



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LOS
ENSAYOS DE POTENCIA Y DISOLUCIÓN DE
MOXIFLOXACINA EN TABLETAS.”**

LICENCIADA EN QUÍMICA KARLA A. LIMA S.

CARACAS, AGOSTO 2014



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA



POSTGRADO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LOS
ENSAYOS DE POTENCIA Y DISOLUCIÓN DE
MOXIFLOXACINA EN TABLETAS.”**

LICENCIADA EN QUÍMICA KARLA A. LIMA S.

Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para
optar al título de Especialista en Aseguramiento de la Calidad

TUTOR: Dra. MIRIAN REGNAULT

Número de Depósito Legal: Ift4872014615613



VEREDICTO

Quienes Suscriben, Miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Licenciada en Química **KARLA ANAISA LIMA SERRANO**, titular de la Cédula de Identidad N° V-18.030.014, bajo el título "**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LOS ENSAYOS DE POTENCIA Y DISOLUCIÓN DE MOXIFLOXACINA EN TABLETAS**".

1° Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los Miembros del Jurado, éste fijó el día 8 del mes de agosto del año 2014, para que la autora lo presentara en forma pública, lo cual hizo en el salón 701 del piso 7 de la Facultad de Farmacia, a las 10:30 a.m., mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el Jurado.

2° Finalizada la defensa pública del Trabajo Especial de Grado, el jurado decidió **Aprobarlo** por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por la **autora**, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado: Representa un aporte importante en el área de Aseguramiento de la Calidad de la Industria Farmacéutica Nacional. Por otra parte el jurado consideró el trabajo y su presentación como **EXCELENTE**.

En fe de lo cual se levanta la presente acta el día 08 del mes de agosto de 2014, dejándose constancia de que, conforme a lo dispuesto en la normativa jurídica vigente, actuó como Coordinadora del Jurado la Dra. Miriam Regnault.

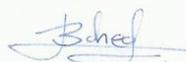
Firma del jurado examinador:



Dra. Miriam Regnault
Tutora-Coordinadora
C.I. 3.976.826



Dra. Aracelis Ortega
C.I. 1.982.171



Esp. Lizet Bou Rached
C.I. 6.878.269

ml. 08/08/2014



AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por darme cada día de vida, salud y por permitirme llegar a esta etapa de mis estudios. A mi madre por apoyarme siempre, por su cariño, amor, consejos e inculcarme que puedo lograr mis metas. A mi abuela que siempre estuvo allí y que desde el cielo me guía y cuida.

A la Profesora Miriam Regnault, por su apoyo, conocimientos y orientación en todo momento para el logro de los objetivos propuestos para la realización del presente trabajo.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera me apoyaron y me mostraron sus buenos deseos.

RESUMEN

Los Laboratorios Farmacéuticos deben demostrar que los productos que fabrican contienen exactamente la cantidad específica de activo químico necesario para obtener un producto de calidad. La validación es el proceso científico que lo logra y es un requerimiento indispensable que toda empresa debe cumplir, según las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la Farmacopea Americana (USP), y debe estar debidamente documentada, permitiendo asegurar que los métodos empleados en el análisis de un producto sean confiables.

En el presente trabajo se validó el método de análisis empleado por un laboratorio nacional de Control de Calidad para la determinación de Moxifloxacina de 400 mg en tabletas, empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Mediante el análisis de los parámetros respectivos, se concluyó que la validación permitió obtener resultados reproducibles, exactos y confiables. Los resultados para los ensayos de Potencia y Disolución se encontraron dentro de los criterios de aceptación y las pruebas estadísticas demostraron que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados comparados.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Aptitud del Sistema.....	3
Especificidad.....	3
Linealidad.....	4
Rango.....	4
Exactitud.....	5
Precisión.....	5
Límite de Detección.....	6
Limite de Cuantificación.....	7
Robustez.....	8
Potencia.....	10
Disolución.....	11
Objetivos	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Metodología	18
1. Materiales y métodos	18
1.1. Equipos y materiales.....	18
1.2. Reactivos y solventes.....	19
1.3. Patrón y muestra.....	19
1.4. Condiciones cromatográficas.....	19
1.5. Preparación de la fase móvil.....	20
1.6. Determinación del peso promedio.....	20

