen para llevar a cabo la determinación de parámetros de desempeño analítico.

Con el objetivo de aportar valor y finalizar la validación de la metodología expuesta en el presente trabajo recomienda dar seguimiento al estudio realizado, evaluando otros parámetros de desempeño analítico.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Un método analítico validado posee como ventaja el cumplimiento de exigencias legales regulatorias, además de demostrar que el método es adecuado y eficaz para su uso, así como minimizar fallos y repeticiones con lo que se ahorran recursos económicos asociados a estos, también hay seguridad y confianza en los resultados obtenidos en los análisis, y así se podría seguir mencionando muchas ventajas que ofrece la validación de un método analítico. Todas las regulaciones farmacéuticas como por ejemplo el informe 32 de la OMS, piden que los métodos analíticos con repercusión en la calidad del producto estén validados, he aquí la importancia del cumplimiento de los parámetros de desempeño analíticos.

Las características de desempeño analítico son elementos requeridos para la validación de un método analítico es decir son características que necesitan ser evaluadas; dichas características son: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Linealidad, intervalo y Robustez; de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos de América.

El presente trabajo está dirigido a la determinación y estudio de parámetros de desempeño analítico para ensayo y disolución de Ciprofloxacina tableta de 500 mg. se desarrollaron dos protocolos, uno para la determinación de parámetros de desempeño de Ensayo y el otro para parámetros de desempeño de Disolución con el objetivo de desarrollar un método analítico confiable que pueda ser utilizado en la asignatura de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos, específicamente en las prácticas de laboratorio (Perfiles de disolución), ya que actualmente a los métodos no se les ha realizado la determinación de características de desempeño analítico.

Finalizado el estudio, se puede comprobar que las condiciones ambientales, equipos utilizados, cristalería, instrumentos, reactivos entre otros, del Laboratorio

de Control de Calidad en la Facultad de Química y Farmacia cumplen para llevar a cabo la validación de métodos analíticos.

Con el objetivo de aportar valor y finalizar la validación de la metodología expuesta en el presente trabajo recomienda dar seguimiento al estudio realizado, evaluando otros parámetros de desempeño analítico.

El proceso de investigación y desarrollo se llevó a cabo en la Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia en el Laboratorio de la asignatura de Control de Calidad, en el periodo comprendido de septiembre 2017 a diciembre 2018.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los parámetros de desempeño analítico para ensayo y disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.

2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Elaborar un Protocolo de evaluación de Parámetros de Desempeño Analítico para Ensayo y Disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.
- 2.2.2 Evaluar los parámetros de desempeño Exactitud, Precisión, y Linealidad para Ensayo de tabletas de Ciprofloxacina en presentación de 500 mg.
- 2.2.3 Determinar los parámetros de desempeño Exactitud y Precisión para Disolución de tabletas de Ciprofloxacina en presentación de 500 mg.
- 2.2.4 Comparar los parámetros de desempeño para Ensayo y Disolución con los criterios de aceptación especificados en la Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos versión 1 2010 del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).
- 2.2.5 Elaborar un informe final para la asignatura de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos, de los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño Analítico para Ensayo y Disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 CLORHIDRATO DE CIPROFLOXACINA

Monohidrato del ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico, monohidratado; Ciloxan, Cipro.

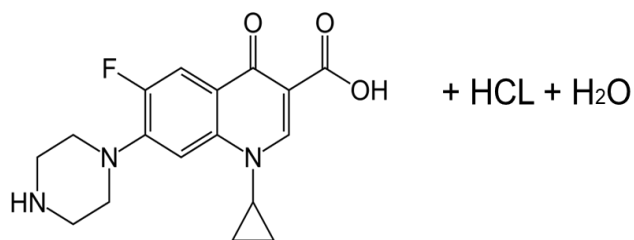


Figura N° 1: Estructura de la molécula de Ciprofloxacin

El Ciprofloxacin contiene no menos de 98.0 por ciento y no más de 102.0 por ciento de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, calculado con respecto a la sustancia seca.

Descripción:

La CIPROFLOXACINA es un agente sintético de la clase de las quinolonas fluorinadas, es empleado como antimicrobiano de amplio espectro para administración oral.

3.1.1 Mecanismo de acción (2):

La acción bactericida de la Ciprofloxacin resulta de la inhibición de las enzimas topoisomerasa II (ADN girasa) y topoisomerasa IV, necesarias para la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano. El mecanismo de acción de las fluoroquinolonas, como la Ciprofloxacin, es diferente al de las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas, por lo tanto, los microorganismos resistentes a estas clases de antibióticos pueden ser susceptibles a este grupo de fármacos.

3.1.2 Farmacología clínica (2):

La Ciprofloxacina se absorbe bien y rápidamente en el tracto gastrointestinal tras la administración oral. La biodisponibilidad absoluta es de aproximadamente el 70% sin pérdida sustancial de metabolismo de primer paso. La unión de Ciprofloxacina a las proteínas séricas es del 20 al 40%. Al administrar junto con alimentos, hay un retraso en la absorción del fármaco sin embargo la absorción total no se ve sustancialmente afectada. Tras la administración oral, la Ciprofloxacina se distribuye ampliamente por todo el cuerpo. La Ciprofloxacina se detecta en forma activa en saliva, secreciones nasales y bronquiales, mucosa de los senos paranasales, esputo, linfa, líquido peritoneal, bilis y secreciones prostáticas. La Ciprofloxacina ha sido detectada en pulmón, piel, grasa, músculo, cartílago y hueso. El fármaco se difunde en el líquido cefalorraquídeo (LCR), sin embargo, las concentraciones en éste generalmente son menos del 10% de las concentraciones séricas máximas. Un 40 a 50% de la dosis por vía oral se excreta en la orina como fármaco sin modificaciones. El aclaramiento renal de la Ciprofloxacina, que es de aproximadamente 300 mL/minuto, es superior a la tasa de filtración glomerular normal de 120 mL/minuto. Por lo tanto, la secreción tubular activa parece desempeñar un papel importante en su eliminación.

3.1.3 Indicaciones (2):

Agente alternativo en el tratamiento de Infecciones causadas por bacterias sensibles a la Ciprofloxacina, localizadas en vías respiratorias, aparato genitourinario, tracto gastrointestinal, vías biliares, osteoarticular y de tejidos blandos y además alternativos en infecciones peritoneales, septicemia y blenorragia.

3.1.4 Posología (2):

Adultos: 500 a 1.500 mg/día, en 2 tomas diarias, entre 5 y 10 días. Blenorragia activa: 1 día de tratamiento. Osteomielitis: Máximo hasta 2 meses, continuando el tratamiento 3 días después de la total desaparición de los signos y síntomas

de la infección. Insuficiencia renal: Con depuración de creatinina de 31 a 60 mL/min/ 1.72 m², 1 g oral; con depuración de creatinina menor a 30 ml, 500 mg por vía oral.

3.1.5 Contraindicaciones y advertencias (2):

Hipersensibilidad a la Ciprofloxacina, embarazo, lactancia y niños. Adminístrese con precaución en pacientes con trastornos cerebrales. Evítese la administración concomitante con antiácidos o teofilina.

3.1.6 Precauciones (2):

No está recomendado en menores de 18 años debido a que ha causado artropatía transitoria en niños; las quinolonas pueden disminuir el umbral convulsivo debido al potencial que tienen para estimular el sistema nervioso central y se debe estar atento a las manifestaciones de este fenómeno como son temblor, inquietud, confusión y raramente alucinaciones o convulsiones en sí mismas; se ha reportado decoloración verdosa de los dientes en neonatos; se ha reportado inflamación y/o ruptura tendinosa con Ciprofloxacina y otras quinolonas, por tanto durante el tratamiento con Ciprofloxacina se deben evitar actividades de alta exigencia física. Las quinolonas pueden exacerbar la miastenia gravis.

3.1.7 Eventos adversos (2):

Se han descrito algunos eventos adversos como náuseas, diarrea pasajera, vómito, dolor abdominal, mareos, cefalea, cansancio, pérdida del sueño, irritabilidad, sudoración, inseguridad en la marcha, crisis convulsiva, estados de angustia, pesadillas, depresión, trastornos visuales, del gusto y del olfato, prurito, fiebre, edema facial, taquicardia paroxística, sofocación, migraña, sensación de debilidad general, eosinofilia, leucopenia, leucocitosis, anemia, trombocitopenia, trombocitosis. La colitis pseudomembranosa ha sido reportada con casi todos los agentes antibacterianos, incluyendo Ciprofloxacina. Por lo tanto, es importante

considerar este diagnóstico en pacientes que presentan diarrea posterior a la administración de agentes antibacterianos, incluyendo Ciprofloxacina.

3.1.8 Interacciones farmacológicas (2):

Aumento del efecto/ tóxico: Aumenta los niveles y el efecto de la ciclosporina, la cafeína, la teofilina y la warfarina. El efecto estimulante del sistema nervioso central de algunas quinolonas puede ser amplificado por antiinflamatorios no esteroideos; foscarnet ha sido asociado con riesgo aumentado de convulsiones al ser usado con quinolonas. Los niveles séricos de algunas quinolonas son aumentados por diuréticos de asa, probenecid y cimetidina (y probablemente otros bloqueadores H2) debido a eliminación renal alterada. Este efecto puede ser más importante para quinolonas con alta eliminación renal que con Ciprofloxacina. El uso concomitante de corticosteroides aumenta el riesgo de ruptura tendinosa. Disminución del efecto: La alimentación enteral puede reducir en > 30% la absorción y las concentraciones plasmáticas de Ciprofloxacina. Productos que contienen aluminio/magnesio, didanosina, quinapril y sucralfato pueden disminuir la absorción en >90% al ser administrados concomitantemente (administrar por lo menos seis horas después de estos fármacos). Productos con calcio, hierro, zinc, y multivitamínicos y minerales pueden disminuir la absorción en forma significativa (administrar dos horas antes o seis horas después). Antineoplásicos también pueden disminuir la absorción.

3.1.9 Embarazo y lactancia (2):

Categoría C: Estudios en animales han mostrado un efecto adverso sobre el feto y no hay estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas, sin embargo, los beneficios permiten utilizar el fármaco a pesar de sus riesgos potenciales. De acuerdo con la FDA (sistema de información de teratógenos), las dosis terapéuticas durante el embarazo son improbables que produzcan algún riesgo teratogénico, pero los datos son insuficientes para decir que no hay riesgo.

3.1.10 Sobredosis (2):

En algunos casos de sobredosis aguda se ha reportado toxicidad renal reversible. Puede lograrse vaciamiento gástrico mediante inducción de vómito o por lavado. El paciente debe ser observado cuidadosamente y se le debe administrar tratamiento de soporte que incluya monitorización de la función renal y administración de antiácidos que contengan magnesio, aluminio o calcio, los cuales pueden reducir la absorción de la Ciprofloxacina. Se debe mantener una hidratación adecuada.

3.1.11 Recomendaciones generales (2):

Almacenar en un lugar seco a temperatura menor a 30°C. Manténgase fuera del alcance de los niños. Medicamento de venta con fórmula médica. No usar este producto una vez pasada la fecha de vencimiento o caducidad.

3.2 Aspectos teóricos de validación y características de desempeño analítico

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias y por comisiones de Farmacopea.

3.2.1 Validación: según RTCA 11.03.39.06, Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

3.2.1 Validación de un procedimiento analítico: Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene los parámetros de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales. Es el proceso de regulación a través del cual se puede medir la calidad real, compararla con las normas o las especificaciones y actuar sobre la diferencia.

3.3 Procedimientos analíticos que son objeto de validación

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.

Categoría III: pruebas fisicoquímicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo, la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.

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

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

Porque validar un método analítico

- **Globalización**
- **Estandarización:** Basados en ICH, USP, ISO etc.
- **Aseguramiento de la calidad:** Productos con calidad.
- **Regulatoria:** Cumplimiento de requisitos indispensables que rigen a los laboratorios.
- **Económicos:** Optimización de los recursos.

El validar métodos analíticos posee muchas ventajas que pueden ser muy beneficiosas:

- Demostrar que los métodos son adecuados para su uso.
- Proporcionar un conocimiento y entendimiento profundo del método analítico.
- Minimizar fallos y repeticiones con lo que se ahorran costos asociados a estos. (económicos)
- Cumplimiento con las exigencias legales (regulatorio).

- Da seguridad y confianza en los resultados obtenidos de los análisis.
- Producto farmacéutico que satisface requisitos previos.
- Desempeño profesional farmacéutico con responsabilidad (moral y ética).

3.4 Cuando deben validarse los métodos analíticos

- Cuando se ha desarrollado un nuevo método.
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Cuando control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.
- Cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico.

Tipos de validación

Considerando antecedentes y las nuevas perspectivas se clasifican en 5 tipos.

- Validación retrospectiva (restringido, acepto anteriormente)
- Validación prospectiva
- Validación concurrente
- Validación de acuerdo de las nuevas perspectivas (cuando ya está dada la validación)
- Validación en tiempo real (verificación continua de la calidad)
- Validación Esbelta.

Validación retrospectiva: establece evidencia documentada de que un sistema o método analítico hace lo que se pretende que debe de hacer en base a la revisión y análisis de información histórica a través de datos analíticos de productos ya comercializados (esta descontinuada, pero se ha utilizado).

Validación prospectiva (ideal hasta hace poco tiempo)

Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un proceso o método analítico hace lo que se pretende que debe hacer en relación a un protocolo previamente planeado el cual comprende todos los criterios que demuestran el buen funcionamiento del método, y se lleva a cabo antes de la comercialización de producto.

Validación concurrente: es el tipo de validación que se realiza simultáneamente que el proceso o método analítico a validar. No es muy recomendable ejercer esta opción ya que posiblemente se tengan que hacer ajustes posteriores y por lo tanto repetirse el proceso de validación.

Validación en tiempo real (verificación continua de la calidad)

Estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto, basado en los resultados obtenidos de lote a lote.

Validación esbelta (de reciente aplicación y conocimiento)

Estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto, basado en resultados que se consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de calidad; centrarse en el control de dichos atributos para garantizar el cumplimiento de las especificaciones.

Para llevar a cabo la validación de un método es necesario:

- Cumplir con las BPM y BPL
- Adecuación del instrumento
- Estado de calificación y calibración
- Adecuación de materiales
- Estado de: estándares de referencia, reactivos y lotes de placebo.
- Calificación de personal, llevar un récord de entrenamiento y seguimiento

- Adecuación de documentación
- PEOS, etc.
- Calificación: es la etapa previa o de preparación de los elementos que intervienen en la validación. Es la evaluación de las características de los elementos del proceso.

Ejemplo: **calificación del instrumento**

Fabricante, modelo y manuales, modificaciones instalación programas de calibración, cronograma de mantenimiento.

Etapas de calificación:

- Calificación de diseño (DQ)
- Calificación de la instalación (IQ)
- Calificación de la operación (OQ)
- Calificación del desempeño (PQ)

CALIBRACION: conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre valores indicados por un instrumento o sistema de medición o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

También se conoce como calibración el procedimiento de comparación entre lo que indica un instrumento y lo que debiera indicar de acuerdo a un patrón conocido, como ejemplo: valor de referencia pH4.00 valor indicado pH4.02, dependiendo del instrumento a veces la calibración incluye un preajuste, por ejemplo, del valor de cero.

La evidencia de toda calibración está plasmada en un **certificado original**.

Instrumentos que se utilizan normalmente en una validación: balanza, pH metro, bureta, detector de espectrofotómetro, detector de un HPLC.

Equipos calificados como: estufas muflas, refrigeradoras etc.

Para llevar a cabo la validación de un método también es necesario:

- A. Adecuación de materiales
- B. Procedimientos analíticos: escritos (métodos documentados) y protocolo apropiado aprobado con criterios de aceptación preestablecidos.
- C. Reactivos y cristalería
- D. Tener perfectamente caracterizado al analítico (integridad de la muestra)
- E. Trabajar con una fórmula definida.
- F. Analistas calificados (experiencia).

3.5 Etapas para realizar la validación de un método analítico

- Definir el uso, el objetivo y el alcance del método analítico a validar.
- Definir el Analito y la concentración.
- Desarrollar un método analítico (previamente aprobado)
- Desarrollar un protocolo de validación.
- Calibrar instrumentos.
- Calificar, entrenar al analista
- Calificación del material.
- Realizar experimentos de pre-validación.
- Ajustar los parámetros de desempeño del método y criterios de aceptación si fuera necesario.
- Realizar experimentos de validación completos.
- Desarrollar el procedimiento para ejecutar el método en el análisis rutinario.
- Documentar el experimento de validación y los resultados en el informe de validación.

Protocolo de validación: Documento que describe pruebas específicas para demostrar que un proceso de resultados que cumplen con los criterios de preestablecidos de manera consistente.

Un protocolo de validación debe contener al menos la siguiente información: identificación única, objetivo, definición del sistema a validar, identificación de los parámetros, diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Debe especificar la o las matrices a evaluar, e método y debe ser firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación.

- Objetivo
- Alcance
- Responsables
- Parámetros a estudiar
- Muestras
- Equipos involucrados en la validación
- Descripción del método analítico:
 - reactivos
 - estándares
 - materiales
 - instrumentación
 - condiciones ambientales
 - medidas de seguridad para el uso de reactivos
 - preparación de reactivos
 - preparación de estándares
 - preparación de la muestra
 - procedimiento
 - cálculos.
- Procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar
- Criterios de aceptación

3.6 Equipos utilizados en la validación de un método analítico o determinación de parámetros de desempeño analítico.

Disolutor

Equipo utilizado principalmente en la prueba de disolución, que mide el porcentaje disuelto de una forma farmacéutica en su mayoría orales (tabletas y capsulas).

La disolución es una prueba fisicoquímica que determina la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interface líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente. Esta prueba se realiza para determinar el cumplimiento de los requisitos de disolución (si estuviera indicado en la monografía individual), de las formas farmacéuticas administradas oralmente.

El procedimiento de disolución requiere un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método suficientemente discriminatorio, tolerante, reproducible día a día y capaz de ser transferido entre laboratorios. El criterio de aceptación debe estar representado por diferentes lotes con igual composición nominal y proceso de manufactura; usualmente son lotes claves usados en estudios piloto y que son representativos de los estudios de estabilidad.

Los resultados de disolución pueden ser considerados altamente variables si la desviación relativa estándar (RSD) es mayor del 20% a tiempos de muestreo de 10 minutos o menos y mayor de 10 % a tiempos mayores.

Sin embargo, la mayoría de resultados de disolución exhiben menor variabilidad que ésta. Se debe investigar la fuente de la variabilidad, las dos causas más frecuentes son la formulación propia (principio activo, excipientes o procesos de manufactura) ó artefactos asociados con el procedimiento de la prueba (adherencia de la tableta a la pared del vaso ó a la canasta).

Las observaciones visuales son a menudo de gran ayuda para entender la fuente de la variabilidad cuando la disolución misma contribuya a la variabilidad. Cuando el contenido de la dosis no se disperse libremente a través del vaso de manera uniforme se pueden obtener datos aberrantes. Dependiendo del problema los remedios usuales incluyen cambio en el tipo de aparato, velocidad de agitación, eliminación de dióxido de carbono, consideración y examinación del tipo de humectador, composición del medio. La modificación del tipo de aparato puede ser de gran ayuda siempre y cuando se justifique y se valide. Algunas causas de variabilidad pueden ser encontradas en la formulación y proceso de manufactura. Por ejemplo, pobre contenido en la uniformidad, inconsistencia en el proceso, reacciones que se llevan a cabo a lo largo de la disolución, interacciones de excipientes e interferencias.

Durante las pruebas de rutina del producto, se deben investigar variaciones de producto fuera del rango desde la perspectiva analítica, de formulación y de proceso.

Aparatos de disolución de la USP

Aparato 1 - Canastilla

Aparato 2 - Paleta

Aparato 3 - Cilindro Oscilante

Aparato 4 - Celda de Flujo Continuo

Aparato 5 - Paleta sobre Disco

Aparato 6 - Cilindro

Aparato 7 - Soporte de Oscilación Vertical

Los aparatos de disolución más empleados son el aparato 1 (método de canastilla) y el aparato 2 (método de paleta).

Los métodos de canastilla y paleta son simples, robustos, estándares, y se usan mundialmente. Estos métodos son suficientemente flexibles para usarse en las pruebas de disolución de una gran variedad de productos farmacéuticos.

Los otros aparatos de la USP o métodos alternativos deben usarse si es necesario basados en la superioridad para un producto/ forma farmacéutica en particular.



Figura N°2 Disolutor Erweka DT6

Cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C)

GENERALIDADES

La cromatografía líquida de alta eficiencia utiliza instrumental muy distinto a la cromatografía líquida "clásica".

En la cromatografía líquida de alta eficiencia se usan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm rellenas de materiales especiales, cuyas partículas tienen un tamaño de 30 a 40 μm . y en ocasiones, hasta 10 μm .

Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece gran resistencia al flujo de la fase móvil o sea una gran caída de presión (hasta 400 atm.) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra sea también pequeña, entre 1 y 10 mg La muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa o válvula de inyección.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporcionan un registro continuo de la composición del líquido que sale, esto permite obtener un registro llamado: **cromatograma**.

El área bajo la señal en el cromatograma es proporcional a la cantidad de soluto contenido en la zona eluída. Un análisis cuantitativo involucra la medición de esta área y el establecimiento de una proporcionalidad.

El área de una señal puede determinarse de varias formas. La más simple es medir su altura, ya que una señal simétrica puede aproximarse a un triángulo y la altura es proporcional a su área.

Este método es rápido y preciso, aunque su exactitud depende del tiempo y que la forma de la señal permanezca constante a medida que la muestra cambia. La otra aproximación es estimar el área como la mitad del producto del ancho por lo alto de la señal; este método también aproxima a un triángulo.

También puede mencionarse el método de pesada, planímetro o lo más moderno, un sistema automático en el cual el área es determinada con una computadora. Conocidos estos métodos de medición de medición de área es

necesario convertir el área a la cantidad o porcentaje del componente en la muestra.

CAMPO DE APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.

Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleídos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órgano metálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas.



Figura N°3 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, serie

1100

Generalidades del espectrofotómetro ultravioleta visible

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

Las ventajas de la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar y eficiente en costo.

El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro Ultravioleta-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

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

Características del sistema

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de Sílice.
- Se utilizan dos lámparas: una de Hidrógeno o Deuterio para la región Ultravioleta, y una de Tungsteno / halógeno para la región visible.
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene sólo solvente.

- La luz pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia.
- El espectrómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia.
- La radiación transmitida es detectada y el espectrómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz que pasa por las celdas.

Aplicaciones del sistema

La espectrometría Ultravioleta-Visible se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

Soluciones de iones metálicos de transición.

Las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos. Por ejemplo, el color de una solución diluida de sulfato de cobre es muy azul; agregando amoníaco se intensifica el color y cambia la longitud de onda de absorción máxima.

Compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de Ultravioleta, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría Ultravioleta-Visible. 50

El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. La tirosina, por ejemplo, aumenta su máximo de absorción y su coeficiente de extinción molar cuando aumenta el pH de 6 a 13, o cuando disminuye la polaridad de los disolventes.

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría Ultravioleta-Visible puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración.

Absorbancia.

La absorbancia A de una solución se define mediante la ecuación:

$$A = -\log T = \log I_0 / I$$

Donde I es la intensidad de la luz con una longitud de onda específica.

I_0 es la intensidad de la luz antes de que entre a la muestra (intensidad de la luz incidente).

Aspectos Cuantitativos de las Mediciones de Absorción Ley de Beer.

La Absorbancia de una especie en solución homogénea es directamente proporcional a su actividad óptica, longitud del paso óptico y su concentración.

Es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.

$$C_{mx} = \frac{A_{mx} \times C_{st}}{A_{st}} \times FD$$

Donde:

Cst: concentración del estándar.

FD: Factor de Dilución de la muestra.

Amx: Absorbancia de la muestra.

Ast: Absorbancia del Estándar.



Figura N°4 Espectrofotómetro Shimadzu Modelo 1800

3.7 Características de desempeño analítico

La validación de un método procedimiento analítico es el proceso en el 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 de considerarse en la validación de los tipos de procedimientos son los siguientes: Exactitud, Precisión, Especificidad, Limite de detección, Limite de cuantificación, Linealidad, Intervalo y Robustez.

3.7.1 Exactitud

Definición: La exactitud de 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.

Determinación: En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido. En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico (spyke) como la comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida. En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan

agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco, pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta relativo) debe ser utilizado siempre que se lo conozca. La exactitud se 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 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 este comprendido dentro de un intervalo definido alrededor de 1.0; o alternativamente, que el valor de la pendiente sea cercano a 1.0. En ambos casos, tanto el intervalo como la definición de cercanía deberían especificarse respectivamente en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad, y del producto. No es aceptable establecer un criterio de aceptación basado en la falta de significancia estadística para la hipótesis nula de que la pendiente es 1.0.

3.7.2 Precisión

Definición: 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 o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de Repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

Determinación: La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas. Los documentos 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 un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba).

3.7.3 Especificidad

Definición: Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. [NOTA—Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) 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 consecuencias:

Pruebas de Identificación: garantizan la identidad del analito.

Pruebas de Pureza: garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, impurezas orgánicas volátiles).

Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permita una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

Determinación 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 analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la

demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

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

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopéico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo, luz, calor, humedad, hidrolisis acida y alcalina, oxidación). En una valoración, deben compararse los resultados; en pruebas de impureza cromatográfica, deben compararse los perfiles de impurezas. Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente.

3.7.4 Límite de detección

Definición: El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, 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 en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Determinación: 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 como candidatos a procedimientos Farmacopéicos oficiales, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. Por el contrario, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo para el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e 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 ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 o 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.

3.7.5 Límite de cuantificación

Definición: 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, como, por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

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

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados como candidatos a procedimientos Farmacopéicos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Por el contrario, debe mostrarse 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 requerido. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0.1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificara de modo confiable el analito a esa concentración. En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos 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 puede 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 debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas a este límite.

3.7.6 Linealidad e intervalo

Definición de Linealidad: 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 en 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, es necesario transformar la concentración y/o la medida. (Notar que los factores de corrección usados en el análisis de regresión pueden cambiar cuando se aplica la transformación.) Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o la recíproca, 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 versus respuesta, ya sea lineal o no lineal.

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

Determinación de Linealidad: La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se debería 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 analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La 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 (por ejemplo, inhaladores de dosis fija).

Para Pruebas de Disolución: +20% por encima del intervalo especificado (por ejemplo, si los criterios de aceptación de un producto de liberación controlada cubren una región que varía de 20% después de 1 hora a 90% después de 24

horas, el intervalo validado sería de 0% a 110% del valor especificado en la etiqueta).

3.7.7 Robustez

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

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

- **Prospectivo:** el trabajo de investigación será de utilidad para el desarrollo de futuros estudios sobre la determinación de parámetros de desempeño analítico y como fuente de información bibliográfica para los estudiantes.
- **Bibliográfico:** se recolectó información de diferentes fuentes bibliográficas, sitios de internet confiables.
- **Experimental:** En la investigación se realizó la evaluación de parámetros de desempeño, en el Laboratorio de Control de Calidad en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.2 Investigación Bibliográfica

Para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo, se realizó una investigación bibliográfica en las siguientes bibliotecas:

- "Dr. Benjamín Orozco" Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador. UES.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Internet.

4.3 Investigación de Campo

Universo: Tabletas de Ciprofloxacina 500 mg comercializadas en San Salvador

Muestra: se adquirieron puntualmente muestras de Tabletas de Ciprofloxacina 500 mg de un Laboratorio Nacional, en un mínimo de 60 tabletas con el mismo número de lote.

Lugar de investigación: en el Laboratorio de la asignatura de Control de Calidad.

4.4 Parte Experimental

La parte experimental consistió en la determinación de parámetros de desempeño analítico para Ensayo y Disolución de Tabletas de Ciprofloxacina 500 mg. Para el Ensayo se determinó las características de desempeño analítico:

Linealidad del método, Linealidad del sistema, Exactitud y Precisión; para la prueba de Disolución se determinaron los parámetros de desempeño analítico: Exactitud y Precisión; tomando como referencia el apartado <1225> de la farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38 NF 33), donde se especifican las categorías de prueba, en las cuales se define cuales parámetros son necesarios para cada determinación (Ensayo y Disolución); siendo Ensayo categoría I, y disolución categoría III. Ver Anexo N° 1.

Material, Equipo y Reactivos utilizados ver anexo N° 2

4.4.1 Prueba de Ensayo

Antes de realizar la determinación de parámetros de desempeño analítico se realizó la prueba de ensayo como lo especifica la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38), para determinar el porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas y así utilizar el dato obtenido para realizar cálculos previos de pesada de materia prima y producto, así como también cálculos de compensación del estándar (Ver Anexo N° 3)

La prueba de ensayo para las tabletas se realizó por triplicado para obtener datos comparativos y poder sacar una media de los datos obtenidos del porcentaje sobre lo rotulado

Condición de análisis y preparación de reactivos para ensayo según monografía de Ciprofloxacina tableta USP 38, NF 33.

1. Preparar el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia con las siguientes Condiciones Cromatografías:
Longitud de onda: 278 nm
Columna: L1 (4.00 mm x 250.00 mm) * (5 µm)
Temperatura: 30 °C
Flujo de Fase Móvil: 1.5 mL/min

2. Preparación de Reactivos (Ver anexo N° 4):

Ácido Fosfórico 0.025 M

Solución A

Solución B

Solución C

Fase móvil

Diluyente

Realización de la prueba de Ensayo de las Tabletas de Ciprofloxacina de 500 miligramos de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos 38 NF 33.

Preparación de la Solución Estándar:

1. Pesar exactamente 232.88 mg de Ciprofloxacina HCl estándar de trabajo (Equivalente a 200.00 mg de Ciprofloxacina Base), realizar cálculos para obtener el 100% de pureza.
2. Transferir a un balón volumétrico de 100.00 mL, agregar diluyente y agitar hasta completa disolución.
3. Llevar a volumen con diluyente y mezclar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL y transferirla a un balón volumétrico de 50.00 mL.
5. Llevar a volumen con diluyente y homogenizar. Esta solución tiene una concentración conocida de 200.00 µg/mL.

Nota: Ver cascada de dilución en Anexo N° 5

Preparación de la Solución de la Muestra:

1. Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas.

2. Transferir una porción de polvo de las tabletas equivalente a 500.00 mg de Ciprofloxacina Base, a un balón volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de diluyente y agitar hasta completa disolución,
3. Llevar a volumen con diluyente y homogenizar.
4. Filtrar y descartar los primeros mililitros del filtrado.
5. Transferir 4.0 mL de la solución anterior a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con diluyente y mezclar.
6. Esta solución tiene una concentración aproximada de Ciprofloxacina de 200.00 µg/mL.

Nota: Ver cascada de dilución en Anexo N° 5

Adecuar las condiciones del Cromatógrafo líquido de alta eficiencia. Inyectar la preparación del estándar para hacer los ajustes necesarios. Inyectar por separado las soluciones estándar y muestras, previamente filtradas por filtro de membrana de 0.45 micras, graficar los cromatogramas correspondientes a cada solución y medir las áreas de los picos.

Cálculos:

Determinación de cantidad de Ciprofloxacina presente en una tableta y porcentaje sobre lo rotulado. cálculos realizados ver Anexo N° 8

Ley de Beer

$$C_{mx} = \frac{A_{mx} \times C_{st}}{A_{st}} \times FD$$

Dónde:

C_{mx}: Cantidad de principio activo

A_{mx}: Área de la muestra

A_{st}: Área del estándar

C_{st}: Concentración del estándar

FD: Factor de dilución de la muestra

Porcentaje sobre lo rotulado

500mg \longrightarrow 100%

Ymg \longrightarrow x

Dónde:

Ymg: cantidad de Ciprofloxacina encontrada en peso muestra aplicando la ley de Beer

x: porcentaje sobre lo rotulado

4.4.1.1 Precisión

Para esta determinación se preparó un nivel de concentración que se realizó por sextuplicado según lo específica la International Conference of Harmonisation (ICH), se realizó la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos se utilizaron para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de variación del porcentaje de recobro, Coeficiente de Variación de Repetibilidad y Coeficiente de Variación de Reproducibilidad.

Se realizó la prueba de ensayo tal como se describe en la página 53.

Procedimiento

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo.
4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (estándar secundario) según cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina (ver anexo N° 3).
5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, prepara una solución con concentración final de 200.00 µg/mL
6. Llevar a cabo la prueba de inyección (como se describe en la página 55)

7. Realizar por sextuplicado los procedimientos, del paso 3 al paso 6.
8. Calcular, S Y CV de la respuesta analítica.
9. Criterios de aceptación:
CV \leq 1.5 % Valores superiores deben ser justificables
10. Fórmulas para calcular la precisión de sistema

Desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum |\bar{X} - X_i|^2}}{n - 1}$$

Siendo:

X = valor promedio de Xi

Xi= representa cada uno de los valores individuales

S = respuesta

n = tamaño de la muestra

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

4.4.1.2 Exactitud

Para esta determinación se preparó un nivel de concentración realizado por sextuplicado según lo específica la International Conference of Harmonisation (ICH), se realizó la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos se utilizaron para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: intervalo de confianza para la media poblacional $IC_{(\mu)}$, promedio aritmético, coeficiente de variación.

Se realizó la prueba de ensayo tal como se describe en la página 53.

Procedimiento

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo (numeral 2.4.1.).
4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (estándar secundario) según cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina (ver anexo N° 3).
5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, prepara una solución con concentración final de 200 µg/mL
6. Llevar a cabo la prueba de inyección (como se describe en la página 55)
7. Realizar por sextuplicado los procedimientos, del paso 3 al paso 6.
8. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV), y el intervalo de confianza para la población (IC_(µ)) del porcentaje de recobro.
9. Criterios de aceptación

El porcentaje de recobro para métodos cromatográficos 98 – 102%

El coeficiente de variación (RSD) para métodos cromatográficos < 2%

El IC (µ) debe incluir el 100%

10. Fórmulas para calcular la exactitud ⁽¹⁰⁾

Media aritmética:

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

Dónde:

y = Media aritmética

y = Valores obtenidos del ensayo

n = Número de mediciones o recobros, muestras o determinaciones.

Desviación estándar:

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

Dónde:

S = Desviación estándar

y = Valores obtenidos del ensayo

n = Número de mediciones o recobros o muestras o determinaciones

4.4.1.3 Linealidad del Sistema

Para esta determinación se prepararon cinco niveles de concentración realizados por triplicado, según lo especifica la International Conference of Harmonisation (ICH), se realizó la prueba de ensayo, y los 15 datos obtenidos se utilizaron para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = mx+b$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf).

Procedimiento:

1. Preparar 5 niveles de concentración los cuales serán: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. (Ver Anexo N° 6).
2. Una vez preparadas las soluciones se adecuaron las condiciones del Cromatógrafo líquido de alta eficiencia. (como se describe en la página 53)
3. Filtrar las soluciones con un filtro de membrana de 0.45 μm .
4. Llevar a cabo la prueba de ensayo (como se describe en la página 53)
5. Con las áreas obtenidas, calcular: Coeficiente de Correlación, Coeficiente de determinación, ecuación de la recta y coeficiente de variación del factor de respuesta, Intervalo de Confianza.
6. Criterios de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1), intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el cero

Criterios diferentes deben ser justificados.

7. Fórmulas para calcular el Linealidad del sistema ⁽¹⁰⁾

Coeficiente de determinación:

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

Ecuación de la recta:

$$Y = mX + b$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

Intervalo de confianza:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S b_1$$

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S b_0$$

4.4.1.4 Linealidad del Método

Para realizar la prueba de Linealidad del Método, se utilizaron los datos obtenidos de porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas de Ciprofloxacina en la prueba de ensayo (numeral 4.4.1). Para esta determinación se prepararon 3 niveles de

concentración que se realizaron por triplicado, se realizó la prueba de ensayo, y los 9 datos obtenidos se utilizaron para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = mx+b$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), Intervalo de confianza.

Procedimiento:

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo (numeral 2.4.1.).
4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (estándar secundario) según cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina (ver anexo N° 3).
5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 100.00 $\mu\text{g/mL}$ siendo este el primer nivel de concentración.
6. Llevar a cabo la prueba de ensayo (como se describe en la página 53)
7. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 200.00 $\mu\text{g/mL}$; siendo este el segundo nivel de concentración.
8. Llevar a cabo la prueba de ensayo (como se describe en la página 53)
9. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 300.00 $\mu\text{g/mL}$; siendo este el tercer nivel de concentración.
10. Llevar a cabo la prueba de ensayo (como se describe en la página 53)
11. Criterios de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1), intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad

IC(β_0), intervalo de confianza para la ordenada debe incluir el cero

Criterios diferentes deben ser justificados.

12. Fórmulas para calcular la Linealidad del Método (10)

Coeficiente de determinación:

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

Ecuación de la recta:

$$Y = mX + b$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

\bar{y} = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

Intervalo de confianza:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S b_1$$

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S b_0$$

Nota: las cascadas de dilución para obtener las concentraciones de 100.00 $\mu\text{g/mL}$, 200.00 $\mu\text{g/mL}$ y 300.00 $\mu\text{g/mL}$, se muestran en el Anexo N° 7.

4.4.2 Disolución

Para la determinación de parámetros de desempeño analítico para la prueba de disolución, primero se realizó la prueba de Disolución como se especifica en la monografía de Ciprofloxacina tableta de 500 mg. Según la Farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38); se determinó para la prueba de Disolución: Exactitud y Precisión utilizando un nivel de concentración, según la especificación de International Conference of Harmonisation (ICH).

Realización de la prueba de Disolución de las Tabletas de Ciprofloxacina de 500 miligramos de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos 38 NF 33.

Condiciones de Disolución:

- **Aparato:** 2 (paleta)
- **Medio:** Ácido Clorhídrico 0.01 N
- **Volumen:** 900 mL
- **Temperatura:** 37 °C
- **Velocidad:** 50 rpm
- **Tiempo:** 30 minutos
- **Criterio de Aceptación:** no menos del 80% (Q) de la cantidad rotulada de Ciprofloxacina se disuelve en 30 minutos.

Condiciones Espectrofotométricas:

Longitud de onda: 276 nm

Reactivos:

- Ciprofloxacina HCl estándar de trabajo
- Ácido Clorhídrico 0.01 N (preparación ver anexo N° 4)

Preparación del estándar:

1. Pesar exactamente alrededor de 64.68 mg de Ciprofloxacina clorhidrato estándar de trabajo (equivalente a 55.56 mg de Ciprofloxacina base).

2. Transferir a un balón volumétrico de 100 mL.
3. Agregar medio de disolución y agitar hasta completa disolución.
4. Luego llevar a volumen con medio de disolución.
5. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un balón volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con medio de disolución. Esta es la preparación del estándar y tiene una concentración conocida de 5.56 $\mu\text{g/mL}$ de Ciprofloxacina.

Nota: Ver cascada de dilución en Anexo N° 5

Preparación de las muestras:

1. Colocar 1 tableta recubierta en cada vaso del Disolutor, conteniendo 900 mL de medio de disolución, teniendo cuidado de excluir burbujas de aire de la superficie de la unidad de dosificación.
2. Inmediatamente operar el aparato a las revoluciones especificadas.
3. Transcurrido el intervalo de tiempo especificado de duración de la prueba, (30 minutos), tomar la muestra de la zona media entre la superficie del medio de disolución y el fondo del vaso a no menos de 1 cm de la pared del vaso.
4. Filtrar la muestra a través de papel whatman N°.1.
5. De la solución filtrada transferir 1.0 mL a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con medio de disolución y mezclar, esta es la preparación de la muestra y tiene una concentración estimada en 5.56 $\mu\text{g/ mL}$ de Ciprofloxacina.

Nota: Ver cascada de dilución en Anexo N° 5

Procedimiento:

Concomitantemente determinar en un espectrofotómetro las absorbancias de las soluciones muestra y estándar a una longitud de onda de 276 nm, utilizando medio de disolución como blanco para ajustar a cero unidades de absorbancia del equipo.

Cálculos:

Determinación de cantidad de Ciprofloxacina disuelta de cada unidad de dosis según formula:

Ley de Beer

$$C_{mx} = \frac{A_{mx} \times C_{st}}{A_{st}} \times FD$$

Dónde:

Cmx: Concentración de la muestra

Cst: Concentración del estándar

Amx: Absorbancia de la muestra

Ast: Absorbancia del estándar

FD: Factor de dilución de la muestra

Porcentaje sobre lo rotulado

500mg —————> 100%

Ymg —————> x

Dónde:

Ymg: cantidad de Ciprofloxacina por tableta, encontrada con la ley de Beer

x: porcentaje sobre lo rotulado

4.4.2.1 Precisión (Repetibilidad)

Para la determinación de parámetros de desempeño Precisión, se utilizaron 6 tabletas individuales para realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina según Farmacopea de los Estados Unidos, se realizó la prueba y se determinó el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.

Se realizó la prueba de Disolución tal como se describe en la página 63.

Procedimiento

- 1) Pesar 6 tabletas individuales de Ciprofloxacina 500 mg
- 2) Realizar la prueba de Disolución como lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos.
- 3) Determinar mediante cálculos el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas.
- 4) Promediar el porcentaje sobre lo rotulado para registrar el dato y conocer el nivel de concentración en el que se trabajó.
- 5) Calcular, S Y CV de la respuesta analítica.
- 6) Criterios de aceptación

$$CV \leq 3\%$$

- 7) Fórmulas para calcular Precisión (10)

Desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum |X - \bar{X}|^2}}{n - 1}$$

Siendo:

X = valor promedio de Xi

Xi= representa cada uno de los valores individuales

S = respuesta

n= tamaño de la muestra

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

- 8) Realización de análisis de resultados para confirmar si este parámetro de desempeño cumple o no cumple según los criterios de aceptación ⁽¹⁰⁾ y declararlo en el informe de resultados (ver página 112)

4.4.2.2 Exactitud

Para la determinación de parámetro de desempeño Exactitud, se prepararon 6 tabletas individuales para realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos, se realizó la prueba y se determinó el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.

Se realizó la prueba de Disolución tal como se describe en la página 63.

Procedimiento

1. Pesar 6 tabletas individuales de Ciprofloxacina 500 mg
2. Realizar la prueba de Disolución como lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos.
3. Determinar mediante cálculos el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas.
4. Promediar el porcentaje sobre lo rotulado para registrar el dato y conocer el nivel de concentración en el que se trabajó.
5. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV), y el intervalo de confianza para la población ($IC_{(\mu)}$) del porcentaje de recobro.
6. Criterios de aceptación
 - El porcentaje de recobro para métodos espectrofotométricos 97 – 103%
 - El coeficiente de variación (RSD) para métodos cromatográficos < 3%
 - El IC (μ) debe incluir el 100%

7. Fórmulas para calcular exactitud (10)

Desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum |\bar{X} - X_i|^2}}{n-1}$$

Siendo:

X = valor promedio de Xi

Xi= representa cada uno de los valores individuales

S = respuesta

n= tamaño de la muestra

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

Intervalo de confianza:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975, n-2} S b_1$$

$$IC_{(b_0)} = b_0 \pm t_{0,975, n-2} S b_0$$

8. Realización de análisis de resultados para confirmar si este parámetro de desempeño cumple o no cumple según los criterios de aceptación (10) y declararlo en el informe de resultados (ver página 112)

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



5.1 Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico para ensayo y disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.

Se elaboró un protocolo en el que incluye un encabezado en todas las páginas que contiene el nombre del documento, que para el caso es: PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA DE 500 mg.

También contiene el número de revisión, 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, concentración y forma farmacéutica.

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

A continuación, se presenta la propuesta del protocolo de validación para la Determinación de Parámetros de Desempeño Analítico

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 1 de 18

1. OBJETIVO

Efectuar la determinación de parámetros de desempeño analítico para ensayo de tabletas de ciprofloxacina 500 mg. Así mismo determinar que la técnica analítica utilizada es apropiada y confiable para el propósito que ha sido diseñada.

2. ALCANCE

Técnica analítica para la Valoración de Pureza de Ciprofloxacina 500 mg por el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.



3. RESPONSABLES

3.1 Bachiller Jorge Alberto Escobar de la ejecución de este protocolo

3.2 Coordinador de la asignatura de Control de Calidad, velar por el cumplimiento.

PARAMETROS A ESTUDIAR

Parámetro	Análisis de datos	Criterios de aceptación
Precisión	Desviación estándar (S)	
	Coeficiente de variación (CV)	CV ≤ 2%
Exactitud	Porcentaje de recobro	98% - 102%
	Desviación estándar (S)	
	Coeficiente de variación (CV)	< 2%
	Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 2 de 18



Linealidad del sistema	Pendiente (m)	
	Intercepto (b)	
	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98\%$
	Intervalo de confianza para la pendiente ($IC\beta_1$)	IC para pendiente no debe incluir el cero
	Coeficiente de variación (CV) Y/X	< 2%
Linealidad del método	Intervalo de confianza para la pendiente ($IC\beta_1$)	IC para pendiente debe incluir la unidad
	Intervalo de confianza para la ordenada ($IC\beta_0$)	IC para ordenada debe incluir el cero
	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98\%$
	Desviación estándar (S)	
	Intercepto	

MUESTRAS

Para el análisis de Ciprofloxacina 500 mg no existió ningún tratamiento previo a la muestra para realizar el análisis.

EQUIPOS INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION

- PHmetro
- Balanza analítica SHIMADZU AUY2200
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, serie 1100

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 3 de 18
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

DESCRIPCIÓN DEL METODO ANALITICO



La parte experimental consiste en determinación de parámetros de desempeño analítico para Ensayo de Tabletas de Ciprofloxacina 500 mg. Se determinan los parámetros de desempeño analítico: Linealidad del método, Linealidad del sistema, Exactitud y Precisión; tomando como referencia el apartado <1225> de la farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38 NF 33), donde se especifican las categorías de prueba, en las cuales se define cuales parámetros son necesarios para la determinación (Ensayo); siendo Ensayo categoría I.

Prueba de Ensayo

Antes de realizar la determinación de parámetros de desempeño analítico se realiza la prueba de ensayo como lo especifica la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38), para determinar el porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas y así utilizar el dato obtenido para realizar cálculos previos de pesada de materia prima y producto, así como también cálculos de compensación.

Precisión

Para esta determinación se prepara un nivel de concentración que se realiza por sextuplicado según lo especifica la International Conference of Harmonisation (ICH), se realiza la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos se utilizan para

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 4 de 18

cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de variación del porcentaje de recobro, Coeficiente de Variación de Repetibilidad y Coeficiente de Variación de Reproducibilidad.

Exactitud



Para esta determinación preparar un nivel de concentración y realizar por sextuplicado la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos utilizarlos para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: intervalo de confianza para la media poblacional $IC_{(\mu)}$, promedio aritmético, coeficiente de variación.

Linealidad del Sistema

Para esta determinación preparar cinco niveles de concentración y realizar por triplicado, la prueba de ensayo haciendo uso del estándar, y los 15 datos obtenidos se utilizarlos para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = mx+b$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf).

Linealidad del Método

Para realizar la prueba de Linealidad del Método, utilizar los datos obtenidos de porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas de Ciprofloxacina en la prueba de ensayo. Para esta determinación se preparar 3 niveles de concentración y realizarlos por triplicado, realizar la prueba de ensayo, y los 9 datos obtenidos se

	<p align="center">Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.</p>	
<p>Revisión: 0</p>	<p>Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33</p>	<p>Página: 5 de 18</p>

utilizarlos para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = mx+b$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), Intervalo de confianza.

- REACTIVOS

Agua destilada
 Agua desmineralizada
 Ácido fosfórico 0.025M
 Trietilamina
 Acetonitrilo HPLC
 Agua HPLC

- ESTANDARES

Estándar de trabajo de Ciprofloxacina al 100.8%

- INSTRUMENTACION

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, serie 1100

- CONDICIONES AMBIENTALES



Condiciones ambientales normales, temperaturas no controladas

- MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA EL USO DE REACTIVOS

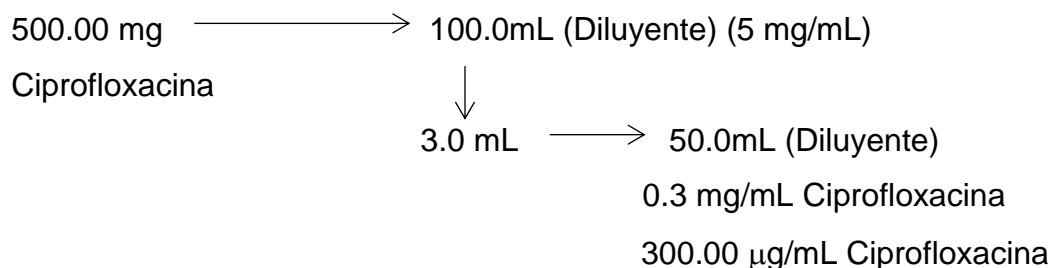
Uso obligatorio de equipo de protección personal: guantes, mascarilla para gases, gafas, gabacha.