2. Validación	21
2.1. Ensayo de potencia	21
2.1.1. Aptitud del sistema.....	22
2.1.2. Especificidad.....	22
2.1.3. Linealidad e intervalo.....	23
2.1.4. Precisión.....	24
2.1.4.1. Precisión del sistema.....	24
2.1.4.2. Precisión del método.....	25
2.1.4.3. Reproducibilidad de muestras.....	25
2.1.5. Exactitud.....	25
2.1.6. Límite de detección.....	26
2.1.7. Límite de cuantificación.....	28
2.1.8. Robustez.....	28
2.2. Ensayo de disolución	29
2.2.1. Especificidad.....	31
2.2.2. Linealidad e intervalo.....	31
2.2.3. Precisión.....	32
2.2.4. Robustez.....	33
Resultados y Discusión	34
Conclusiones	73
Referencias bibliográficas	74
Anexo 1	79
Anexo 2	100

LISTADO DE TABLAS

Datos requeridos para la validación de un método analítico.....	1
Determinación de la precisión en la validación de un método analítico.....	5
Determinación del límite de detección en el proceso de validación de un método analítico.....	6
Determinación del límite de cuantificación en el proceso de validación de un método analítico.....	7
Cambio de columna.....	29
Criterios de aceptación para el ensayo de Disolución de un producto.....	30
Cambio de columna.....	33
Tabla I.- Condiciones para obtener un sistema apto para la validación del método de Moxifloxacina en tabletas de 400mg, utilizando una columna XTerra RP 18.....	34
Tabla II.- Concentración y áreas de los puntos correspondientes a la curva de linealidad para el ensayo de Potencia.....	37
Tabla III (A).- Áreas del estándar para evaluar la precisión del sistema en el método de Moxifloxacina en tabletas de 400mg para el ensayo de Potencia.....	38
Tabla III (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% para evaluar la precisión del sistema en el ensayo de Potencia.....	39
Tabla IV.- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la precisión del método en el ensayo de Potencia.....	40

Tabla V (A).- Áreas del estándar de Moxifloxacina para evaluar la reproducibilidad del método de Moxifloxacina en tabletas de 400mg para el ensayo de Potencia.....	41
Tabla V (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la reproducibilidad del método en el ensayo de Potencia.....	42
Tabla VI.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza a los resultados obtenidos en las tablas IV y V para el ensayo de Potencia.....	44
Tabla VII.- Porcentaje de Recuperación obtenido al evaluar el parámetro de exactitud para ensayo de Potencia.....	45
Tabla VIII.- Aplicación de la prueba t-Student a 95% de confianza para la evaluación de la exactitud en el ensayo de Potencia.....	47
Tabla IX.- Variables que conforman la ecuación de la recta, sus desviaciones estándar y desviación estándar de los ejes de coordenadas de la curva lineal para determinar los límites de detección y cuantificación.....	49
Tabla X.- Señal y concentración del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación teóricos.....	49
Tabla XI.- Mínima concentración de muestra detectada en el equipo. Límite Detección.....	51
Tabla XII.- Mínima concentración de muestra a ser cuantificada. Límite de Cuantificación.....	52
Tabla XIII.- Estudio de una columna Novapak C18 para la evaluación de la Robustez en el ensayo de Potencia.....	53

Tabla XIV A.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (estándar) para el ensayo de Potencia.....	55
Tabla XIV B.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (muestras) para el ensayo de Potencia.....	55
Tabla XV.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza para en estudio de la Robustez en el ensayo de Potencia.....	56
Tabla XVI.- Concentración y áreas de los puntos correspondientes a la curva de linealidad del ensayo de Disolución.....	59
Tabla XVII (A).- Áreas del estándar de Moxifloxacina para la determinación de Moxifloxacina en tabletas de 400mg en el ensayo de Disolución.....	60
Tabla XVII (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% en el ensayo de Disolución.....	60
Tabla XVIII.- Estudio de una columna Novapak C18 para la evaluación de la Robustez en el ensayo de Disolución.....	62
Tabla XIX A.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (estándar) para el ensayo de Disolución.....	64
Tabla XIX B.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (muestra) para el ensayo de Disolución.....	64
Tabla XX.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza para el estudio de la Robustez en el ensayo de Disolución.....	65
Tabla XXI A.- Determinación de potencia en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.....	66
Tabla XXI B.- Determinación de disolución en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.....	67