- PREPARACION DE REACTIVOS

Fase móvil:

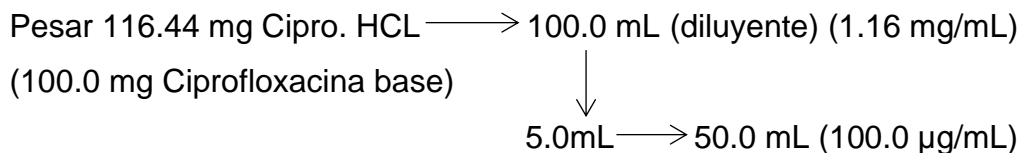
	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 7 de 18

3. Para 300.00 µg/mL (solución al 150%)

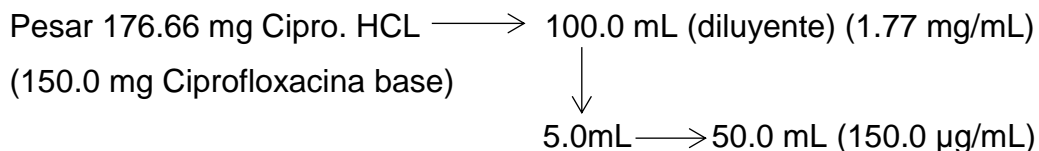


Cascadas de dilución utilizadas para linealidad del sistema en ensayo

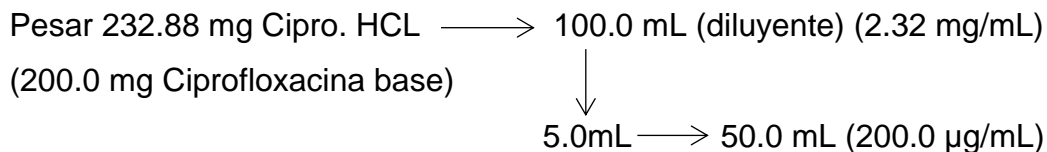
Solución al 50%





Solución al 75%



Solución al 100%



	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 8 de 18

Solución al 125%

Pesar 291.11 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (2.91 mg/mL)
 (250.0 mg Ciprofloxacina base)

\downarrow
 5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (250.0 μ g/mL)

Solución al 150%



Pesar 349.33 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (3.49 mg/mL)
 (300.0 mg Ciprofloxacina base)

\downarrow
 5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (300.0 μ g/mL)

- CALCULOS

Cálculos para 5 niveles de concentración utilizados para ensayo en linealidad del sistema y cálculos de compensación de Ciprofloxacina HCl a Ciprofloxacina Base

Los niveles utilizados serán: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. La concentración o nivel utilizado como 100% será 200.00 μ g/mL, dicha concentración es la especificada en la prueba de ensayo en la monografía USP de Ciprofloxacina Tableta. (ver anexo N° 5)

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 9 de 18
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

Cálculos:

1. Nivel de concentración al 50%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc} 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\ x & \longrightarrow & 50\% \end{array}$$

$$X = 100.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal	Base
385.82 g/mol	331.34 g/mol
X	100.00 mg
	x = 116.44 mg



2. Nivel de concentración al 75%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc} 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\ x & \longrightarrow & 75\% \end{array}$$

$$X = 150.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal	Base
385.82 g/mol	331.34 g/mol
x	150.00 mg
	x = 174.66 mg

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 10 de 18

3. Nivel de concentración al 100%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc}
 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\
 x & \longrightarrow & 100\%
 \end{array}$$

$$X = 200.00 \mu\text{g/mL}$$



$$\begin{array}{ccc}
 \text{Sal} & & \text{Base} \\
 385.82 \text{ g/mol} & \longrightarrow & 331.34 \text{ g/mol} \\
 x & \longrightarrow & 200.00 \text{ mg} \\
 & & x = 232.88 \text{ mg}
 \end{array}$$

4. Nivel de concentración al 125%,

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc}
 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\
 x & \longrightarrow & 125\%
 \end{array}$$

$$X = 250.00 \mu\text{g/mL}$$

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 11 de 18
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	250.00 mg
x = 291.11 mg		

5. Nivel de concentración al 150%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.



200.00 µg/mL	→	100%
x	→	150%

$$X = 300.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	300.00 mg
x = 349.33 mg		

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS A EVALUAR.

Antes de realizar la determinación de parámetros de desempeño analítico se realizará la prueba de ensayo como lo especifica la monografía de la Farmacopea

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 12 de 18
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

de los Estados Unidos 38 (USP 38), para determinar el porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas y así utilizar el dato obtenido para realizar cálculos previos de pesada de materia prima y producto, así como también cálculos de compensación.



La prueba de ensayo para las tabletas se realizará por triplicado para obtener datos comparativos y poder sacar una media de los datos obtenidos del porcentaje sobre lo rotulado.

Precisión

Para esta determinación se preparan un nivel de concentración y realizarlo por sextuplicado según lo especifica la International Conference of Harmonisation (ICH), realizar la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos se utilizarlos para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de variación del porcentaje de recobro, Coeficiente de Variación de Repetibilidad y Coeficiente de Variación de Reproducibilidad.

Procedimiento

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo.

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 13 de 18

4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (realizar cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina).
 5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, prepara una solución con concentración final de 200.00 µg/mL
 6. Llevar a cabo la prueba de ensayo.
 7. Realizar por sextuplicado los procedimientos, del paso 3 al paso 6.
- Calcular, S y CV de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación:

CV ≤ 1.5 % Valores superiores deben ser justificables

Fórmulas para calcular la precisión de sistema

Desviación estándar:

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

Siendo:



X = valor promedio de Xi

Xi= representa cada uno de los valores individuales

S = respuesta

n = tamaño de la muestra

Coeficiente de variación:

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 14 de 18

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética

CV = Coeficiente de Variación



S = Desviación estándar

Exactitud

Para esta determinación preparar un nivel de concentración y realizar por sextuplicado la prueba de ensayo, y los 6 datos obtenidos se utilizarlos para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$, promedio aritmético, coeficiente de variación.

Procedimiento

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo.
4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (realizar cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina)

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 15 de 18

5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, prepara una solución con concentración final de 200 µg/mL
6. Llevar a cabo la prueba de ensayo.
7. Realizar por sextuplicado los procedimientos, del paso 3 al paso 6.
8. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV), y el intervalo de confianza para la población ($IC_{(\mu)}$) del porcentaje de recobro.
9. Fórmulas para calcular la exactitud.

Media aritmética:

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

Dónde:

y = Media aritmética



y = Valores obtenidos del ensayo

n = Número de mediciones o recobros, muestras o determinaciones.

Desviación estándar:

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

Dónde:

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 16 de 18

S = Desviación estándar

y = Valores obtenidos del ensayo



n = Número de mediciones o recobros o muestras o determinaciones.

Linealidad del Sistema

Para esta determinación se preparan cinco niveles de concentración que se realizan por triplicado, se realiza la prueba de ensayo, y los 15 datos obtenidos se utilizan para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = mx+b$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf).

Procedimiento:

1. Se prepararán 5 niveles de concentración los cuales serán: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%.
2. Una vez preparadas las soluciones adecuar las condiciones del Cromatógrafo líquido de alta eficiencia.
3. Filtrar las soluciones con un filtro de membrana de 0.45 μm .
4. Inyectar la primera muestra para hacer los ajustes necesarios, (tiempo de retención de Ciprofloxacina).
Una vez realizados los ajustes, proceder a inyectar todas las soluciones preparadas.
5. Graficar los cromatogramas correspondientes a cada solución y medir las áreas de los picos.

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 17 de 18
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	



6. Con las áreas obtenidas, calcular: Coeficiente de Correlación, Coeficiente de determinación, ecuación de la recta y coeficiente de variación del factor de respuesta, Intervalo de Confianza.

Linealidad del Método



Para realizar la prueba de Linealidad del Método, se utilizan los datos obtenidos de porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas de Ciprofloxacina en la prueba de ensayo. Para esta determinación se preparan 3 niveles de concentración que se realizan por triplicado, se realiza la prueba de ensayo, y los 9 datos obtenidos se utilizarán para cálculos posteriores y determinaciones específicas como: coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta ($y = bx+a$), Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), Intervalo de confianza.

Procedimiento:

1. Pesar 20 tabletas y obtener el peso promedio.
2. Pulverizar las 20 tabletas utilizando mortero y pistilo.
3. Del polvo obtenido en el paso 2 pesar el equivalente a 250 mg de Ciprofloxacina base tomando en cuenta el promedio del porcentaje sobre lo rotulado obtenido en la prueba de ensayo.
4. A la cantidad pesada del paso 3, incorporar 250 mg exactos de Ciprofloxacina Base (realizar cálculos de compensación para obtener Ciprofloxacina base a partir de clorhidrato de Ciprofloxacina).

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 18 de 18

5. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 100.00 $\mu\text{g/mL}$ siendo este el primer nivel de concentración.
6. Llevar a cabo la prueba de ensayo.
7. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 200.00 $\mu\text{g/mL}$; siendo este el segundo nivel de concentración.
8. Llevar a cabo la prueba de ensayo
9. Con el peso muestra obtenido en el paso 4, preparar tres soluciones con concentración final de 300.00 $\mu\text{g/mL}$; siendo este el tercer nivel de concentración.
10. Llevar a cabo la prueba de ensayo.

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 1 de 8

4. OBJETIVO

Efectuar la determinación de parámetros de desempeño analítico para disolución de tabletas de ciprofloxacina 500 mg. Así mismo determinar que la técnica analítica utilizada es apropiada y confiable para el propósito que ha sido diseñada.

5. ALCANCE

Técnica analítica para la Disolución de Ciprofloxacina 500 mg tableta recubierta por el método de Espectrofotometría Ultravioleta -Visible.



6. RESPONSABLES

6.1 Bachiller Jorge Alberto Escobar de la ejecución de este protocolo

6.2 Coordinador de la asignatura de Control de Calidad, velar por el cumplimiento.

PARAMETROS A ESTUDIAR

Parámetro	Análisis de datos	Criterios de aceptación
Disolución	Desviación estándar (S)	
	Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%
	Coeficiente de variación (CV)	CV \leq 3%
Exactitud	Porcentaje de recobro desviación estándar (S)	97% - 103%
	Coeficiente de variación (CV)	< 3%
	Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 2 de 8
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

MUESTRAS

Para el análisis de Ciprofloxacina 500 mg no existió ningún tratamiento previo a la muestra para realizar el análisis.

EQUIPOS INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION



- PHmetro
- Balanza analítica SHIMADZU AUY2200
- Disolutor Erweka DT6
- Espectrofotómetro Shimadzu Modelo 1800.

DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO

La parte experimental consiste en determinación de parámetros de desempeño analítico para Disolución de Tabletas de Ciprofloxacina 500 mg. se determinarán las características de desempeño analítico: Exactitud y Precisión; tomando como referencia el apartado <1225> de la farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38 NF 33), donde se especifican las categorías de prueba, en las cuales se define cuales parámetros son necesarios para la determinación (Disolución); siendo Disolución categoría III.

Prueba de Disolución

Para determinación de parámetros de desempeño analítico para la prueba de disolución, primero se realiza la prueba de Disolución como se especifica en la

	<p align="center">Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.</p>	
<p align="center">Revisión: 0</p>	<p>Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33</p>	<p align="center">Página: 3 de 8</p>

monografía de Ciprofloxacina tableta de 500 mg. Según la Farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38); se determina para la prueba de Disolución: Exactitud y Precisión utilizando un nivel de concentración, según la especificación de International Conference of Harmonisation (ICH).

Precisión (Repetibilidad)

Para la determinación del parámetro de desempeño Precisión, se utilizar 6 tabletas individuales para realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos, se realizará la prueba y se determinara el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.



Exactitud

Para la determinación del parámetro de desempeño Exactitud, preparar 6 tabletas individuales y realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos, realizar la prueba y determinar el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.

- REACTIVOS

Ácido Clorhídrico 0.01 N

Agua destilada

	<p align="center">Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.</p>	
<p>Revisión: 0</p>	<p>Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33</p>	<p>Página: 4 de 8</p>

Agua desmineralizada

- **ESTANDARES**

Estándar de trabajo de Ciprofloxacina al 100.8%

- **INSTRUMENTACION**

Disolutor Erweka DT6

Espectrofotómetro Shimadzu Modelo 1800

- **CONDICIONES AMBIENTALES**

Condiciones ambientales normales, temperaturas no controladas



- **MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA EL USO DE REACTIVOS**

Uso obligatorio de equipo de protección personal: guantes, mascarilla para gases, gafas, gabacha.

- **PREPARACION DE REACTIVOS**

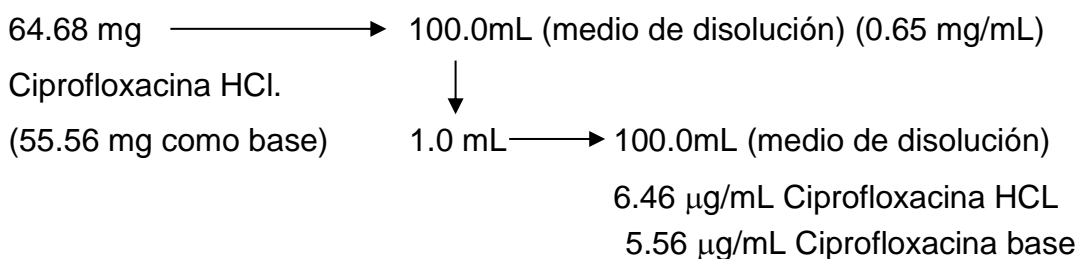
Medir 8.5 mL de Ácido clorhídrico concentrado y agregarlos con cuidado a un frasco volumétrico de 1000 mL conteniendo 500 mL de Agua desmineralizada, aforar a volumen con Agua desmineralizada y homogenizar.

Pipetear 50.0 mL de la solución anterior y transferirlos a un balón volumétrico de 500 mL, aforar a volumen con el mismo diluyente.

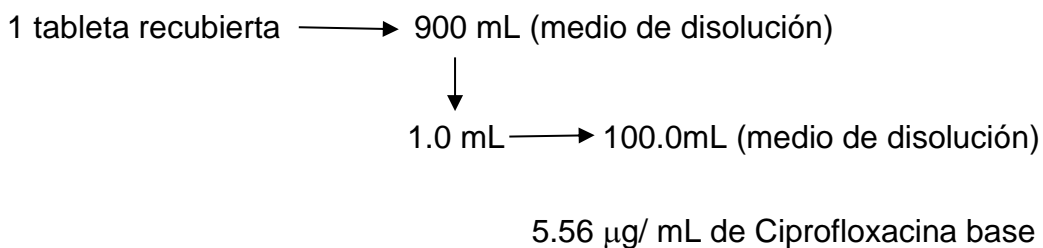
	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina Concentración: 500 mg. Forma farmacéutica: Tableta Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	Página: 5 de 8

CASCADAS DE DILUCION

Cascada de diluciones de la preparación del estándar:





Cascada de diluciones de la preparación de las muestras para la disolución:



Prueba de Disolución

Para la determinación de parámetros de desempeño analítico para la prueba de disolución, primero realizar la prueba de Disolución como se especifica en la monografía de Ciprofloxacina tableta de 500 mg. Según la Farmacopea de los Estados Unidos 38 (USP 38); se determina para la prueba de Disolución:

	<p align="center">Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.</p>	
<p>Revisión: 0</p>	<p>Principio activo: Ciprofloxacina</p>	<p>Página: 6 de 8</p>
	<p>Concentración: 500 mg.</p>	
	<p>Forma farmacéutica: Tableta</p>	
	<p>Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33</p>	



Exactitud y Precisión utilizando un nivel de concentración, según la especificación de International Conference of Harmonisation (ICH).

Precisión (Repetibilidad)

Para la determinación del parámetro de desempeño Precisión, utilizar 6 tabletas individuales y realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos, se realiza la prueba y se determina el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.

Procedimiento

1. Pesar 6 tabletas individuales de Ciprofloxacina 500 mg
2. Realizar la prueba de Disolución como lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos.
3. Determinar mediante cálculos el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas.
4. Promediar el porcentaje sobre lo rotulado para registrar el dato y conocer el nivel de concentración en el que se trabajó.
5. Calcular, S Y CV de la respuesta analítica.

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 7 de 8
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum |X - \bar{X}|^2}{n - 1}}$$

Siendo:

X = valor promedio de Xi

Xi= representa cada uno de los valores individuales

S = respuesta

n= tamaño de la muestra

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

y = Media aritmética



CV = Coeficiente de Variación

S = Desviación estándar

- Realización de análisis de resultados para confirmar si este parámetro de desempeño cumple o no cumple según los criterios de aceptación

Exactitud

Para la determinación del parámetro de desempeño Exactitud, preparar 6 tabletas individuales y realizar la prueba de Disolución según lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados

	Protocolo de evaluación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tabletas de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Revisión: 0	Principio activo: Ciprofloxacina	Página: 8 de 8
	Concentración: 500 mg.	
	Forma farmacéutica: Tableta	
	Referencia bibliográfica: USP 38. NF 33	

Unidos, realizar la prueba y determinar el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado para poder especificar el nivel de concentración a la cual se han realizado las lecturas.

Procedimiento

1. Pesar 6 tabletas individuales de Ciprofloxacina 500 mg
2. Realizar la prueba de Disolución como lo especifica la monografía de Ciprofloxacina de 500 mg según Farmacopea de los Estados Unidos.
3. Determinar mediante cálculos el porcentaje disuelto y porcentaje sobre lo rotulado de las tabletas.
4. Promediar el porcentaje sobre lo rotulado para registrar el dato y conocer el nivel de concentración en el que se trabajó.
5. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV), y el intervalo de confianza para la población ($IC_{(\mu)}$) del porcentaje de recobro.
6. Realización de análisis de resultados para confirmar si este parámetro de desempeño cumple o no cumple según los criterios de aceptación.

5.2 Resultados de Evaluación de parámetros de desempeño analítico Precisión, Exactitud, y Linealidad para Ensayo de tabletas de Ciprofloxacina en presentación de 500 mg.

5.2.1 Precisión (repetibilidad)

La precisión es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas; para este caso de evaluación se analizó la repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

En la tabla N° 1 se muestran los resultados estadísticos del análisis de 6 inyecciones de muestra. Ver datos obtenidos en anexo N° 9

Tabla N° 1. Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Precisión (repetibilidad) en el ensayo.

Criterios	Resultados
Sumatoria	117062.30
Promedio	19510.3833
Desvest	216.61113
CV	1.11023513

Luego de obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo, donde se puede observar el resultado del coeficiente de variación: 1.11%, el resultado requerido debe de ser menor o igual a 2.0%. según requerimiento del protocolo de Evaluación de características de desempeño para repetibilidad por lo tanto hay un cumplimiento a esta característica.

Además, se puede notar que si hay concordancia entre los resultados obtenidos de las muestras individuales en las condiciones del estudio.

5.2.2 Exactitud

La evaluación práctica de la Exactitud (veracidad) se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia.

En la exactitud del método se evalúa el porcentaje de la cantidad añadida versus la cantidad recuperada. En la tabla N° 2 se presentan los resultados estadísticos en la evaluación de este parámetro de validación como un cuadro resumen. Ver datos obtenidos en anexo N° 9

Tabla N° 2. Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Exactitud en el ensayo.

Criterios	Resultado
Sumatoria	610.44
Promedio	101.74
Desvest	0.83
CV	0.82
Icu	102.61
	100.08

Luego de obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo.

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 la tabla N° 2 que se cumple la especificación previamente establecida en el protocolo de evaluación.

También se especifica que el coeficiente de variación de la respuesta sea menor o igual a 2.0% por ser un método cromatográfico; podemos ver en el cuadro N° 2 que se cumple la especificación previamente establecida en el protocolo de

evaluación de características de desempeño para Exactitud, es decir existe proximidad entre los datos y su valor verdadero.

5.2.3 Linealidad del sistema

Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al método matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la monografía analítica.

En linealidad del sistema se relaciona la concentración versus la respuesta analítica; en la tabla N° 3 se presentan los resultados estadísticos en la evaluación de este parámetro de validación como un cuadro resumen. Ver datos obtenidos en anexo N° 9

Tabla N° 3. Resultados estadísticos de la evaluación de Linealidad del sistema en el ensayo.

Criterios	Resultado
Sumatoria	1516.39
Promedio	101.09
Desvest.	1.73
CV	1.72
r^2	1
n-2	13
n	15
b1	125228.81
b0	-6355.79
Sy/x	674.75
Sb1	2752.98
Sb0	566.79
CVy/x	3.59
IC%rec	0.24187252 0.16105399
Icb1	131175.25 119282.37
Icb0	-5131.53 -7580.06

Luego de obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo.

Con los resultados obtenidos podemos notar que el coeficiente de variación está por debajo del 2%, cumpliendo con esta variable estadística, el $IC\beta_1$ (intervalo de confianza para la pendiente) no incluye el cero cumpliendo con esta variable estadística.

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; la variable importante para este análisis de regresión es el r^2 , valor que debe ser igual o mayor que 0.98% dando como resultado 1, según este resultado se cumple esta variable, es decir la concentración del analito se ajustan al método matemático en un intervalo de concentraciones

5.2.4 Linealidad de método

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

En la tabla N° 4 se presentan los resultados estadísticos en la evaluación de este parámetro de desempeño como un cuadro resumen. Ver datos obtenidos en anexo N° 9.

Tabla N° 4. Resultados estadísticos de la evaluación de Linealidad del método en el ensayo.

Criterios	Resultado
Sumatoria	1.8
Promedio	103.0424218
Desvest.	1.344014213
CV	1.304330964
r^2	0.999
n-2	7

n	9
b1	0.999453843
b0	0.005174321
Sy/x	0.000981718
Sb1	0.004007845
Sb0	0.41297822
CVy/x	0.478734633
ICb0	0.97980292 -0.96945428
ICB1	1.008912358 0.989995328

Al obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo

Luego del análisis realizado para el parámetro de desempeño analítico linealidad del método, podemos determinar que cumple ya que los resultados obtenidos de los criterios de aceptación son positivos.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito.

Intervalo de confianza para la pendiente ($IC\beta_1$) debe de incluir la unidad, el resultado es [1.009, 0.990] cumpliendo con este criterio.

Intervalo de confianza para la ordenada ($IC\beta_0$) debe incluir el cero, el resultado es [0.980, -0.970] cumpliendo con este criterio.

El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual al 0.98% el resultado es 0.999% cumpliendo con este criterio.

5.3 Resultados de evaluación de los parámetros de desempeño Exactitud y Precisión para Disolución de tabletas de Ciprofloxacina en presentación de 500 mg.

5.3.1 Precisión (repetibilidad)

La precisión es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas; para este caso de evaluación se analizó la repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

En la tabla N° 5 se muestran los resultados estadísticos del análisis de 6 mediciones tomadas por tableta de ciprofloxacina 500 mg. Ver datos obtenidos en anexo N° 10.

Tabla N° 5. Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro Precisión en la disolución.

Criterios	Resultado
Promedio	98.73
Desvest	2.58
CV	2.62
Icu	101.44
	96.02

Al obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo

Luego del análisis realizado para el parámetro de desempeño analítico Precisión (repetibilidad), podemos determinar que cumple ya que los resultados obtenidos de los criterios de aceptación son positivos; Es decir existe concordancia entre los datos y el valor promedio.

Intervalo de confianza $IC(\mu)$ debe incluir el 100%, el resultado es [96.02, 101.44] cumpliendo con este criterio.

El coeficiente de variación (CV) debe ser menor o igual al 3% ($\leq 3\%$) dando como resultado 2.62%. por lo tanto, cumple con este criterio.

5.3.2 Exactitud

La evaluación práctica de la Exactitud (veracidad) se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia.

En la tabla N° 6 se muestran los resultados estadísticos del análisis de 6 mediciones tomadas por tableta recubierta de ciprofloxacina 500 mg. Ver datos obtenidos en anexo N° 10.

Tabla N° 6. Resultados estadísticos de la evaluación del parámetro exactitud en la disolución

Criterios	Resultado
Promedio	98.08
Desvest	2.78
CV	2.84
Icu	101.00
	95.16

Al obtener los datos, se realizaron los cálculos estadísticos con la ayuda de la herramienta de hoja de cálculo

Luego del análisis realizado para la característica de desempeño analítico Exactitud, podemos determinar que cumple ya que los resultados obtenidos de los criterios de aceptación son positivos; es decir existe proximidad entre los datos y su valor verdadero.

El porcentaje de recobro para métodos espectrofométricos debe de estar en el rango de [97% – 103%], el resultado obtenido es 98.08%, por lo tanto, cumple con este criterio.



El coeficiente de variación (CV) debe de ser menor que el 3%, el resultado obtenido es 2.84%, por lo tanto, cumple con este criterio.

El intervalo de confianza IC(μ) debe incluir el 100%, el resultado es [95.16, 101.00] cumpliendo con este criterio.

5.4 Comparación de los parámetros de desempeño para Ensayo y Disolución con los criterios de aceptación especificados en el Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).

Prueba	Parámetros a evaluar	Análisis de datos	Criterios de aceptación	Resultados obtenidos	
ENSAYO	Precisión	Promedio (Y)		19510.383	
		Desviación estándar (S)		216.611	
		Coeficiente de variación (CV)	$CV \leq 2\%$	1.110	
	Exactitud	Porcentaje de recobro	98% - 102%		101.74
		Promedio (Y)			101.74
		Desviación estándar (S)			0.834
		Coeficiente de variación (CV)	$< 2\%$		0.819
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%		IC(μ): 102.61, 100.08
	Linealidad del sistema	Intercepto (b)			3E -11
		Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98\%$		1
		Intervalo de confianza para la pendiente (IC β 1)	IC β 1 para pendiente no debe incluir el cero		[119282.37, 131175.25]
		Coeficiente de variación (CV) Y/X	$< 2\%$		1.72
	Linealidad del método	Intervalo de confianza para la pendiente (IC β 1)	IC para pendiente debe incluir la unida		[1.009, 0.990]
		Intervalo de confianza para la ordenada (IC β 0)	IC para ordenada debe incluir el cero		[0.980, -0.970]
		Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98\%$		0.999
		Desviación estándar (S)			0.087
		Intercepto			0.003
DISOLUCION	Precisión	Promedio (Y)		98.73	
		Desviación estándar (S)		2.58	
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%		[96.02, 101.44]
		Coeficiente de variación (CV)	$CV \leq 3\%$		2.62
	Exactitud	Porcentaje de recobro	97% - 103%		98.08%
		Promedio (Y)			98.08%
		Desviación estándar (S)			2.78
		Coeficiente de variación (CV)	$< 3\%$		2.84
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%		[95.16, 101.00]

5.5 Informe final para la asignatura de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos de los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño.



	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.	
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 1 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg	
Código de protocolo:	PT0001-01	

Elaborado por:



Firma:	
Nombre:	Jorge Escobar
Cargo:	Químico Analista
Fecha:	MARZO 2021

Autorizado por:

Firma:	
Nombre:	Lic. Eliseo Ayala
Cargo:	Asesor
Fecha:	MARZO 2021

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 2 de 8	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

1. Introducción.
2. Equipos utilizados.
3. Esquema de Determinación de los parámetros de Desempeño analítico para ensayo de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.
4. Resultados de determinación de los parámetros de desempeño analítico para ensayo de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.
5. Conclusiones y dictamen.
6. Bibliografía.

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021		Página 3 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

1. INTRODUCCION.



Un método analítico validado posee como ventaja el cumplimiento de exigencias legales regulatorias, además de demostrar que el método es adecuado y eficaz para su uso, minimizar fallos y repeticiones con lo que se ahorran recursos económicos asociados a estos, también hay seguridad y confianza en los resultados obtenidos en los análisis; Todas las regulaciones farmacéuticas como por ejemplo el informe 32 de la OMS, piden que los métodos analíticos estén validados, he aquí la importancia del cumplimiento de los parámetros de desempeño analíticos.

Los parámetros de desempeño son características que necesitan ser evaluadas; dichas características son: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Linealidad, intervalo y Robustez; de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos de América.

El presente trabajo está dirigido a la determinación y estudio de parámetros de desempeño analítico Precisión, Exactitud y Linealidad para el ensayo de Ciprofloxacina tableta de 500 mg adquiridas de un laboratorio Nacional.



2. EQUIPOS UTILIZADOS

PHmetro, Balanza analítica SHIMADZU AUY2200 y Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, serie 1100

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 4 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

3. ESQUEMA DE DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO EN EL ENSAYO DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA 500 mg.



	Parámetro	Concent.	Repeticiones	Análisis de datos	Criterios de aceptación
ENSAYO	Precisión	100%	6	Promedio (Y)	
				Desviación estándar (S)	
				Coeficiente de variación (CV)	CV ≤ 2%
	Exactitud	100%	6	Porcentaje de recobro	98% - 102%
				Promedio (Y)	
				Desviación estándar (S)	
				Coeficiente de variación (CV)	< 2%
	Linealidad del método	50%	3	Intercepto (b)	
		150%	3	Coeficiente de determinación (r ²)	r ² ≥ 0.98%
				Intervalo de confianza para la pendiente (ICβ1)	IC Para pendiente debe incluir la unidad
				Intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICβ0)	IC para ordenada debe incluir el cero

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 5 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		



				Coeficiente de variación (CV) Y/X	< 2%
Linealidad del sistema	50%	3	Intervalo de confianza para la pendiente (IC β 1)		IC Para pendiente no debe incluir el cero $r^2 \geq 0.98\%$
	75%	3			
	100%	3	Coeficiente de determinación (r^2)		
	125%	3	Desviación estándar (S)		
	150%	3	Intercepto (b)		

4. RESULTADOS DE DETERMINACION DE LOS PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO PARA ENSAYO DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA 500 mg.

Prueba	Parámetros a evaluar	Análisis de datos	Criterios de aceptación	Resultados obtenidos
ENSAYO	Precisión	Promedio (Y)		19510.383
		Desviación estándar (S)		216.611
		Coeficiente de variación (CV)	CV \leq 2%	1.110

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 6 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		



ENSAYO	Precisión	Promedio (Y)		19510.383
		Desviación estándar (S)		216.611
		Coeficiente de variación (CV)	CV ≤ 2%	1.110
	Exactitud	Porcentaje de recobro	98% - 102%	101.74
		Promedio (Y)		101.74
		Desviación estándar (S)		0.834
		Coeficiente de variación (CV)	< 2%	0.819
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%	IC(μ): 102.61, 100.08
	Linealidad del sistema	Intercepto (b)		3E -11
		Coeficiente de determinación (r ²)	r ² ≥ 0.98%	1
		Intervalo de confianza para la pendiente (ICβ1)	ICβ1 Para pendiente no debe incluir el cero	[119282.37, 131175.25]
		Coeficiente de variación (CV) Y/X	< 2%	1.72

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 7 de 8
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

ENSAYO	Linealidad del método	intervalo de confianza para la pendiente (IC β 1)	IC para pendiente debe incluir la unidad	[1.009, 0.990]
		Intervalo de confianza para la ordenada (IC β 0)	IC para ordenada debe incluir el cero	[0.980, -0.970]
		Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98\%$	0.999
		desviación estándar (S)		0.087
		Intercepto		0.003



5. CONCLUSIONES Y DICTAMEN

- 5.1** En base a los resultados obtenidos en el ensayo, el método analítico cumple para los parámetros Precisión, Exactitud, Linealidad del método y Linealidad del sistema.
- 5.2** Es importante gestionar un plan de mantenimiento preventivo de los equipos e instrumentos utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad.
- 5.3** Solicitar a las autoridades gestionar un plan de adquisición de estándares de trabajo de alta calidad o Estándares certificados USP
- 5.4** Es importante gestionar un plan de calificación de los equipos utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad.

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en el ensayo de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 8 de 8	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

6. BIBLIOGRAFIA

- Procedimiento interno de Validación de Métodos Analíticos, Laboratorio Farmacéutico Nacional.
- USP 38, Verificación de Procedimientos Farmacopéicos <1226>
- USP 38, Validación de Métodos Analíticos <1225>
- Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos 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.



	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 1 de 6	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

Elaborado por:



Firma:	
Nombre:	Jorge Escobar
Cargo:	Químico Analista
Fecha:	MARZO 2021

Autorizado por:

Firma:	
Nombre:	Lic. Eliseo Ayala
Cargo:	Asesor
Fecha:	MARZO 2021

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 2 de 6	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

1. Introducción.
2. Equipos utilizados.
3. Esquema de determinación de los Parámetros de Desempeño analítico para Disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.
4. Resultados de determinación de los Parámetros de Desempeño analítico para Disolución de tabletas de Ciprofloxacina 500 mg.
5. Conclusiones y dictamen.
6. Bibliografía.



	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 3 de 6	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

1. INTRODUCCION.

Un método analítico validado posee como ventaja el cumplimiento de exigencias legales regulatorias, además de demostrar que el método es adecuado y eficaz para su uso, minimizar fallos y repeticiones con lo que se ahorran recursos económicos asociados a estos, también hay seguridad y confianza en los resultados obtenidos en los análisis; Todas las regulaciones farmacéuticas como por ejemplo el informe 32 de la OMS, piden que los métodos analíticos estén validados, he aquí la importancia del cumplimiento de los parámetros de desempeño analíticos.

Los parámetros de desempeño son características que necesitan ser evaluadas; dichas características son: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Linealidad, intervalo y Robustez; de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos de América.

El presente trabajo está dirigido a la determinación y estudio de parámetros de desempeño analítico Precisión, Exactitud y Linealidad para el ensayo de Ciprofloxacina tableta de 500 mg adquiridas de un laboratorio Nacional.



	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 4 de 6
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

2. EQUIPOS UTILIZADOS

- PHmetro
- Balanza analítica SHIMADZU AUY2200
- Disolutor Erweka DT6
- Espectrofotómetro Shimadzu Modelo 1800

3. ESQUEMA DE DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO EN LA DISOLUCIÓN DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA 500 mg.

	Parámetro	Concent.	Repeticiones	Análisis de datos	Criterios de aceptación
DISOLUCION	Precisión	100%	6	Promedio (Y)	
				Desviación estándar (S)	
				Intervalo de confianza IC(μ)	debe incluir el 100%
				Coeficiente de variación (CV)	CV \leq 3%
	Exactitud	100%	6	porcentaje de recobro	97% - 103%
				Promedio (Y)	
				Desviación estándar (S)	
				Coeficiente de variación (CV)	< 3%
	Intervalo de confianza IC(μ)	debe incluir el 100%			



	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01		Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 5 de 6
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

4. RESULTADOS DE DETERMINACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO PARA DISOLUCION DE TABLETAS DE CIPROFLOXACINA 500 mg.

Prueba	Parámetros a evaluar	Análisis de datos	Criterios de aceptación	Resultados obtenidos	
DISOLUCION	Precisión	Promedio (Y)		98.73	
		Desviación estándar (S)		2.58	
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%	[96.02, 101.44]	
		Coeficiente de variación (CV)	CV \leq 3%	2.62	
	Exactitud	Porcentaje de recobro	97% - 103%		98.08%
		Promedio (Y)			98.08%
		Desviación estándar (S)			2.78
		Coeficiente de variación (CV)	< 3%		2.84
		Intervalo de confianza IC(μ)	Debe incluir el 100%		[95.16, 101.00]

5. CONCLUSIONES Y DICTAMEN

5.1 Respecto al estudio de parámetros de desempeño analítico para Disolución, el método analítico cumple con los criterios de aceptación esperados para los parámetros de Precisión y Exactitud.

	Informe de resultados para la determinación de parámetros de desempeño analítico en la disolución de tableta de Ciprofloxacina de 500 mg.		
Edición: 01	Vigente a partir de: Marzo 2021	Página 6 de 6	
Nombre del producto:	Tableta de Ciprofloxacina 500 mg		
Código de protocolo:	PT0001-01		

- 5.2** Es importante gestionar un plan de mantenimiento preventivo de los equipos e instrumentos utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad.
- 5.3** Solicitar a las autoridades gestionar un plan de adquisición de estándares de trabajo de alta calidad o Estándares certificados USP
- 5.4** Es importante gestionar un plan de calificación de los equipos utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad.

6. BIBLIOGRAFIA

- Procedimiento interno de Validación de Métodos Analíticos, Laboratorio Farmacéutico Nacional.
- USP 38, Verificación de Procedimientos Farmacopéicos <1226>
- USP 38, Validación de Métodos Analíticos <1225>
- Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos 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.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las pruebas de Ensayo y Disolución, cumplen con los criterios establecidos ya que están dentro de los rangos descritos según monografía de USP 38 NF 33.
2. En base a los resultados obtenidos en el ensayo, el método analítico cumple para los parámetros Precisión, Exactitud, Linealidad del método y Linealidad del sistema.
3. Respecto al estudio de parámetros de desempeño analítico para Disolución, el método analítico cumple con los criterios de aceptación esperados para los parámetros de Precisión y Exactitud.
4. La evaluación de los parámetros de desempeño analítico es determinante para garantizar la calidad de los medicamentos, desde el aprendizaje y conocimiento inicial del método, hasta la finalización de la Validación misma.
5. Se comprobó que condiciones como: ambientales, equipos utilizados, cristalería, instrumentos, reactivos entre otros, del Laboratorio de Control de Calidad permiten obtener resultados confiables en la evaluación y estudio de parámetros de desempeño analítico.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

Al Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, se le recomienda:

1. Solicitar a las autoridades, gestionar un plan de mantenimiento preventivo y calificación de los equipos e instrumentos utilizados en el Laboratorio de la asignatura de Control de Calidad.
2. Gestionar la reparación de equipos e instrumentos que se encuentran en malas condiciones para habilitar su uso, ya que son de mucha importancia para el análisis de producto en general.
3. Dar seguimiento al estudio realizado, evaluando otros parámetros de desempeño que puedan aportar valor y finalizar la validación de la metodología expuesta en el presente trabajo
4. Solicitar a las autoridades gestionar un plan de adquisición de estándares de trabajo de alta calidad o Estándares certificados USP

BIBLIOGRAFIA

1. Cabrera, M. M. y Girón, R. G. (febrero 2012). Determinación de Parámetros de Desempeño del Método Analítico para la Cuantificación de Losartán Potásico tabletas de 50 mg por Espectrofotometría Ultravioleta. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
2. Ciprofloxacina MK, 2015, [en línea]. Vademécum MK, Tecnoquímicas Colombia. Biblioteca electrónica. Disponible en: <http://www.tqfarma.com/Vadem%C3%A9cumMK/AntiinfeciososSist%C3%A9micosGenerales/Ciprofl oxacinaMK.aspx>
3. Falquez, A. y Sarmiento L. (2013). Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de Ciprofloxacina en suero por Cromatografía Líquida de Alta Precisión con Detección Ultravioleta. [en línea]. Universidad de Manizales, Colombia. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=273829753002>.
4. García, C. M. (mayo 2012). Determinación de Parámetros de Desempeño del Método de Disolución de Tabletillas de Alopurinol 300 miligramos aplicando Espectrofotometría Ultravioleta Visible. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
5. Gennaro A., Remington Farmacia, 20ª ed. Vol II, Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A., 2000.
6. International Conference of Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, (marzo 2022) Validation of Analytical procedures: Methodology, ICH-Q2R2.

7. Merlos R. M. (diciembre 2011). Implementación de parámetros de desempeño para el ensayo de potencia de Gentamicina Sulfato solución inyectable por el método cilindro placa. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
8. MSc. Pérez, M., MSc. Rodríguez Y., Dra. Suárez Y. Rev. Cubana Farm. 2014. Validación del método por espectrofotometría ultravioleta para control de calidad de clorhidrato de Ciprofloxacina en tabletas. Revista Cubana Farm. 48(2).
9. Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA) (2010). Guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos versión 1. El salvador.
10. United States Pharmacopeical Convention (marzo 2015), Inc. United States Pharmacopoeia of the United States of America, (USP) 38 National Formulary (NF) 33 Edición en español. 2015.

ANEXOS

ANEXO N° 1

DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACION SEGÚN USP 38 N APARTADO <1225>

APTITUD DEL SISTEMA

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o incluirse en el procedimiento una advertencia. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez sería el establecimiento de una serie de parámetros de aptitud del sistema que garanticen que se mantenga la validez del procedimiento analítico siempre que se utilice. Las variaciones típicas son la estabilidad de las soluciones y equipo analítico, y de los analistas. En la cromatografía líquida, 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 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. Las presentaciones a la USP deberían tener en cuenta los requisitos indicados en la sección *Aptitud del Sistema* en el capítulo de pruebas generales *Cromatografía* (621).

Datos Requeridos para la Validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas

de validación. Este capítulo cubre sólo las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación. Estas categorías se indican a continuación.

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

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

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

Categoría IV: Pruebas de identificación.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la *Tabla 2* se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Los procedimientos generales ya establecidos (ej., determinación volumétrica de agua, endotoxinas bacterianas) deben revalidarse para comprobar su exactitud (y la ausencia de posibles interferencias) cuando se utilizan para un producto nuevo o materia prima nueva.

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

Tabla 2. Datos Requeridos para la Validación

Características de Desempeño Analítico	Categoría II				Categoría III	Categoría IV
	Categoría I	Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No	
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No	
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí	
Límite de detección	No	No	Sí	*	No	
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No	
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No	
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No	

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

ANEXO N° 2

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

Equipos:

- Balanza analítica SHIMADZU AUY2200
- Disolutor ERWEKA DT6
- Espectrofotómetro SHIMADZU 1800
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Hew Lett Packard, 1100
- PH metro Denver Instrument UB-10

Material en general:

- Vaso de precipitado capacidad de 100 mL, 250, y 400 mL
- Embudo cónico.
- papel filtro Whatman # 1
- Jeringas con capacidad de 10 mL.

Material volumétrico:

- Balón volumétrico de 100.0 mL.
- Balón Volumétrico 50.0 mL.
- Balón Volumétrico 25.0 mL.
- Balón Volumétrico 2000.0 mL.
- Pipeta de 1.0, 2.0 y 5.0 mL.

Reactivos:

- HCL 0.01 N
- Agua destilada
- Ácido Fosfórico 0.025 M
- Acetonitrilo
- Trietilamina
- Agua calidad HPLC
- Materia prima ciprofloxacina HCL

ANEXO N° 3

**CÁLCULOS PARA 5 NIVELES DE CONCENTRACIÓN UTILIZADOS
PARA ENSAYO EN LINEALIDAD DEL SISTEMA Y CÁLCULOS DE
COMPENSACIÓN DE CIPROFLOXACINA HCL A CIPROFLOXACINA
BASE**

Los niveles utilizados serán: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. La concentración o nivel utilizado como 100% será 200.00 µg/mL, dicha concentración es la especificada en la prueba de ensayo en la monografía USP de Ciprofloxacina Tableta.

Cálculos:

6. Nivel de concentración al 50%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc} 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\ x & \longrightarrow & 50\% \end{array}$$

$$X = 100.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
X	→	100.00 mg
	x = 116.44 mg	

7. Nivel de concentración al 75%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

$$\begin{array}{ccc} 200.00 \mu\text{g/mL} & \longrightarrow & 100\% \\ x & \longrightarrow & 75\% \end{array}$$

$$X = 150.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	150.00 mg
x = 174.66 mg		

8. Nivel de concentración al 100%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

200.00 µg/mL	→	100%
x	→	100%
X= 200.00 µg/mL		

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	200.00 mg
x = 232.88 mg		

9. Nivel de concentración al 125%,

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

200.00 µg/mL	→	100%
x	→	125%
X= 250.00 µg/mL		

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	250.00 mg
x = 291.11 mg		

10. Nivel de concentración al 150%

Conversión de Ciprofloxacina HCL, a Ciprofloxacina Base.

200.00 µg/mL	→	100%
x	→	150%

$$X = 300.00 \mu\text{g/mL}$$

Sal		Base
385.82 g/mol	→	331.34 g/mol
x	→	300.00 mg
x = 349.33 mg		

ANEXO N° 4

**PREPARACION DE REACTIVOS PARA PRUEBA DE ENSAYO Y
DISOLUCION SEGÚN MONOGRAFIA USP 38 NF 33 DE
CIPROFLOXACINA TABLETAS**

Ensayo

Ácido Fosfórico 0.025 M: medir 1.68 mL de Ácido Fosfórico en un balón volumétrico de 1000.00 mL, que contenga 500 mL de agua HPLC, dejar enfriar y llevar a volumen con el mismo solvente.

Solución A: Ácido Fosfórico 0.025 M, pH 2.0

- Incorporar a la solución de ácido fosfórico 0.025 M 5 gotas de Trietilamina
- Tome una tira de papel indicador pH y con la ayuda de un agitador coloque unas gotas de solución sobre el papel para confirmar que la solución tenga una acidez de 2.0

Solución B: Acetonitrilo y solución A, en proporción (13:87)

Solución C: Ácido Fosfórico 0.025 M, pH 3.0

- Incorporar a la solución de ácido fosfórico 0.025 M 3 gotas de Trietilamina
- Tome una tira de papel indicador pH y con la ayuda de un agitador coloque unas gotas de solución sobre el papel para confirmar que la solución tenga una acidez de 3.0

Fase móvil: se preparará una mezcla de acetonitrilo y solución C en proporción (13:87)

Diluyente: Solución B

Disolución

Ácido Clorhídrico 0.01N

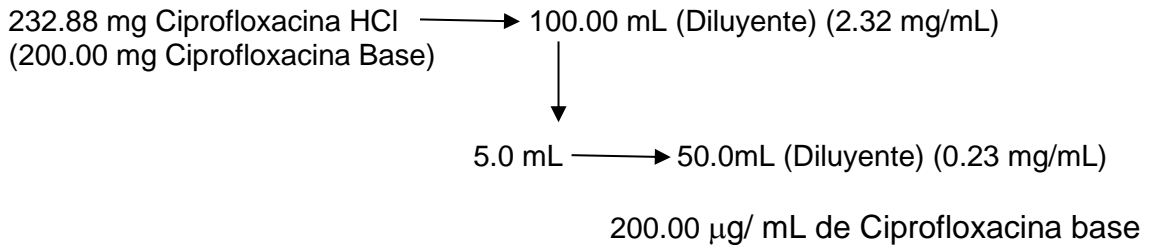
1. Medir 8.5 mL de ácido clorhídrico concentrado.
2. Agregarlos a un balón volumétrico de 1000.00 mL, conteniendo 500 mL de agua.
3. Dejar enfriar y llevar a volumen con el mismo diluyente.
4. De la solución anterior tomar una alícuota de 50.0 mL y transferirlos a un balón volumétrico de 500 mL, aforar a volumen con el mismo diluyente.

ANEXO N° 5

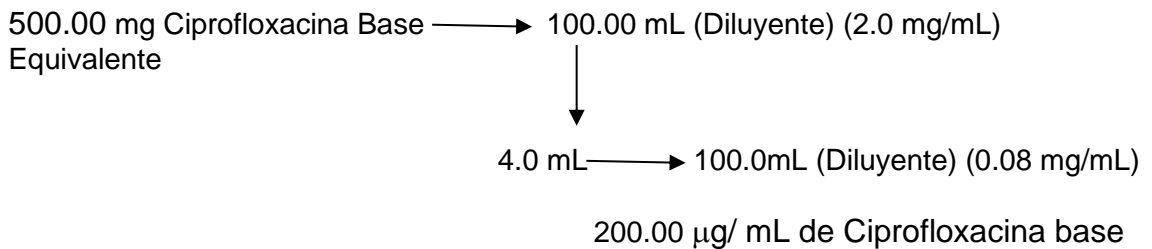
**CASCADAS DE DILUCION PARA PREPARACION DE ESTANDAR Y
PREPARACION DE MUESTRA EN LA PRUEBA DE ENSAYO Y
DISOLUCION**

Ensayo

Preparación de estándar

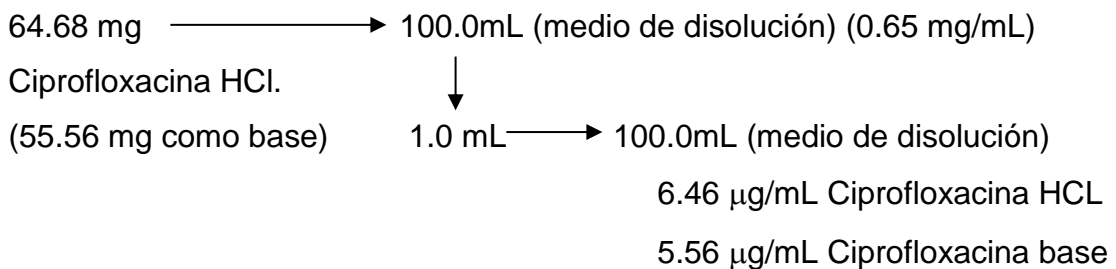


Preparación de muestra

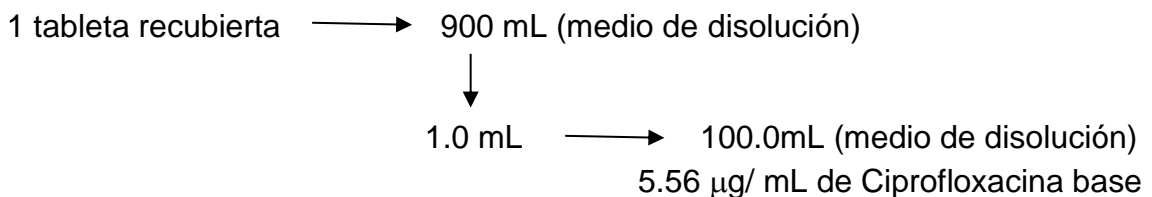


Disolución

Preparación de estándar



Preparación de muestra



ANEXO N° 6

PREPARACION DE SOLUCIONES PARA ENSAYO

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Solución al 50%

1. Pesar 116.44 mg de Ciprofloxacina HCl (Equivalente a 100.00 mg como base), ajustar para obtener el 100.00% de pureza.
2. Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
3. Adicionar 30.0 mL de diluyente, agitar hasta completa disolución, aforar con diluyente, homogenizar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL de esta solución y transferir a un balón volumétrico de 50.0 mL aforar con Diluyente.
5. Preparar por triplicado esta solución.
6. La concentración final será de 100.00 $\mu\text{g/mL}$ Ciprofloxacina Base.