LISTADO DE FIGURAS

Estructura química de la Moxifloxacin.	12
Figura 1.- Cromatogramas de placebo, fase móvil, solvente, estándar y muestra para la evaluación de la Especificidad en el ensayo de Potencia.....	35
Figura 2.- Curva de linealidad del ensayo de Potencia.....	37
Figura 3.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión del Sistema en el ensayo de Potencia.....	39
Figura 4.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión del Método para el ensayo de Potencia.....	41
Figura 5.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión Intermedia en el ensayo de Potencia.....	43
Figura 6.- Cromatogramas de muestra y estándar para la evaluación del parámetro de exactitud en el ensayo de Potencia.....	45
Figura 7.- Curva de calibración de cantidad de Moxifloxacin pesado inicialmente y cantidad de Moxifloxacin recuperados para el ensayo de Potencia.....	47
Figura 8.- Curva de calibración para la determinación del Límite de Detección y Cuantificación.....	48
Figura 9.- Cromatograma de muestra a una concentración de 0,000029 mg/mL.....	50
Figura 10.- Mínima concentración a ser detectada en el equipo de HPLC (0,000052mg/mL).....	51

Figura 11.- Mínima concentración a ser cuantificada en el equipo de HPLC (0,00052mg/mL).....	52
Figura 12 A.- Muestras de Moxifloxacina a concentraciones de 80%, 100% y 120% con una columna Novapak C18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Potencia.....	54
Figura 12 B.- Muestras de Moxifloxacina a concentraciones de 80%, 100% y 120% con una columna XTerra RP18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Potencia.....	54
Figura 13.- Cromatogramas de placebo, solvente, fase móvil, medio de disolución, muestra y estándar para la evaluación de la Especificidad en el ensayo de Disolución.....	57
Figura 14.- Curva de linealidad para el ensayo de Disolución.....	58
Figura 15.- Cromatograma de muestra y estándar para la evaluación de la Precisión en el ensayo de Disolución.....	61
Figura 16 A.- Muestras de Moxifloxacina a concentraciones de 100% con una columna Novapak C18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Disolución.....	62
Figura 16 B.- Muestras de Moxifloxacina a concentraciones de 100% con una columna XTerra RP18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Disolución.	63
Figura 17 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg lote 22296.....	70
Figura 17 B.- Cromatograma de muestras de Disolución de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg lote 22296.....	70

Figura 18 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 23040.....	71
Figura 18 B.- Cromatograma de muestras de Disoluci3n de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 23040.....	71
Figura 19 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 24028.....	72
Figura 19 B.- Cromatograma de muestras de Disoluci3n de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 24028.....	72

INTRODUCCIÓN

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) requieren que los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de un producto farmacéutico, con especificaciones establecidas, cumplan normas adecuadas de exactitud y confiabilidad ^[1].

Todos los procedimientos analíticos empleados en el análisis de un fármaco deben ser evaluados y sometidos a pruebas para comprobar que producen resultados válidos y coherentes, cumpliendo con el objetivo al que están destinados y esto se logra mediante la validación.

La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos de un conjunto de parámetros de desempeño ^[1], haciendo al método más confiable, disminuyendo el número de fallas y la probabilidad de repetir los análisis, proporcionando un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados que se obtengan ^[2].

La USP ^[1] agrupa en cuatro categorías las pruebas farmacopeicas más habituales para los que se exigen datos de validación, las cuales se describen a continuación:

Datos requeridos para la validación de un método analítico ^[1].