Pesar 116.44 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (1.16 mg/mL)
(100.0 mg Ciprofloxacina base) \downarrow
5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (100.0 $\mu\text{g/mL}$)

Solución al 75%

1. Pesar 174.66 mg de Ciprofloxacina HCl (Equivalente a 150.00 mg como base), ajustar para obtener el 100.00% de pureza.
2. Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
3. Adicionar 30.0 mL de diluyente, agitar hasta completa disolución, aforar con diluyente, homogenizar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL de esta solución y transferir a un balón volumétrico de 50.0 mL aforar con Diluyente.
5. Preparar por triplicado esta solución.
6. La concentración final será de 150.00 $\mu\text{g/mL}$ Ciprofloxacina Base.

Pesar 176.66 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (1.77 mg/mL)
(150.0 mg Ciprofloxacina base) \downarrow
5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (150.0 $\mu\text{g/mL}$)

Solución al 100%

1. Pesar 232.88 mg de Ciprofloxacina HCl (Equivalente a 200.00 mg como base), ajustar para obtener el 100.00% de pureza.
2. transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
3. adicionar 30.0 mL de diluyente, agitar hasta completa disolución, aforar con diluyente, homogenizar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL de esta solución y transferir a un balón volumétrico de 50.0 mL aforar con Diluyente.
5. Preparar por triplicado esta solución.
6. La concentración final será de 200.00 $\mu\text{g/mL}$ Ciprofloxacina Base.

Pesar 232.88 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (2.32 mg/mL)
(200.0 mg Ciprofloxacina base) \downarrow
5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (200.0 $\mu\text{g/mL}$)

Solución al 125%

1. Pesar 291.11 mg de Ciprofloxacina HCl (Equivalente a 250.00 mg como base), ajustar para obtener el 100.00% de pureza.
2. Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.
3. Adicionar 30.0 mL de diluyente, agitar hasta completa disolución, aforar con diluyente, homogenizar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL de esta solución y transferir a un balón volumétrico de 50.0 mL aforar con Diluyente.
5. Preparar por triplicado esta solución.
6. La concentración final será de 250.00 $\mu\text{g/mL}$ Ciprofloxacina Base.

Pesar 291.11 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (2.91 mg/mL)
(250.0 mg Ciprofloxacina base) \downarrow
5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (250.0 $\mu\text{g/mL}$)

Solución al 150%

1. Pesar 349.33 mg de Ciprofloxacina HCl (Equivalente a 300.00 mg como base), ajustar para obtener el 100.00% de pureza.
2. transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL.

3. adicionar 30.0 mL de diluyente, agitar hasta completa disolución, aforar con diluyente, homogenizar.
4. Tomar una alícuota de 5.0 mL de esta solución y transferir a un balón volumétrico de 50.0 mL aforar con Diluyente.
5. Preparar por triplicado esta solución.
6. La concentración final será de 300.00 $\mu\text{g/mL}$ Ciprofloxacina Base.

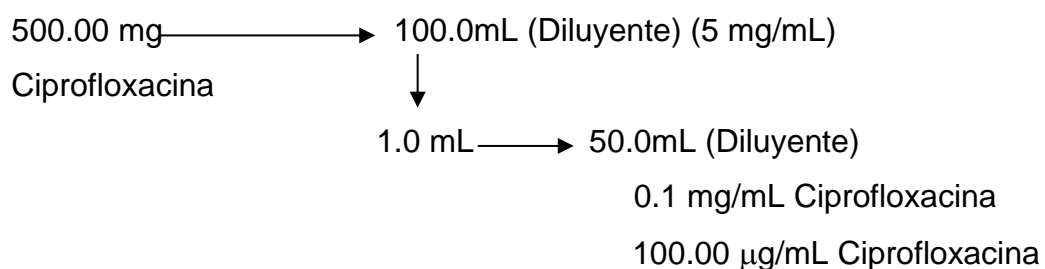
Pesar 349.33 mg Cipro. HCL \longrightarrow 100.0 mL (diluyente) (3.49 mg/mL)
 (300.0 mg Ciprofloxacina base) \downarrow
 5.0mL \longrightarrow 50.0 mL (300.0 $\mu\text{g/mL}$)

Nota: La concentración central utilizada será 200.00 $\mu\text{g/mL}$ según especificaciones en la monografía USP. Los cálculos para la determinación de los otros niveles de concentración y de compensación de sal a base se muestran en anexo N° 1.

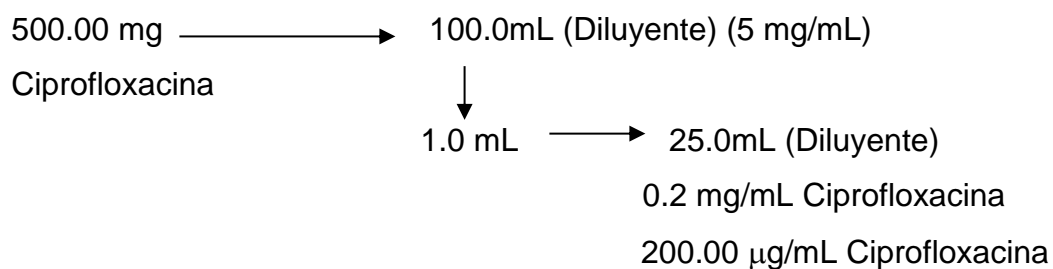
ANEXO N° 7

CASCADAS DE DILUCIÓN UTILIZADAS PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO EN ENSAYO

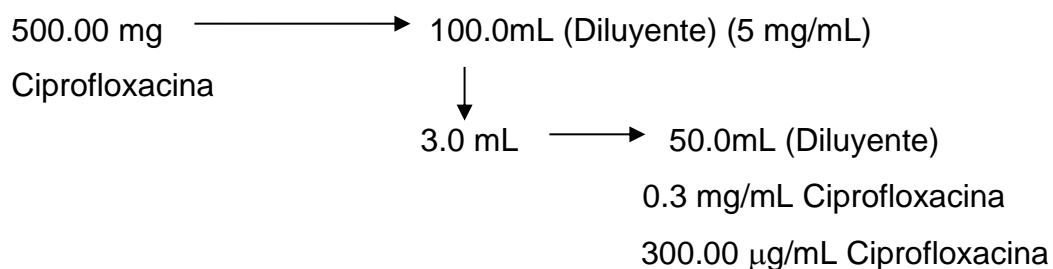
1. Para 100.00 µg/mL (solución al 50%)



2. Para 200.00 µg/mL (solución al 100%)



3. Para 300.00 µg/mL (solución al 150%)



ANEXO N° 8
RESULTADOS DE PRUEBA DE ENSAYO SEGUN MONOGRAFIA USP
38 NF 33

Cálculos para la determinación del porcentaje de pureza mediante el promedio de 3 repeticiones según prueba de ensayo.

Datos

Area de estandar: 1.85677e4 Concentracion: 200 µg/mL.

Peso promedio de 20 tabletas: 0.9390 g. Factor de dilucion: 2.5

$$\text{mg/ tab rec} = \text{Cst} * (\text{Amx} / \text{Ast}) - (\text{Wpm} / \text{Wmx}) * 90$$

Donde:

Cst = Concentración del estándar en µg/mL

Amx = Area de la muestra

Ast = Area del estándar

2.5 = factor de dilución

Wpm = peso promedio 20 tabletas

Wmx = peso de muestra

Muestra 1

Ejemplo de cálculo

Amx: 1.92450e4

Wmx: 0.9390 g.

$$\text{mg/ tab rec} = 200 * (1.92450e4 / 1.85677e4) - (0.9390 / 0.9390) * 90$$

$$\text{mg/ tab rec} = 518.24 \text{ mg}$$

500 mg ----- 100%

518 mg ----- X

$$X = 103.6\%$$

Muestra 2

$$X = 100.44\%$$

Muestra 3

$$X = 96.00\%$$

Porcentaje sobre los rotulado (%S/R) promedio

$$(103.6+100.44+96.00)/3 = \mathbf{100.01\%}$$

ANEXO 9

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO PRECISIÓN, EXACTITUD, Y LINEALIDAD PARA ENSAYO DE CIPROFLOXACINA TABLETA EN PRESENTACIÓN DE 500 mg.

Precisión (repetibilidad)

TABLETA	PESO	AREA
1	0.7581	19355.40
2	0.7581	19946.50
3	0.7582	19449.50
4	0.7582	19419.60
5	0.7582	19440.40
6	0.7582	19450.90

Exactitud

N°	Cantidad pesada	Área	mg pesados	mg Recup	% Recu
1	0.7601	19006.90	500.00	504.97	100.99
2	0.7601	19032.40	500.00	505.64	101.13
3	0.7601	19111.50	500.00	507.74	101.55
4	0.7601	19043.70	500.00	505.94	101.19
5	0.7601	19348.30	500.00	514.04	102.81
6	0.7601	19341.50	500.00	513.85	102.77

Linealidad del sistema

Porcentaje %	X [] real	Área (Y)
0	0	0
50%	0.10421	9711.100
50%	0.10383	9675.560
50%	0.10244	9545.950
75%	0.14960	13940.800
75%	0.15312	14268.600
75%	0.15351	14305.100
100%	0.19843	18490.800
100%	0.20105	18734.600
100%	0.20168	18793.500
125	0.24661	22980.900
125	0.24985	23282.800
125	0.25071	23362.800

150%	0.30829	28728.500
150%	0.29779	27749.700
150%	0.30081	28031.100

Linealidad del método

µg/mL	X	y µg Recup	X a la 2	Y a la 2	XY	Área	% RECOBRO
0	0	0	0	0	0		
0.1	0.1	0.10460	0.01	0.010941267	0.01046005	9747.2510	104.6005
0.1	0.1	0.10490	0.01	0.011004318	0.01049015	9775.2959	104.9015
0.1	0.1	0.10410	0.01	0.010836986	0.01041008	9700.6895	104.1008
0.2	0.2	0.20585	0.04	0.0423723	0.04116907	1.92E+04	102.9227
0.2	0.2	0.20644	0.04	0.042617409	0.04128797	1.92E+04	103.2199
0.2	0.2	0.20642	0.04	0.04261032	0.04128453	1.92E+04	103.2113
0.3	0.3	0.30434	0.09	0.092620386	0.09130079	2.84E+04	101.4453
0.3	0.3	0.30440	0.09	0.092660234	0.09132043	2.84E+04	101.4671
0.3	0.3	0.30454	0.09	0.092743225	0.09136132	2.84E+04	101.5126

ANEXO Nº 10

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO PRECISIÓN Y EXACTITUD PARA DISOLUCION DE CIPROFLOXACINA TABLETA EN PRESENTACIÓN DE 500 MG.

Precisión (repetibilidad)

Tableta	ABS	mg iniciales	mg recup	% recup
1	0.646	500	483.92	96.78
2	0.638	500	477.93	95.59
3	0.651	500	487.67	97.53
4	0.669	500	501.15	100.23
5	0.665	500	498.15	99.63
6	0.685	500	513.13	102.63

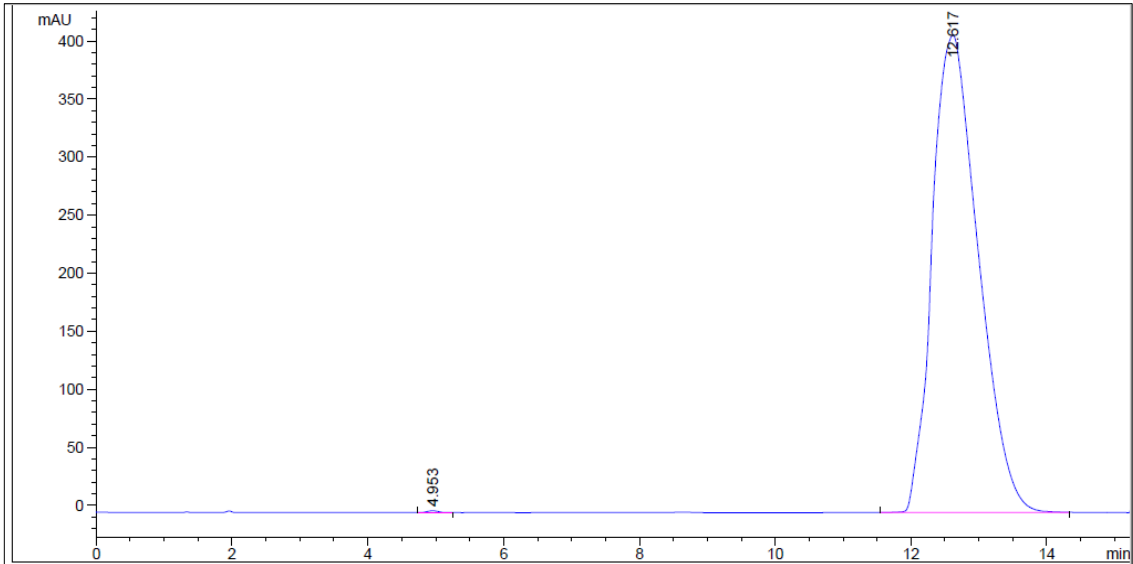
Exactitud

Tableta	ABS	mg iniciales	mg recup	% recup
1	0.639	500	478.68	95.74
2	0.682	500	510.89	102.18
3	0.66	500	494.41	98.88
4	0.669	500	501.15	100.23
5	0.637	500	477.18	95.44
6	0.641	500	480.17	96.03

ANEXO Nº 11

**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE PRECISION
(REPETIBILIDAD) EN ENSAYO**

Muestra N° 1



=====
Area Percent Report
=====

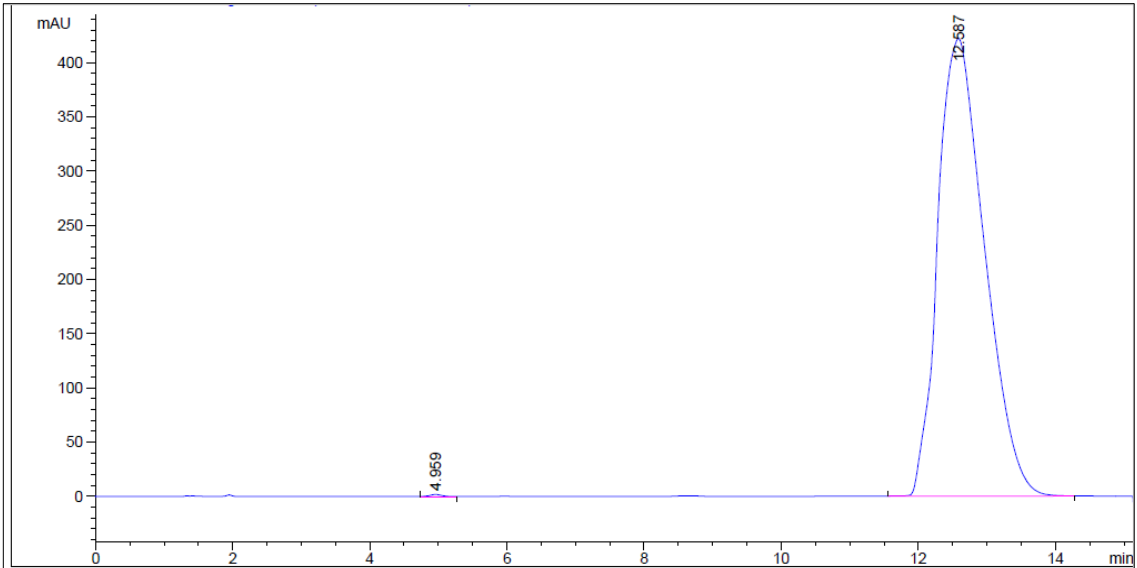
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.953	BB	0.1816	20.35186	1.73972	0.1050
2	12.617	BB	0.7193	1.93554e4	411.36157	99.8950

Totals : 1.93758e4 413.10129

Muestra N° 2



=====
Area Percent Report
=====

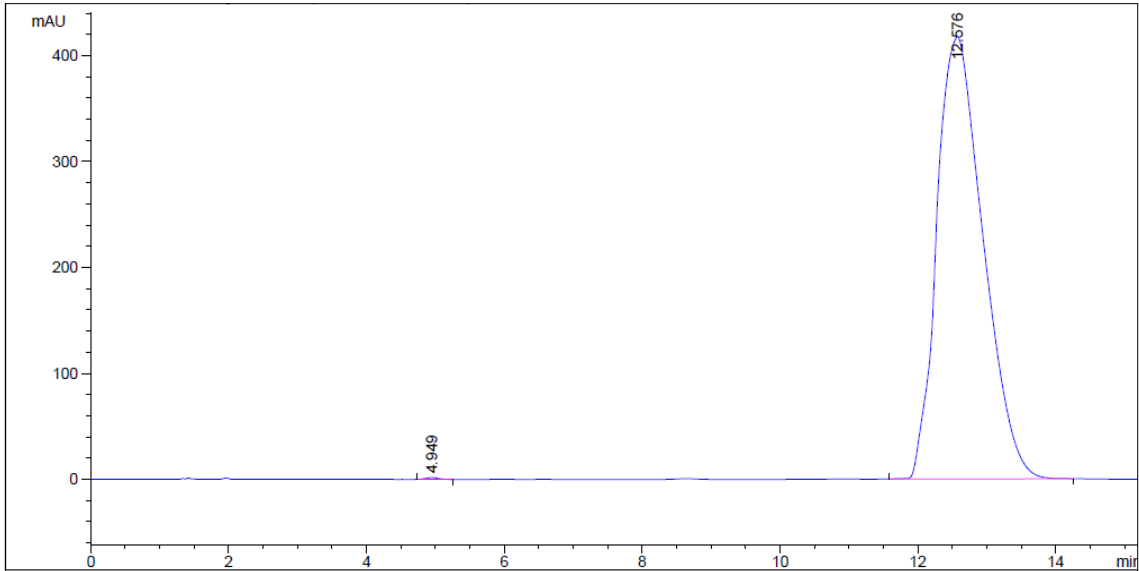
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	4.959	BB	0.1798	20.83287		1.78602	0.1043
2	12.587	BB	0.7203	1.99465e4		422.01300	99.8957

Totals : 1.99673e4 423.79902

Muestra N° 3



=====
Area Percent Report
=====

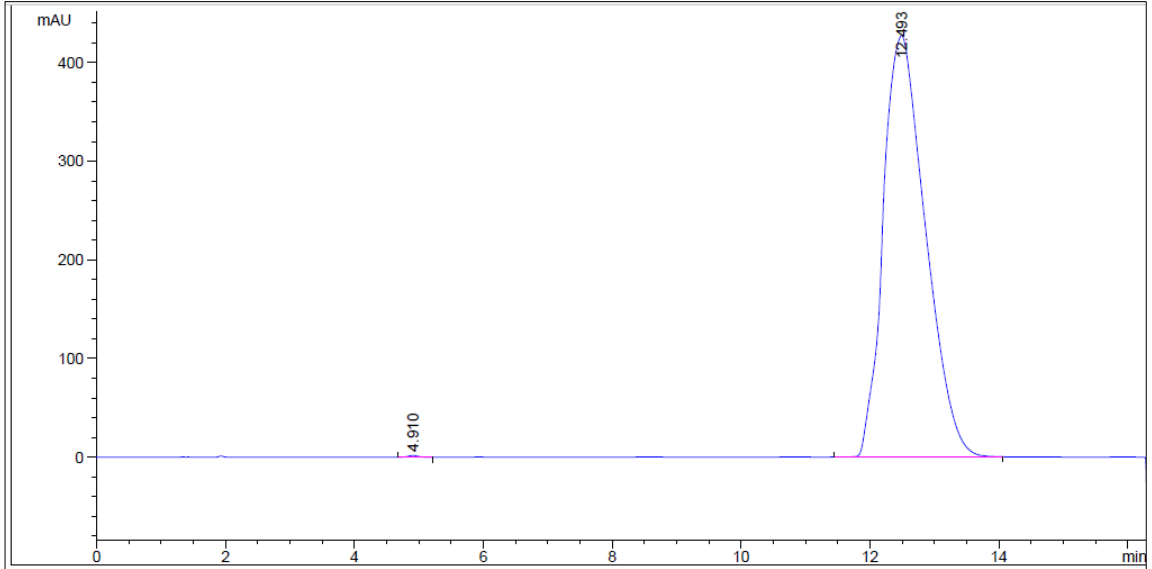
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.949	BB	0.1834	20.28417	1.73036	0.1042
2	12.576	BB	0.7064	1.94495e4	417.66147	99.8958

Totals : 1.94697e4 419.39182

Muestra N° 4



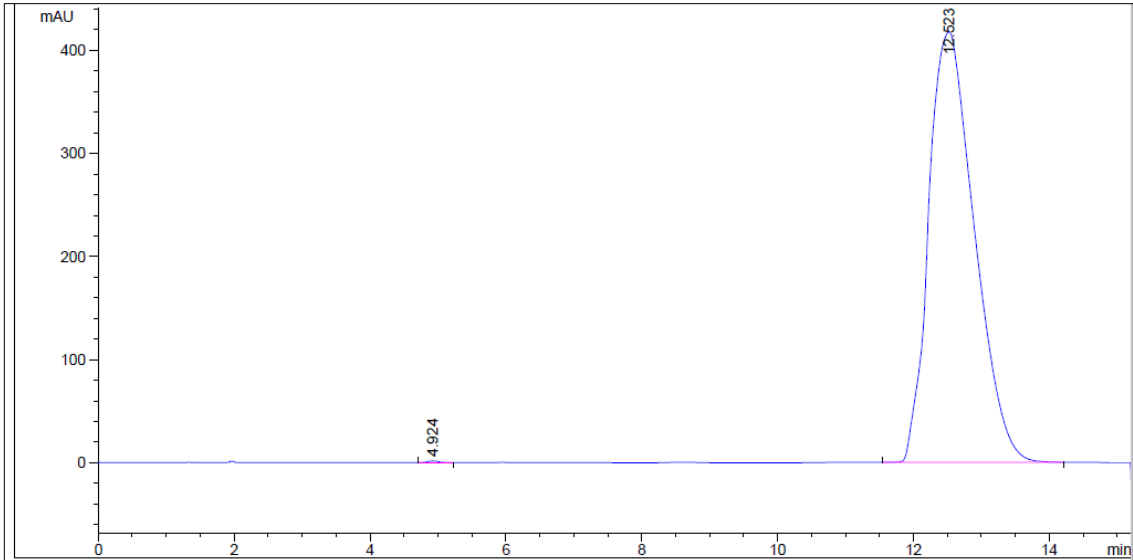
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.910	BP	0.1818	20.27283	1.74989	0.1043
2	12.493	BB	0.6918	1.94196e4	427.30978	99.8957
Totals :				1.94399e4	429.05967	

Muestra N° 5



=====
Area Percent Report
=====

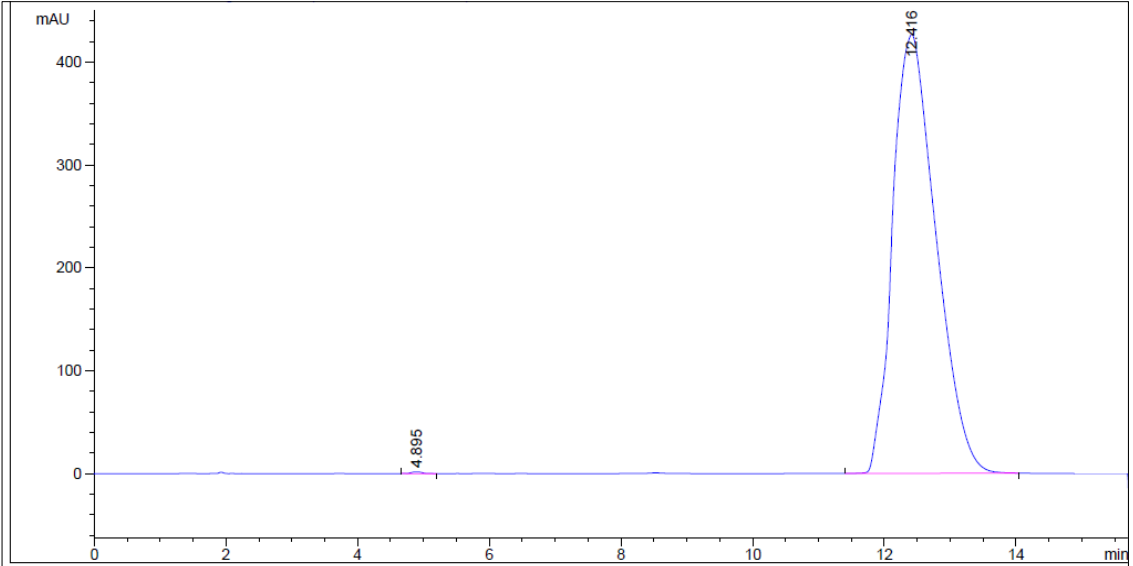
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.924	BB	0.1831	20.38929	1.74210	0.1048
2	12.523	BB	0.7086	1.94404e4	417.96954	99.8952

Totals : 1.94608e4 419.71164

Muestra N° 6



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

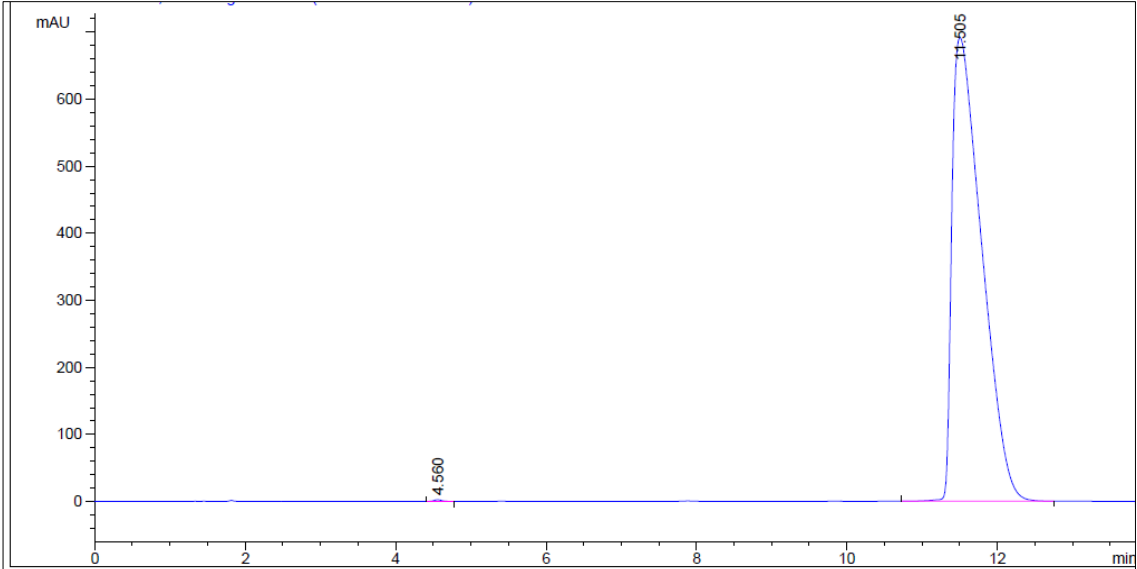
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.895	BB	0.1815	20.35553	1.75996	0.1045
2	12.416	BB	0.6962	1.94509e4	426.84674	99.8955

Totals : 1.94712e4 428.60670

ANEXO 12

**CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE EXACTITUD EN
ENSAYO**

Muestra N° 1



=====
Area Percent Report
=====

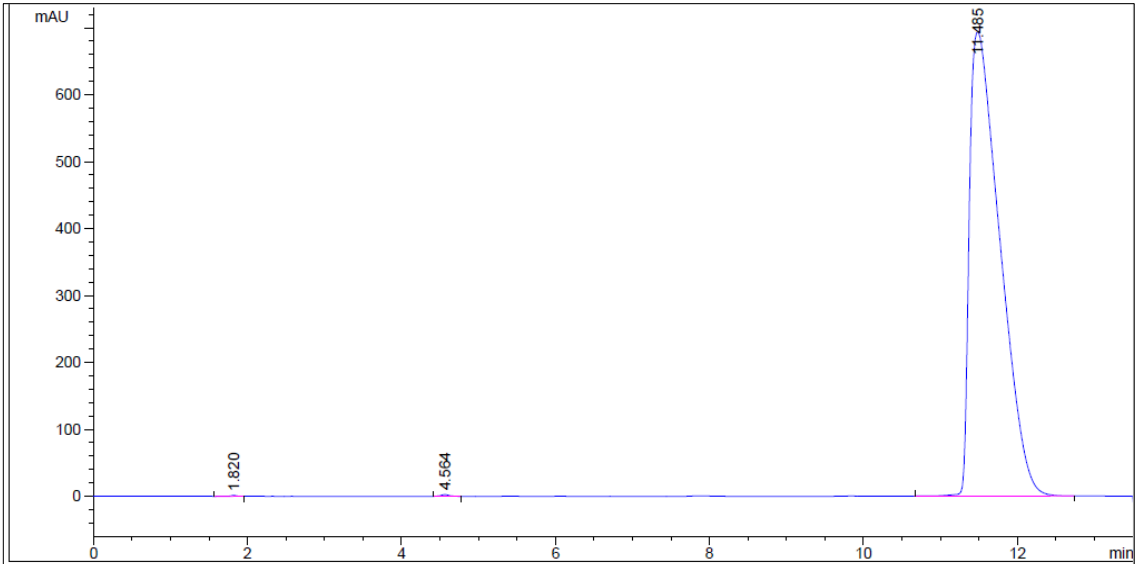
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.560	BB	0.1212	19.36238	2.49253	0.1018
2	11.505	BB	0.4181	1.90069e4	691.76898	99.8982

Totals : 1.90262e4 694.26151

Muestra N° 2



=====
Area Percent Report
=====

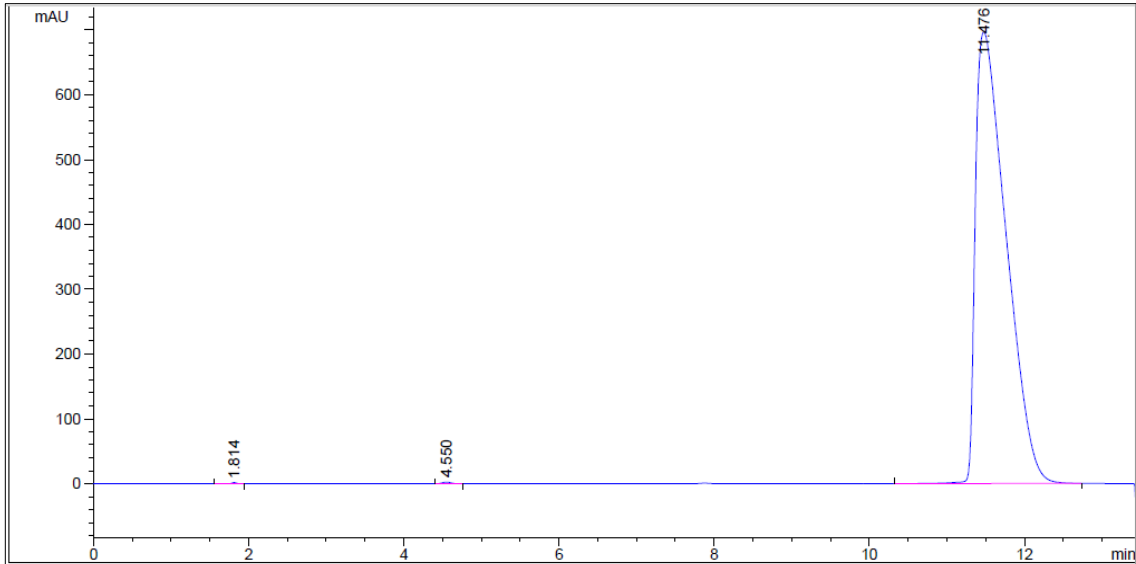
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.820	VB	0.0763	8.89541	1.72219	0.0467
2	4.564	BB	0.1211	19.62580	2.53000	0.1030
3	11.485	BB	0.4147	1.90324e4	693.67334	99.8504

Totals : 1.90609e4 697.92552

Muestra N° 3



=====
 Area Percent Report
 =====

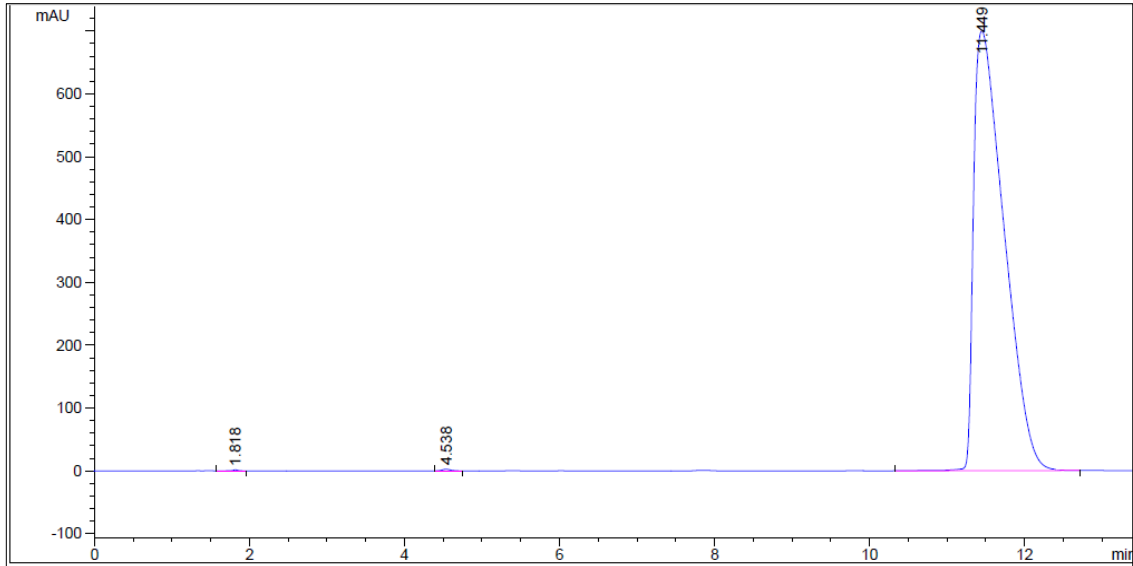
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.814	VB	0.0775	9.30631	1.76590	0.0486
2	4.550	BB	0.1192	19.56666	2.53356	0.1022
3	11.476	BB	0.4117	1.91115e4	696.82837	99.8492

Totals : 1.91404e4 701.12783

Muestra N° 4



=====
Area Percent Report
=====

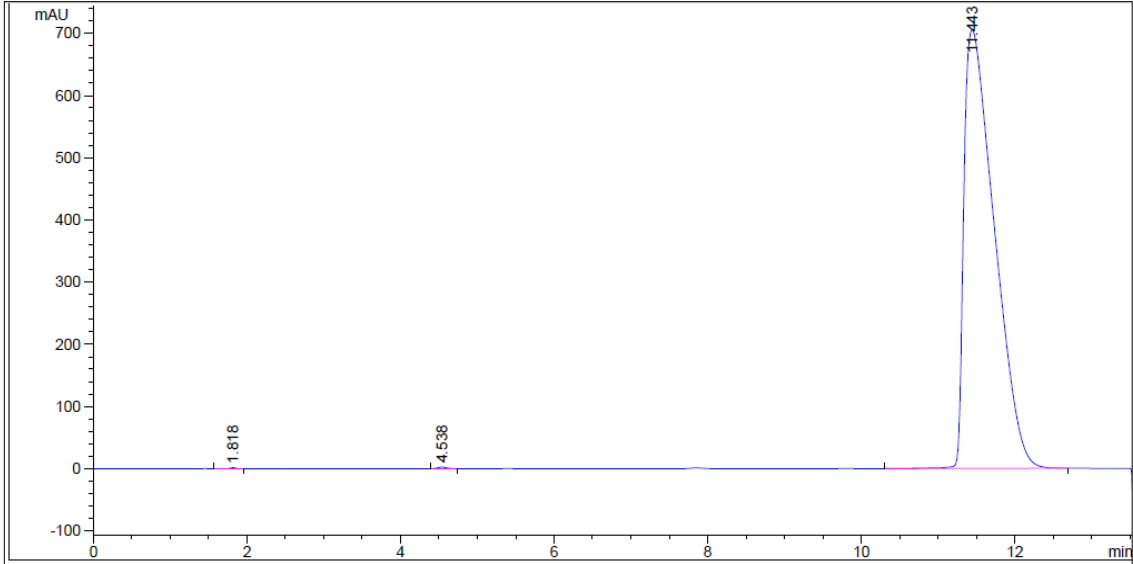
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.818	VB	0.0787	9.34603	1.74034	0.0490
2	4.538	BB	0.1204	19.60797	2.54725	0.1028
3	11.449	BB	0.4120	1.90473e4	700.10815	99.8482

Totals : 1.90763e4 704.39575

Muestra N° 5



=====
Area Percent Report
=====

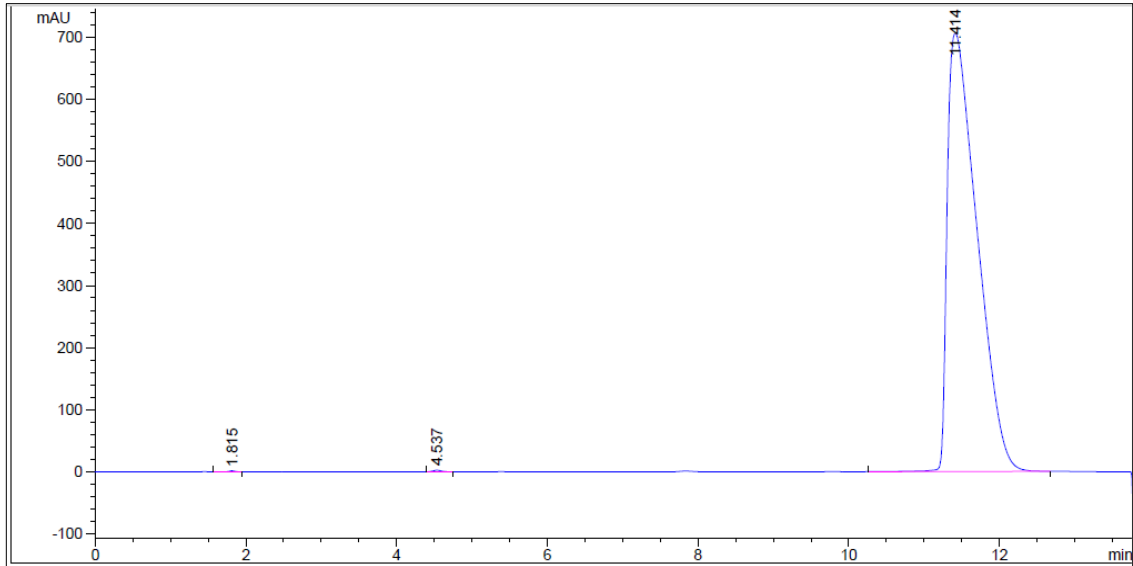
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.818	VB	0.0760	9.36956	1.78022	0.0484
2	4.538	BB	0.1201	19.91117	2.59389	0.1028
3	11.443	BB	0.4147	1.93483e4	705.38239	99.8489

Totals : 1.93776e4 709.75650

Muestra N° 6



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

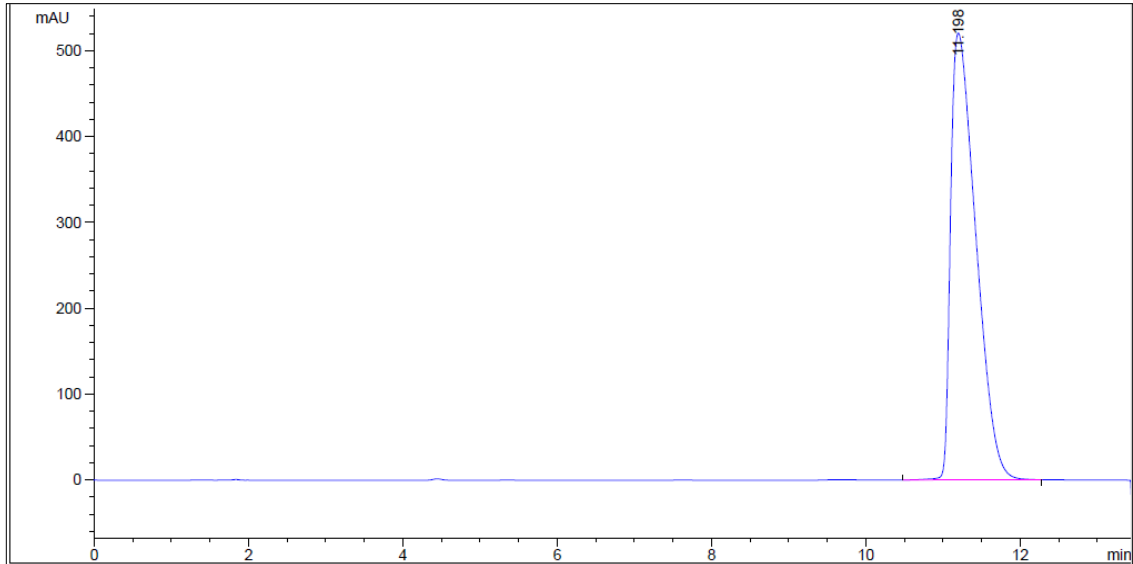
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.815	VB	0.0777	9.39599	1.77729	0.0485
2	4.537	BB	0.1189	19.99889	2.59957	0.1032
3	11.414	BB	0.4140	1.93415e4	706.60431	99.8483

Totals : 1.93709e4 710.98116

ANEXO N° 13
CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE LINEALIDAD DEL
SISTEMA EN ENSAYO

Muestra N° 1 50%



=====
Area Percent Report
=====

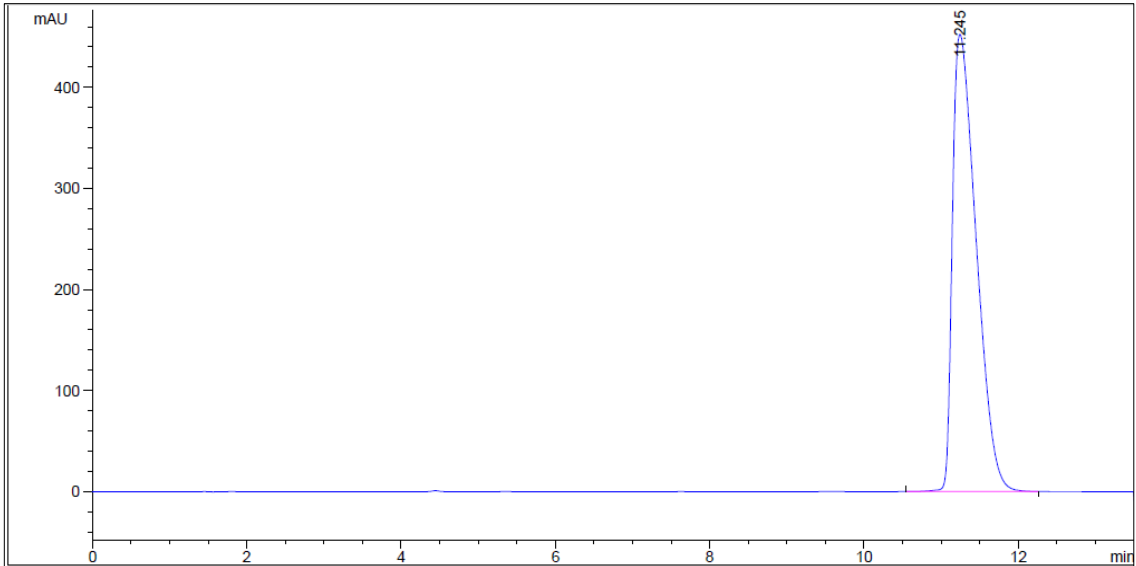
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.198	BB	0.3499	9711.100	520.36566	100.0000

Totals : 9711.100 520.36566

Muestra N° 2 50%



```
=====  
                          Area Percent Report  
=====
```

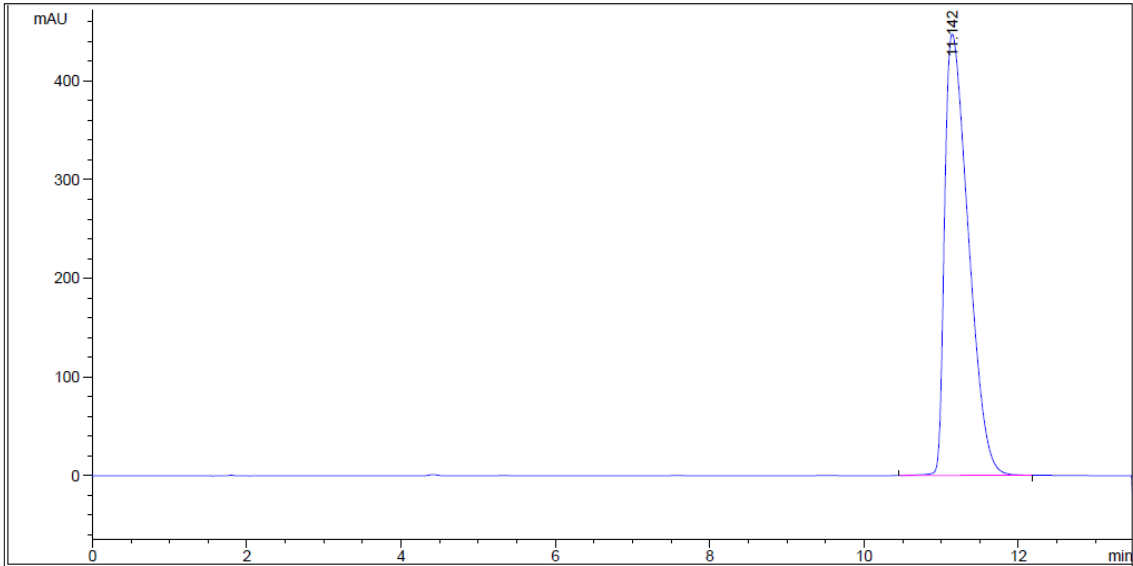
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	11.245	BB	0.3324	9675.56055	452.54489	100.0000	

Totals : 9675.56055 452.54489

Muestra N° 3 50%



```
=====  
                          Area Percent Report  
=====
```

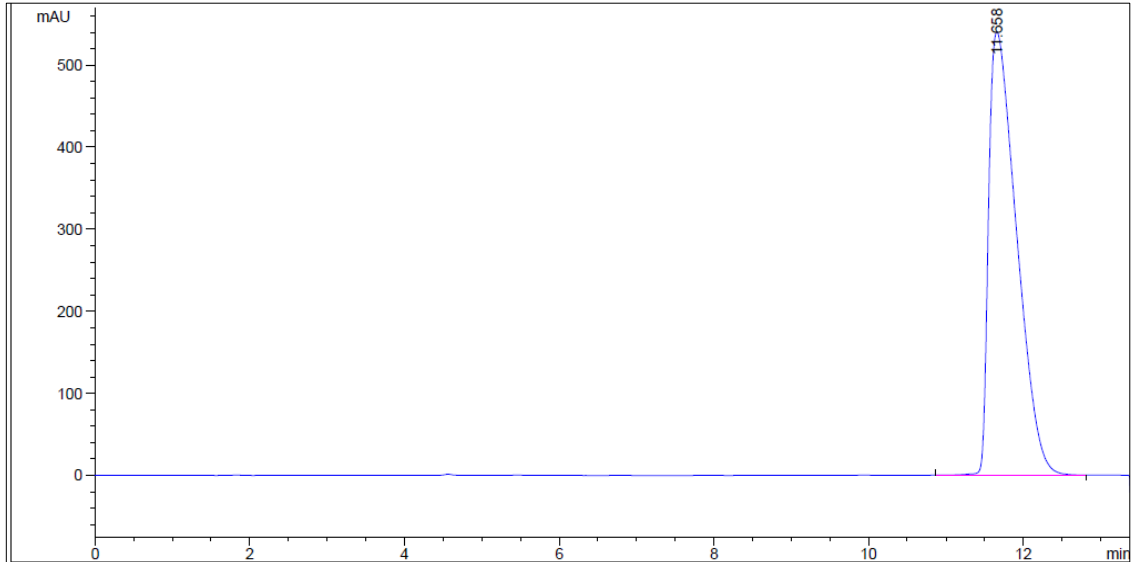
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.142	BB	0.3304	9545.95801	447.43863	100.0000