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

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

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

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

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo: disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

Según la Conferencia Internacional Tripartita sobre la Armonización (siglas en inglés ICH) ^[3], los parámetros de desempeño para una validación se definen y determinan de la siguiente manera:

Aptitud del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y muestras analizadas constituyen un sistema que puede evaluarse. Los parámetros que deben establecerse dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando. Por ejemplo, este método es muy utilizado en cromatografía y es conocido como *system suitability* ^[3], a través del cual se determinan el número de platos teóricos (N), el factor de capacidad (k'), factor de cola o *Tailing*, resolución de los picos (Rs), etc.

Especificidad

La especificidad se define como la capacidad de distinguir el analito de interés en presencia de aquellos componentes que resultan ser previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. Las muestras también pueden ser sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo luz, calor, humedad, hidrólisis ácida y alcalina, oxidación) ^[3].

Linealidad

La linealidad de un método analítico es la habilidad de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo establecido. Si existe una relación lineal a simple vista, los resultados deben ser evaluados por métodos estadísticos, como por ejemplo regresión lineal. En algunos casos es necesario realizar otras operaciones matemáticas para obtener una regresión lineal. ^[3] El valor de éste parámetro determinará el intervalo de la valoración analítica. Puede expresarse como la pendiente de la curva de regresión y su varianza o como el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R) ^[4].

Rango

El intervalo de un método analítico es establecido para confirmar que un procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión. Los rangos que se deben considerar son los siguientes: *Potencia*: (80-120)% concentración, *Uniformidad de dosificación*: (70-130) % concentración, *Disolución*: $\pm 20\%$ por encima del intervalo especificado (por ejemplo, si las especificaciones 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 recomendado es de 0% a 110% del valor especificado en la etiqueta), *Determinación de impurezas*: hasta 120 % de especificación, *Pureza*: hasta 120% de especificación^[3].

Exactitud

La exactitud de un método analítico se define como la cercanía de un resultado obtenido a un valor considerado como verdadero ^[3]. Se evalúa realizando nueve (9) determinaciones de tres (3) concentraciones que cubren un rango específico (3 concentraciones de 3 réplicas cada una). Puede reportarse de dos formas diferentes, mediante el % Recuperación, que consiste en añadir una cantidad conocida de analito a las muestras, o mediante la diferencia entre el promedio y el valor aceptado como verdadero, considerando el intervalo de confianza ^[1, 3]

Para la *valoración del fármaco* se aplica el método analítico a un estándar de referencia, o también mediante la comparación del método aplicado con un segundo método de exactitud comprobada. Para *valoración del producto final* se aplica el método analítico a mezclas sintéticas añadidas al producto (esto se conoce como placebo) a las cuales se les agrega una cantidad conocida de principio activo diferente para cada réplica. Y para las *impurezas* se añade una cantidad cuantitativa de impureza a la muestra o se preparan soluciones de placebo + impureza ^[1, 3].

Precisión

La precisión de un método 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 ^[1]. Puede evaluarse de tres formas como se muestra a continuación.

Determinación de la precisión en la validación de un método analítico [1.]

Procedimiento analítico	Características de Validación	Definición	Procedimiento de Validación
<i>Pureza e Impureza</i>	<i>Repetibilidad</i>	Utilización del procedimiento analítico en un laboratorio en un período corto de tiempo, mismo analista y mismo equipo	9 determinaciones de 3 concentraciones (3 réplicas cada una), o 6 determinaciones al 100% de la concentración de prueba.
	<i>Reproducibilidad</i>	Uso del procedimiento analítico por diferente laboratorio	-
	<i>Precisión Intermedia</i>	Expresa la variación dentro de un laboratorio	Diferentes días. Diferentes analistas. Diferentes equipos.
	<i>Recolección de datos</i>	-	Desviación estándar.(s) Desviación estándar relativa. (DSR)

Límite de Detección (LOD)

El límite de detección es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada. [1] Existen diferentes formas de determinarlo como se muestra a continuación.