Totals : 9545.95801 447.43863

Muestra N° 1 75%



```
=====  
Area Percent Report  
=====
```

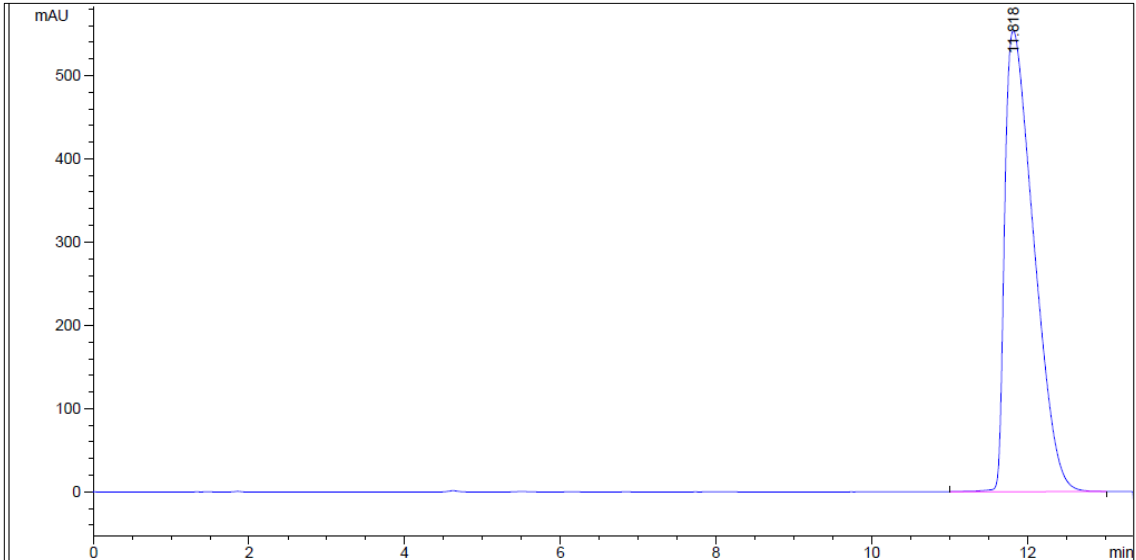
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.658	BB	0.3849	1.39408e4	540.27014	100.0000

Totals : 1.39408e4 540.27014

Muestra N° 2 75%



=====
Area Percent Report
=====

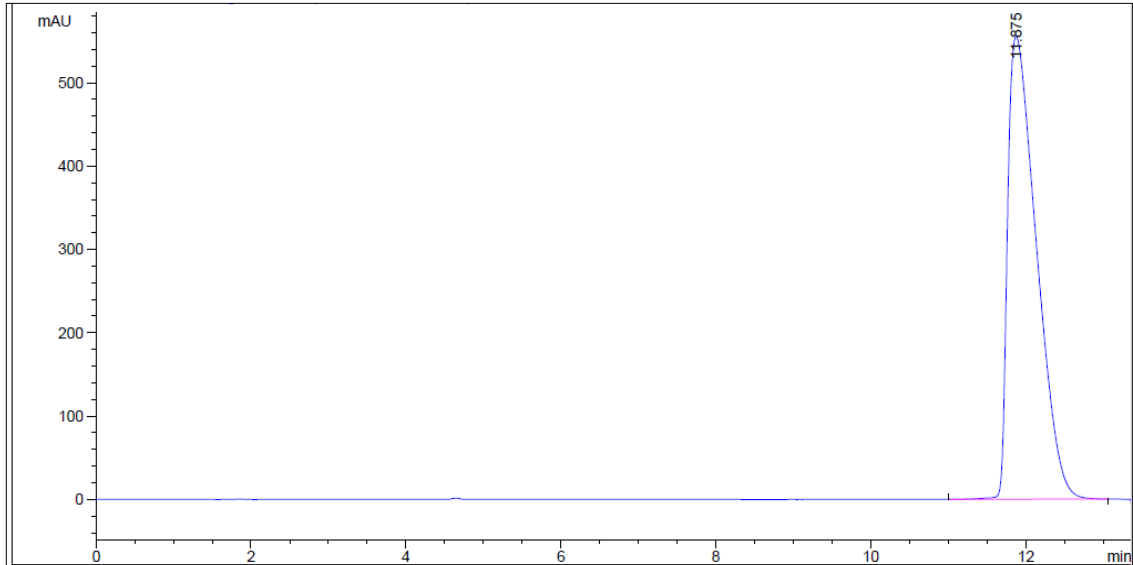
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.818	BB	0.3968	1.42686e4	553.55920	100.0000

Totals : 1.42686e4 553.55920

Muestra N° 3 75%



=====
Area Percent Report
=====

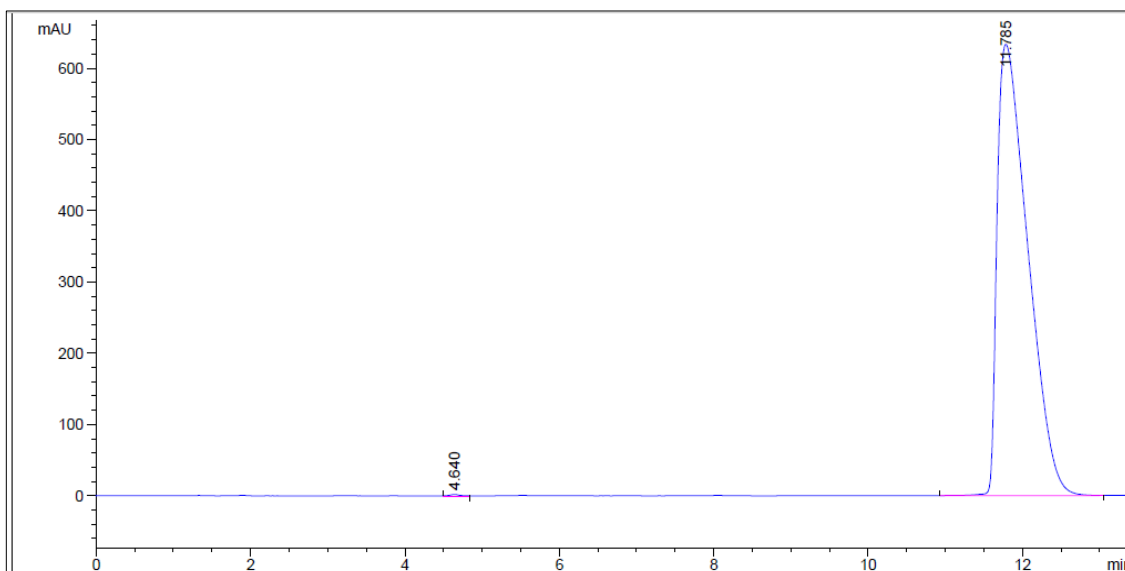
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.875	BB	0.3965	1.43051e4	555.64062	100.0000

Totals : 1.43051e4 555.64062

Muestra Nº 1 100%



=====
Area Percent Report
=====

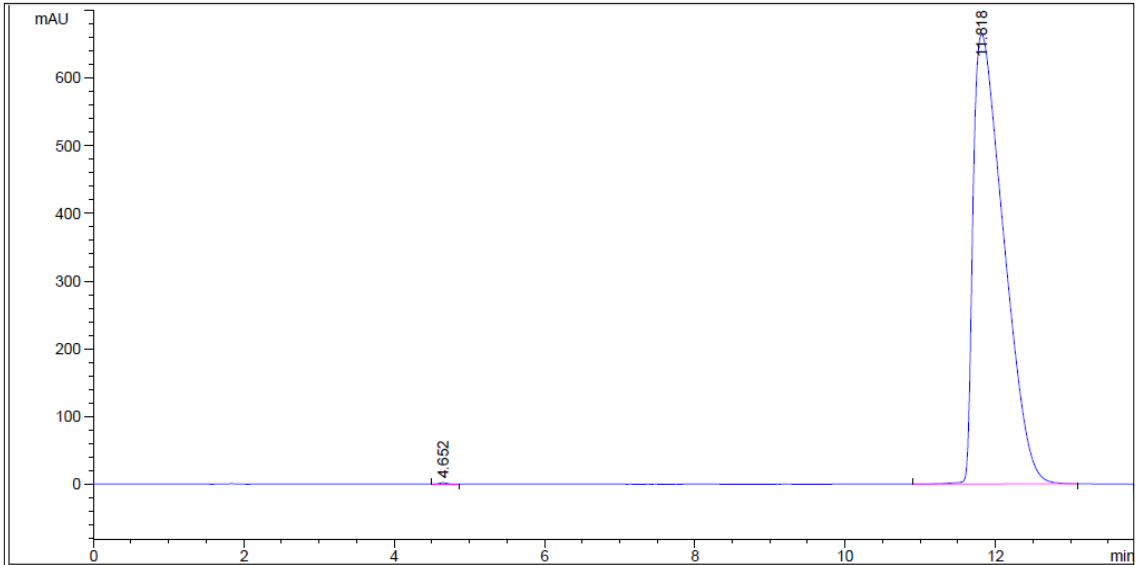
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.640	BB	0.1224	15.37499	1.95299	0.0880
2	11.785	BB	0.4220	1.84908e4	633.53912	99.9120

Totals : 1.85061e4 635.49212

Muestra N° 2 100%



=====
Area Percent Report
=====

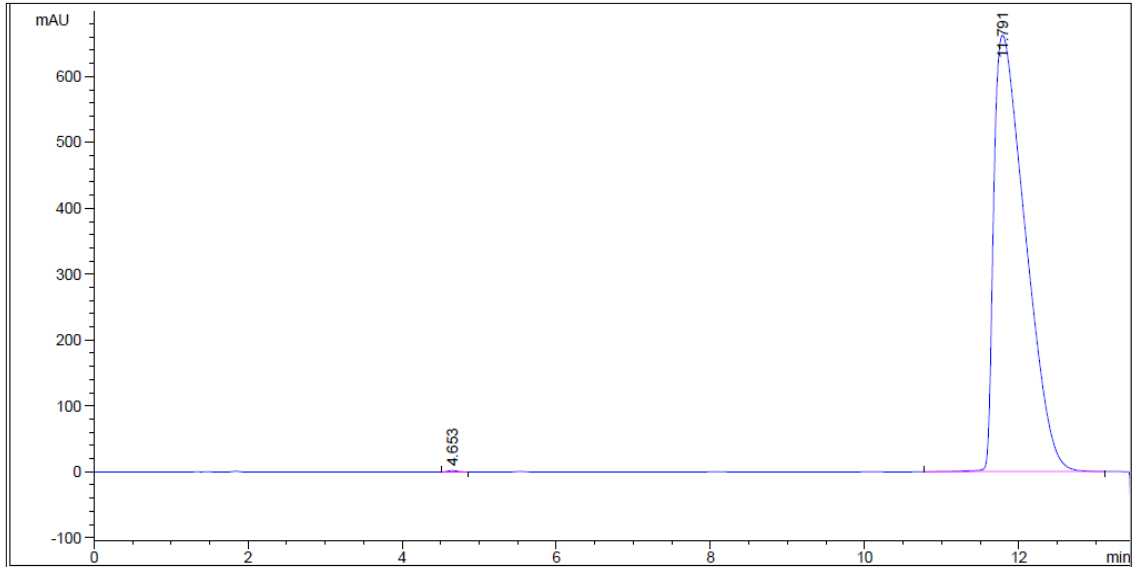
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.652	BB	0.1238	16.37107	2.04918	0.0873
2	11.818	BB	0.4293	1.87346e4	664.65057	99.9127

Totals : 1.87509e4 666.69976

Muestra N° 3 100%



```
=====  
Area Percent Report  
=====
```

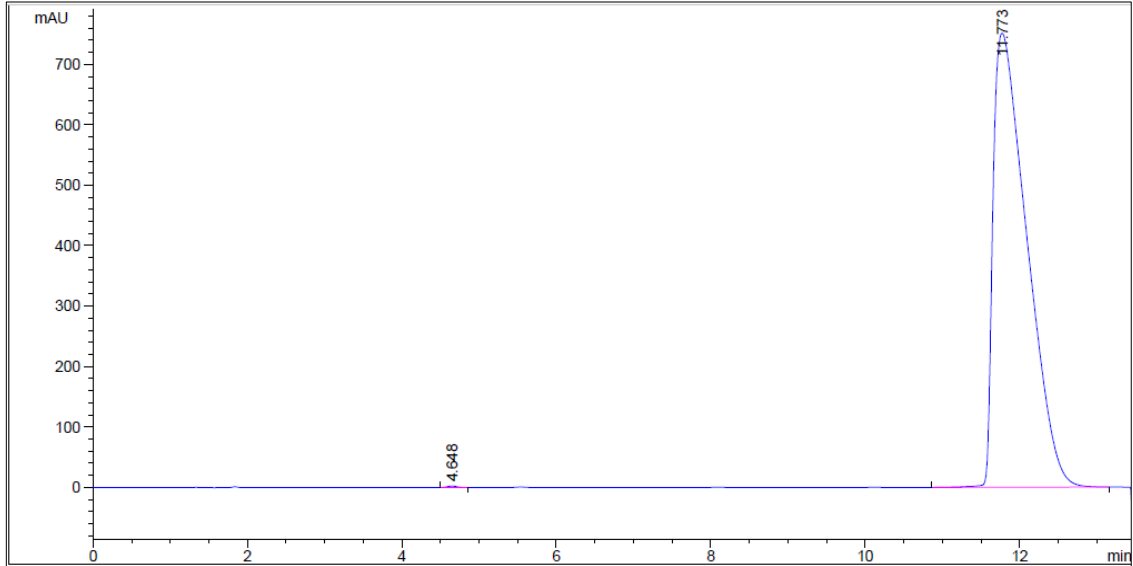
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.653	BB	0.1206	16.26574	2.07405	0.0865
2	11.791	BB	0.4358	1.87935e4	662.52527	99.9135

Totals : 1.88097e4 664.59931

Muestra N° 1 125%



=====
Area Percent Report
=====

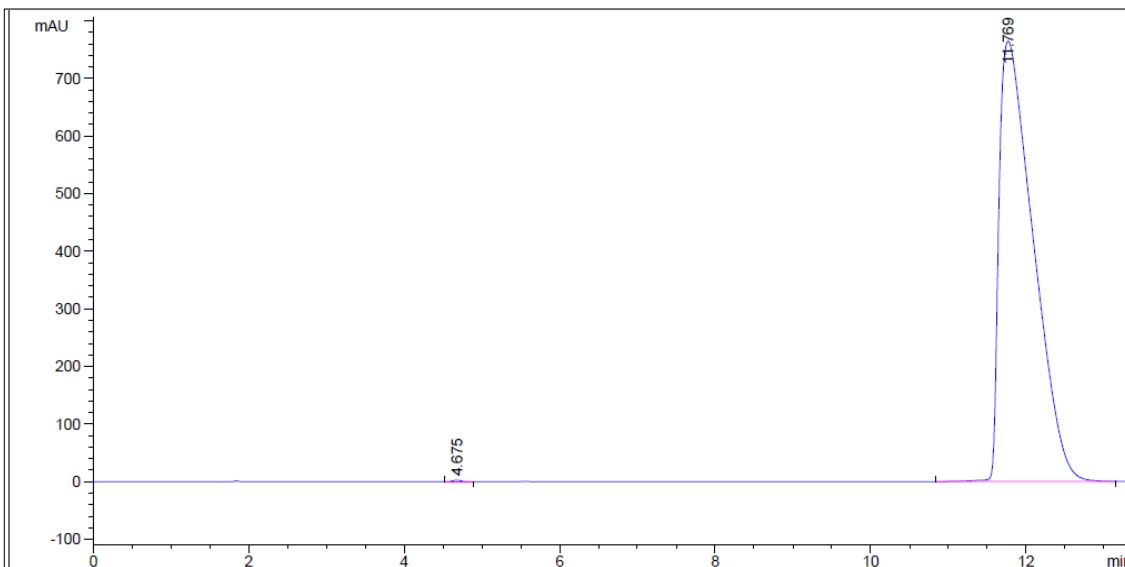
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.648	BB	0.1233	19.89807	2.50399	0.0873
2	11.773	BB	0.4642	2.29809e4	751.16516	99.9127

Totals : 2.30007e4 753.66915

Muestra Nº 2 125%



=====
Area Percent Report
=====

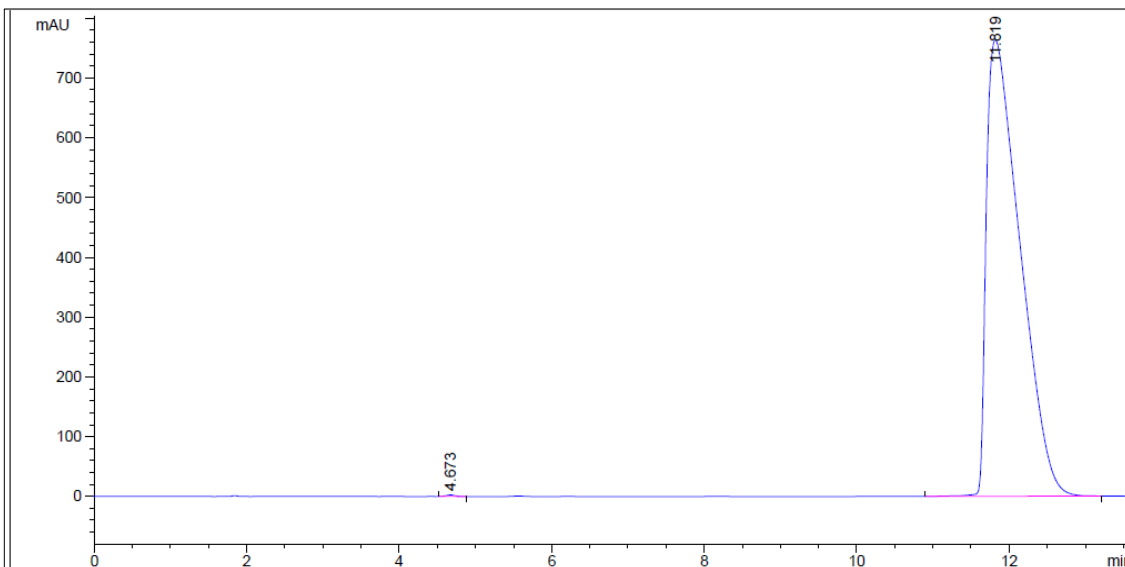
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.675	BB	0.1229	20.28821	2.56349	0.0871
2	11.769	BB	0.4543	2.32828e4	764.47351	99.9129

Totals : 2.33031e4 767.03700

Muestra N° 3 125%



=====
Area Percent Report
=====

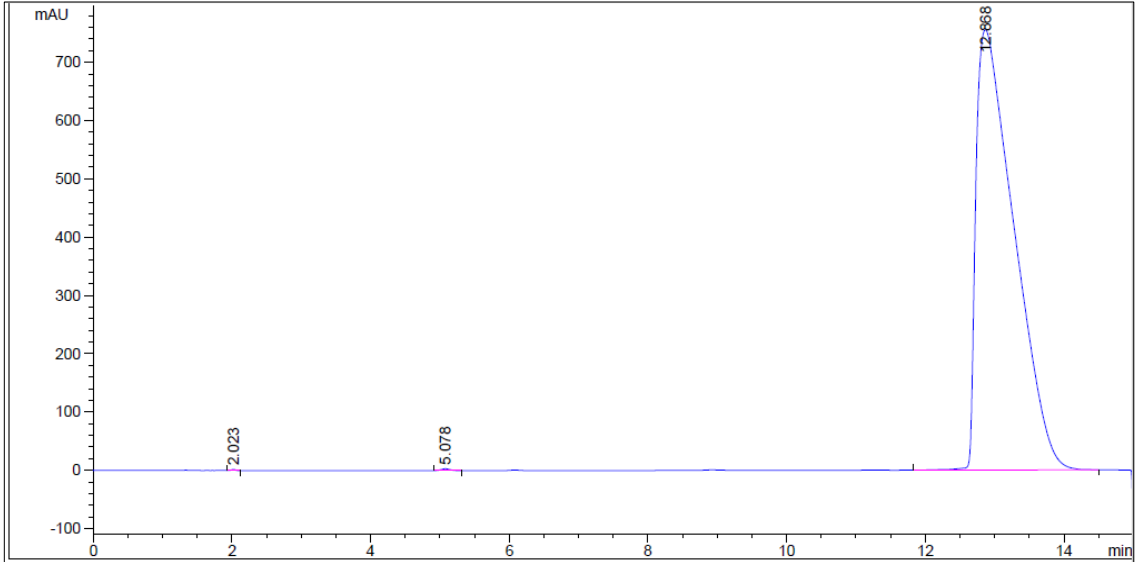
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.673	BB	0.1237	20.41188	2.55748	0.0873
2	11.819	BB	0.4648	2.33628e4	763.37781	99.9127

Totals : 2.33833e4 765.93529

Muestra N° 1 150%



=====
 Area Percent Report
 =====

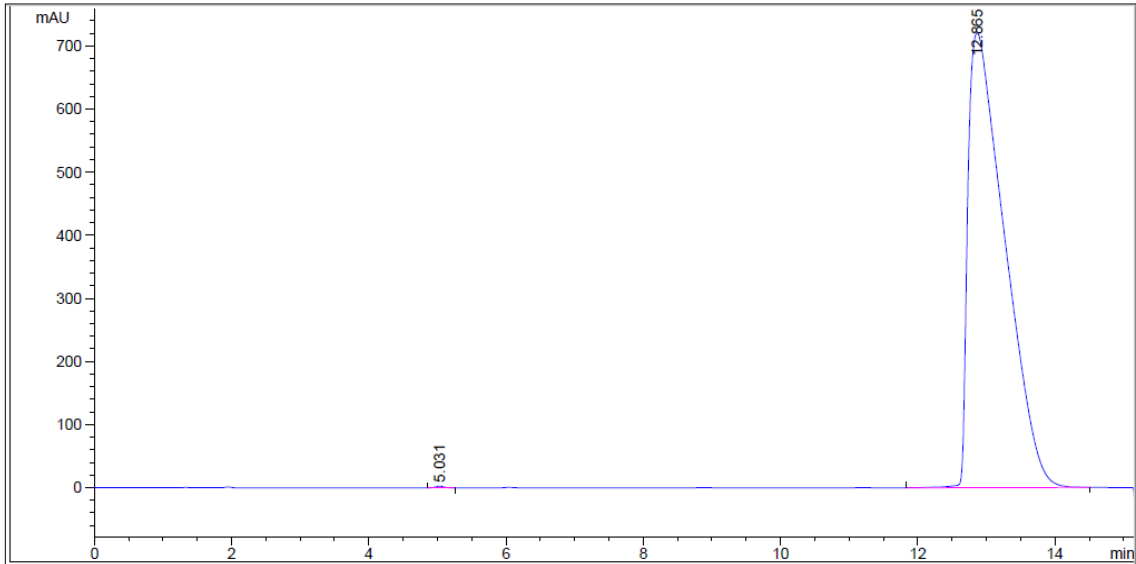
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.023	VB	0.0541	6.89004	1.95981	0.0240	
2	5.078	BB	0.1318	25.91527	3.03117	0.0901	
3	12.868	BB	0.5646	2.87285e4	755.28394	99.8859	

Totals : 2.87613e4 760.27491

Muestra N° 2 150%



=====
Area Percent Report
=====

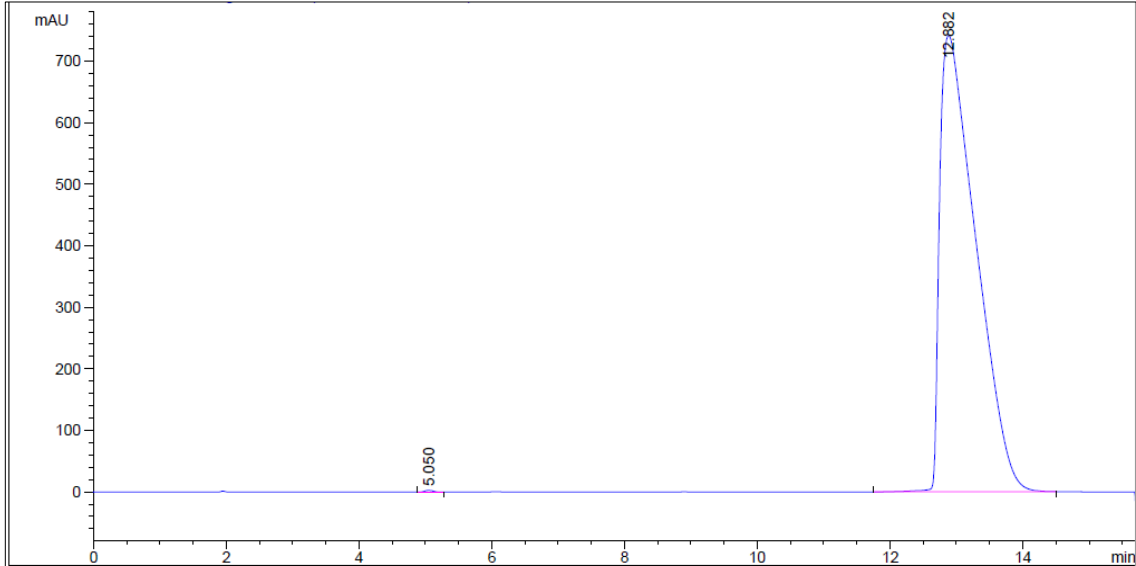
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	5.031	BB	0.1307	23.32688		2.75761	0.0871
2	12.865	BB	0.5434	2.77497e4		721.19629	99.9129

Totals : 2.77730e4 723.95390

Muestra N° 3 150%



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

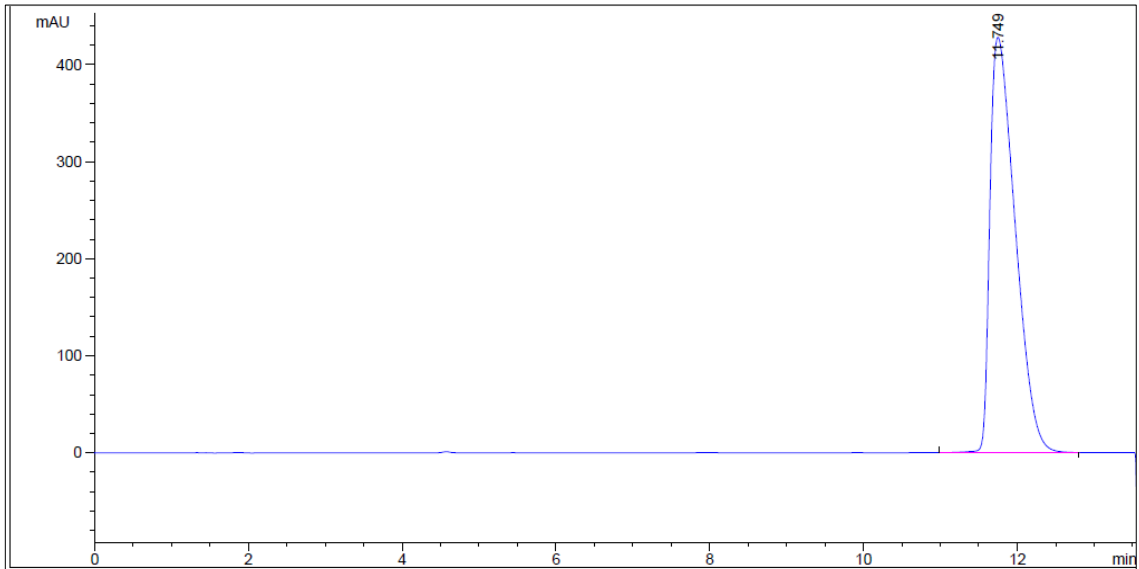
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	5.050	BB	0.1309	24.20471	2.85724	0.0863
2	12.882	BB	0.5588	2.80311e4	741.81952	99.9137

Totals : 2.80553e4 744.67676

ANEXO Nº 14
CROMATOGRAMAS DE LA DETERMINACION DE LINEALIDAD DEL
METODO EN ENSAYO

Muestra N° 1 50%



=====
Area Percent Report
=====

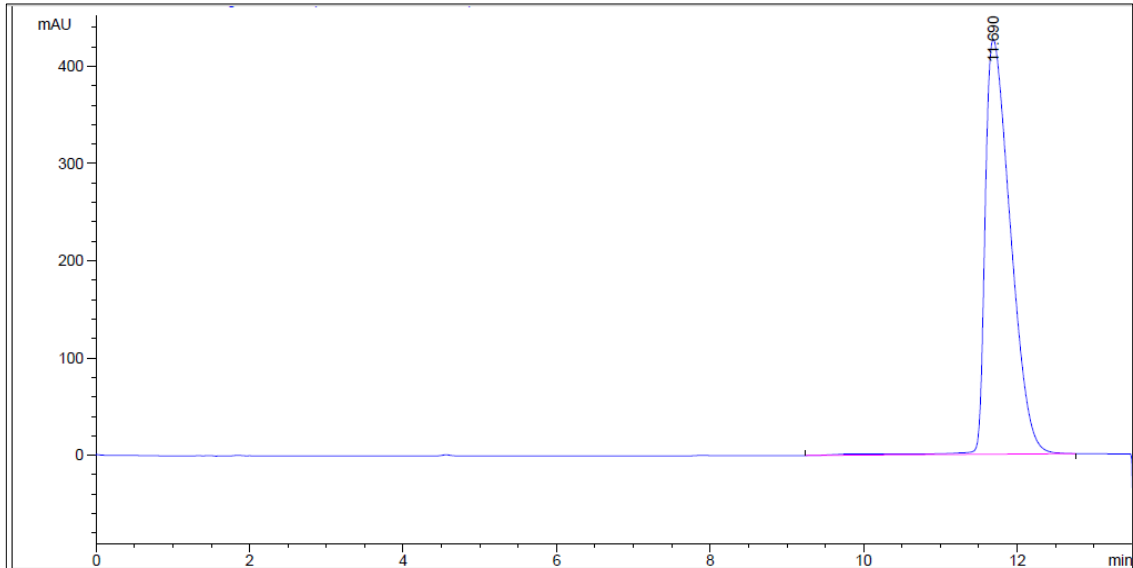
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.749	BB	0.3545	9747.25098	428.02094	100.0000

Totals : 9747.25098 428.02094

Muestra N° 2 50%



=====
Area Percent Report
=====

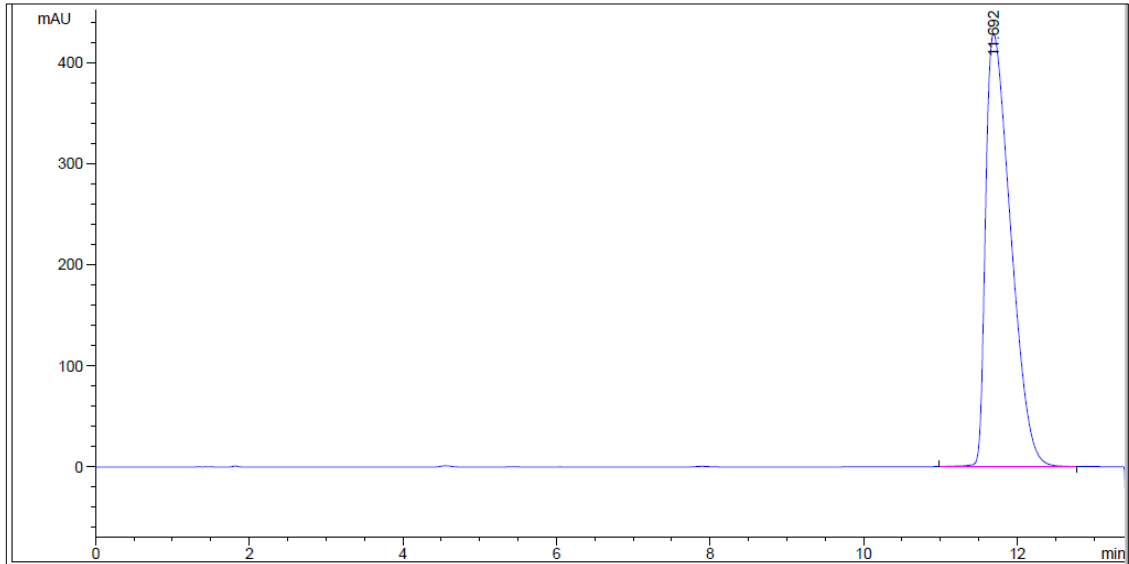
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.690	PB	0.3549	9775.29590	426.23227	100.0000

Totals : 9775.29590 426.23227

Muestra N° 3 50%



=====
Area Percent Report
=====

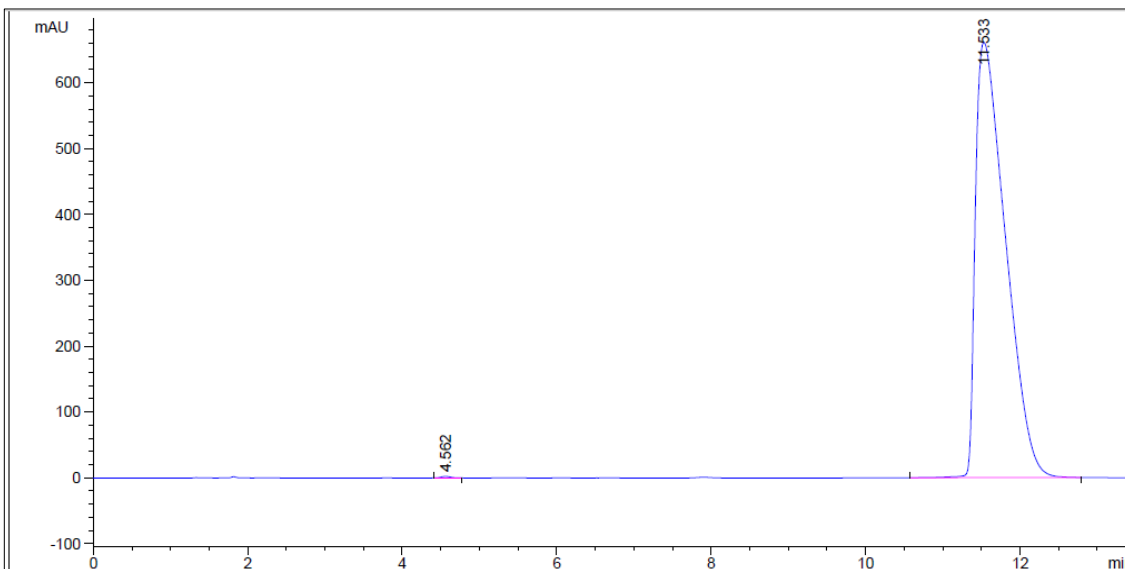
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	11.692	BB	0.3516	9700.68945	428.33362	100.0000

Totals : 9700.68945 428.33362

Muestra N° 1 100%



=====
Area Percent Report
=====

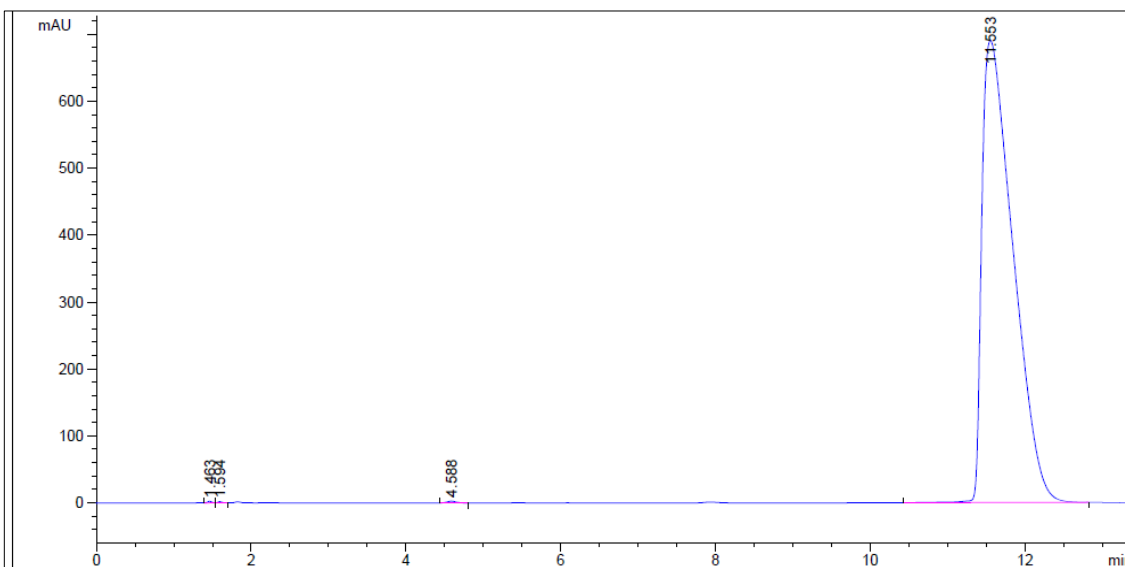
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.562	BB	0.1200	18.29457	2.34804	0.1023
2	11.533	BB	0.4100	1.91818e4	661.01862	99.8977

Totals : 1.92001e4 663.36665

Muestra N° 2 100%



Area Percent Report

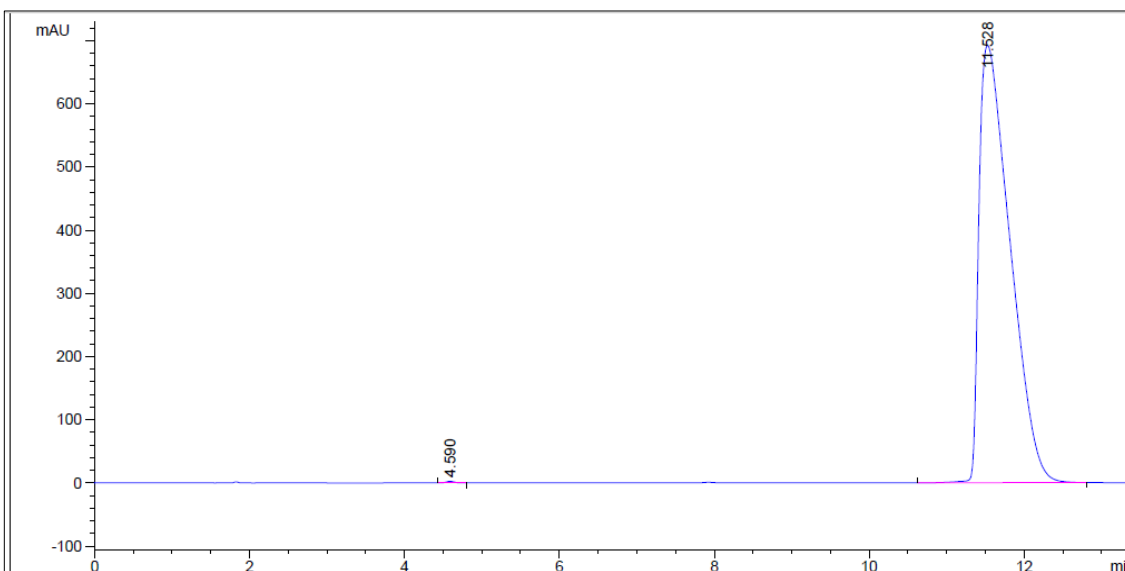
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.463	VV	0.0524	8.56785	2.45344	0.0445
2	1.594	VB	0.0514	6.22519	1.82570	0.0323
3	4.588	BB	0.1215	19.67148	2.52369	0.1021
4	11.553	BB	0.4212	1.92372e4	690.33789	99.8212

Totals : 1.92717e4 697.14072

Muestra N° 3 100%



=====
Area Percent Report
=====

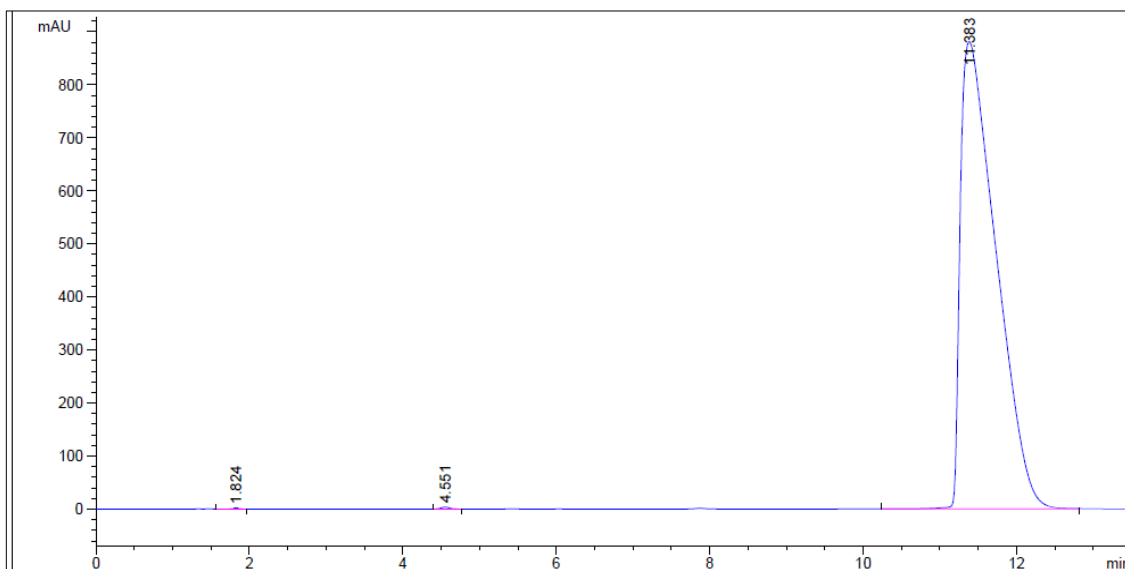
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	4.590	BB	0.1200	19.88840	2.55188	0.1033
2	11.528	BB	0.4204	1.92356e4	692.05414	99.8967

Totals : 1.92554e4 694.60602

Muestra N° 1 150%



=====
 Area Percent Report
 =====

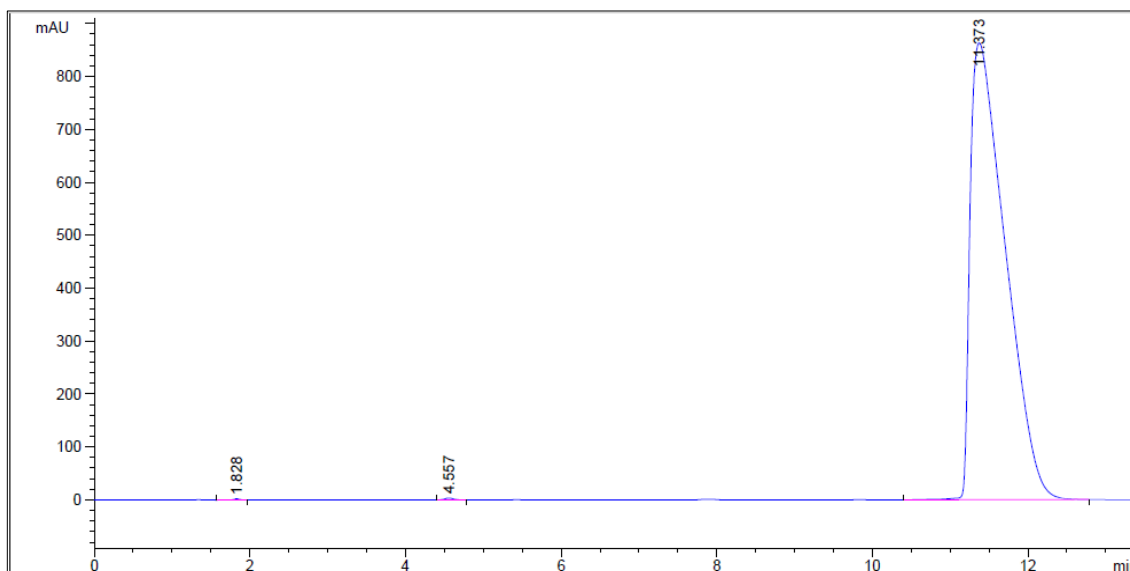
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.824	VB	0.0775	13.14363	2.49418	0.0463
2	4.551	BB	0.1195	29.58644	3.82085	0.1042
3	11.383	BB	0.4848	2.83597e4	880.92096	99.8496

Totals : 2.84024e4 887.23599

Muestra N° 2 150%



Area Percent Report

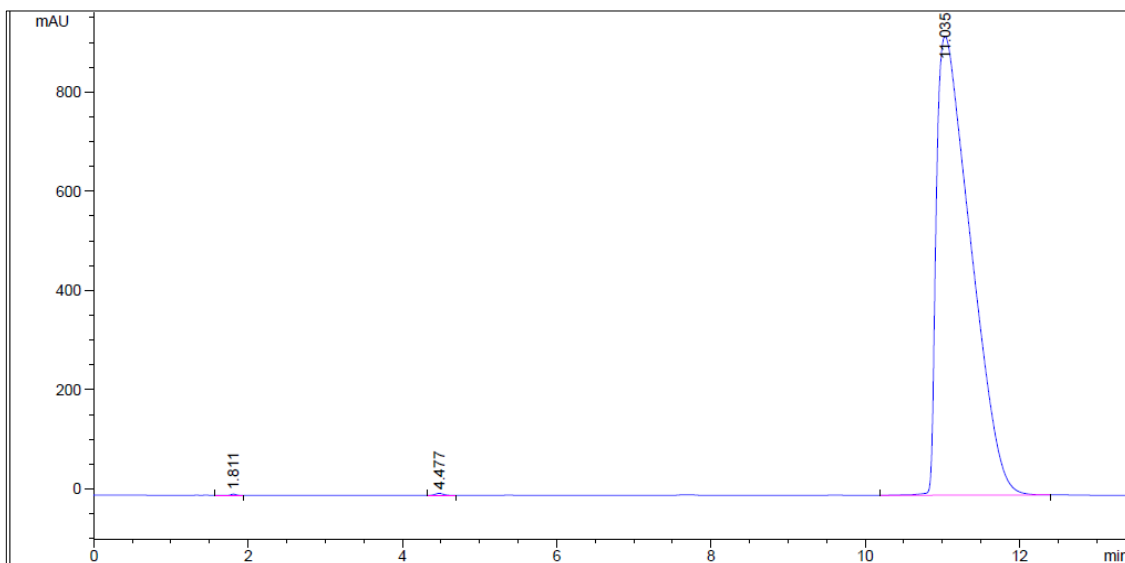
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.828	VB	0.0805	12.78488	2.36708	0.0472
2	4.557	BB	0.1213	28.07805	3.60902	0.1037
3	11.373	BB	0.4716	2.83658e4	862.94165	99.8490

Totals : 2.84067e4 868.91775

Muestra N° 3 150%



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=278 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.811	VB	0.0729	12.75284	2.61330	0.0449
2	4.477	BB	0.1175	29.62740	3.91004	0.1042
3	11.035	BB	0.4599	2.83785e4	924.87201	99.8509

Totals : 2.84209e4 931.39535

ANEXO N° 15
VARIABLES ESTADISTICAS A DETERMINAR Y CRITERIOS DE
ACEPTACION ⁽¹⁰⁾

PARAMETRO	VARIABLES A DETERMINAR	CRITERIOS DE ACEPTACION
Linealidad del Sistema	coeficiente de correlacion r	> 0.999
	coeficiente de determinacion r ²	> 0.980
	ecuacion de la recta (y= bx + a)	debe corresponder
	coeficiente de variacion de los factores de respuesta	< 2.00 %
	Error relativo %	< 2.00 %
	test de la existencia de pendiente significativa f -95%	
	(F exp > Ftab)	> 4.38
	Linealidad en la Regresion (F exp < F tab)	< 2.06
Linealidad del Metodo	coeficiente de correlacion r	> 0.999
	coeficiente de determinacion r ²	> 0.980
	ecuacion de la recta (y= bx + a)	debe corresponder
	coeficiente de variacion de los factores de respuesta	< 3.00 %
	Error relativo %	< 3.00 %
	Test de la Existencia de pendiente significativa F - 95 %	
	(F exp > Ftab)	> 4.38 %
	Linealidad en la Regresion (F exp < F tab)	< 2.06
Exactitud	Intervalo de Confianza (IC)	100 % dentro de IC
	Homogeneidad de varianzas con respecto a la respuesta	
	(Gexp < G tab)	< 0.5612
	Homogeneidad de varianzas con respecto al porcentaje de recuperacion (Gexp < G tab)	< 0.5612
	Porcentaje de Recuperacion en cada punto	97.0 % - 103.0 %
Precision	Coeficiente de variacion del % de Recuperacion	< 3.00 %
Repetibilidad y Reproducibilidad	Coeficiente de variacion de Repetibilidad	< 5.00 %
	Coeficiente de variacion de Reproducibilidad	< 5.00 %
Robustez	Homogeneidad de varianzas de las diferentes condiciones (G exp < G tab)	< 0.5321
	% de Recuperacion en cada punto - Robusto	90.0 % - 110.0 %
Estabilidad de la muestra analitica	Error relativo %	< 3.00 %
	% de Recuperacion en cada punto	90.0 % - 110.0 %
Selectividad	Lectura de placebo no detectable con respecto al LD	Debe corresponder
	Lectura de placebo no cuantificable con respecto al LC	Debe corresponder
	Promedio de % de Recuperacion del Placebo	< 3.00 %

ANEXO Nº 16
FORMULAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE
DESEMPEÑO ANALÍTICO ⁽¹⁰⁾

Ley de Beer

$$C_{mx} = \frac{A_{mx} \times C_{st}}{A_{st}} \times FD$$

Desviación estándar

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

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{1 / \sum X^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$S_b = \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)}$$

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{\frac{Y}{X}} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$$b_0 = \sqrt{\frac{\sum y - b_1 \sum x}{n-2}}$$

$T_{0.975, \dots, n-2}$ = Para determinar el valor de la t de Student.

$$S_{b_0} = S_{\bar{Y}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

$$C/V_{y/x} = s_{x/y} / \bar{Y} \times 100$$

$$IC(\mu) = \bar{Y} \pm t_{0.975, n-1} S / n^{-2}$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

N o n = número de mediciones

Coeficiente de determinación:

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