Determinación del límite de detección en el proceso de validación de un método analítico. ^[3]

Método	Determinación	Definición
<i>No-Instrumental</i>	<i>Evaluación visual</i>	Análisis de muestras de concentración conocida del analito, estableciendo el mínimo de analito que puede detectarse.
<i>Instrumental</i>	<i>Relación señal:ruido</i>	Comparación de la señal producida por una muestra de mínima concentración de analito con la señal producida por el blanco (placebo). Una relación 3 o 2:1 es aceptable.
	<i>Desviación Estándar</i>	Se determina por la siguiente ecuación. $LD = \frac{3.3\sigma}{S}$ Se debe tomar en cuenta: Desviación estándar del punto de corte de la curva de calibración (σ), Pendiente de la curva de calibración (S).

Límite de cuantificación (LQD)

El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas ^[1].

Determinación del límite de cuantificación en el proceso de validación de un método analítico. ^[3]

Método	Determinación	Definición
<i>No-Instrumental</i>	<i>Evaluación visual</i>	Análisis de muestras de concentración conocida de analito, estableciendo el mínimo de analito que puede cuantificarse.
Instrumental	<i>Relación señal:ruido</i>	Comparación de la señal producida por una muestra de mínima concentración de analito con la señal producida por el blanco. Una relación 10:1 es aceptable.
	<i>Desviación Estándar</i>	Se determina por la siguiente ecuación. $LQD = \frac{10\sigma}{S}$ Se debe tomar en cuenta: Desviación estándar del punto de corte de la curva de calibración (σ), Pendiente de la curva de calibración (S).

Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas en los parámetros del procedimiento y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso ^[1]. Las variaciones pueden ser: estabilidad de las soluciones, diferentes equipos, diferentes analistas, influencia de pH o composición de la fase móvil, diferente columna, flujo, temperatura ^[3].

Si el estudio de validación de una prueba analítica está bien planificado, se debe proceder a diseñar el **Protocolo de Validación**, el cual es un documento en donde se definen las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método. Dicho protocolo recolecta toda la información que permita demostrar que un método se desempeña uniformemente en conformidad con el nivel especificado. Debe contener: alcance de la validación (método, analito, matrices y requerimientos del método); diseño experimental (establecer la(s) muestra(s) a ser analizada(s), reactivos, blanco matriz, materiales certificados, material control, material(es) de referencia certificado, matrices de las muestras, etc); los parámetros y pruebas a desarrollar (en caso de que la prueba no sea una convencional, sino diseñada por el responsable, también deberá indicarse en el documento); número de análisis requeridos para cada prueba y/o parámetro; criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación; analista(s) responsable de realizar la(s) prueba(s) analítica(s); materiales, insumos y equipos necesarios para desarrollar la validación y responsable de la validación; fecha o tiempo programado para realizarla y fecha de elaboración del plan. Cualquier modificación realizada al protocolo, durante el proceso, debe quedar debidamente documentada. ^[5]

Los Laboratorios de Control de Calidad realizan una serie de ensayos para analizar la composición de un producto farmacéutico, los cuales son:

Potencia

Consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si los valores obtenidos corresponden con las especificaciones del producto. [6]

Para determinar la **Potencia** de un fármaco es necesario conocer algunas variables como los pesos de muestra, peso del estándar y su potencia, volúmenes de dilución, cantidad declarada del producto y peso promedio de un número específico de 20 tabletas.

El peso se relaciona con las dimensiones de las tabletas y la cantidad de fármaco que contienen con respecto a la fórmula maestra del producto. Se puede chequear la cantidad de fármaco verificando durante el proceso el peso de un número establecido de tabletas en forma individual, hallando la media y comparando los pesos individuales con esta. La diferencia de peso entre las tabletas puede deberse a variación que se produce en el proceso de fabricación, ya sea mal mezclado, etc. Para establecer un límite de peso promedio se puede considerar entre un 3% o 5% por encima y por debajo del valor medio. [7]

Disolución

La disolución es una prueba físicoquímica que determina la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones

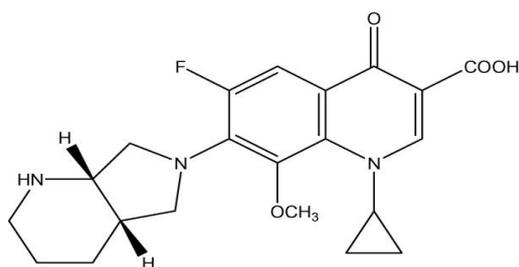
estandarizadas de la interfase líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente. El procedimiento de disolución requiere un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método suficientemente discriminatorio, tolerante, reproducible día a día y capaz de ser transferido entre laboratorios. Para escoger el medio de disolución se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, valor de pH y surfactantes en la solubilidad y estabilidad de la droga. Los medios típicos para la disolución son: ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras en el rango fisiológico de pH (1.2-7.5), fluido gástrico simulado o fluido intestinal (con o sin enzimas), agua y surfactantes (con o sin ácidos ó buffers), sales biliares. ^[8]

Una de las técnicas de análisis más utilizadas en la industria farmacéutica para el análisis de muestras es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en donde los componentes de una mezcla son eluidos través de una fase estacionaria, fijada dentro de una columna, mediante el flujo de una fase móvil líquida. Las separaciones dependen de la naturaleza de los analitos y su interacción con las fases. Una separación en *fase normal* ocurre cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar, y una separación en *fase reversa* es cuando la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. Esta última es la más utilizada ^[9]

Una efectiva separación se logra cuando se obtienen las condiciones adecuadas de separación de los diferentes componentes que conforman la muestra, como son: mayor número de platos teóricos (N), es decir, mayor número de equilibrios o interacciones entre el analito y las fases; menores tiempo de retención dentro de la columna; la resolución de los picos debe ser mayor a 1; el factor de capacidad (k')

debe ser mayor a 1 y menor a 20 ya que indica cuan retenido es el analito por la columna; el factor de selectividad (α) debe ser mayor a 1, e indica que tan retenido es un analito con respecto a otro; y la preparación adecuada de la fase móvil, la cual puede ser un solvente o una mezcla de solventes. Un equipo de HPLC está constituido por los reservorios de eluyente o fase móvil, una bomba (que puede ser binaria o cuaternaria), un degasificador, un automuestreador o inyector manual, la columna, el detector (UV-visible, fluorescencia o de onda variable o arreglo de fotodiodo (PDA)), el desecho y el sistema de registro de datos. [9]

El fármaco que interesa estudiar en el presente trabajo es la moxifloxacin, la cual se usa para tratar determinadas infecciones bacterianas como la neumonía, la bronquitis y las infecciones de los senos paranasales y la piel. Pertenece a una clase de antibióticos llamados fluoroquinolonas. Actúa eliminando las bacterias que causan las infecciones. No sirve para tratar los resfriados, la gripe ni otras infecciones virales. La Moxifloxacin se presenta en el mercado como tabletas (para administrarse por vía oral) y gotas oftalmológicas. [10]



Estructura química de la Moxifloxacin [12].

Varios trabajos han sido realizados para validar y optimizar las condiciones adecuadas de obtención de moxifloxacin en diferentes muestras. A continuaci3n se mencionarn algunos de ellos.

Nguyen y col. (2004) ^[11] determinaron simultáneamente levofloxacin, gatifloxacin y moxifloxacin en suero del plasma sanguíneo empleando la técnica de HPLC. Inicialmente se optimizaron las condiciones ideales de separaci3n encontrando una mayor resoluci3n de los picos usando una precolumna LiChroCART 4-4 RP-18 acoplada a una columna Supelcosil ABZ+Plus, la fase móvil consistió en una mezcla Buffer KH_2PO_4 a pH 2,5 y Acetonitrilo (88:12) y 2mM de bromuro de tetrabutilamonio (para evitar la interacci3n de la Levofloxacin y Gatifloxacin con los grupos sinalones de la columna a pesar de estar recubierta), se utiliz3 un detector por fluorescencia y el proceso de validaci3n permiti3 demostrar que el método desarrollado fue selectivo, sensible y confiable.

Laban-Djurdjevi3 y col. (2006) ^[12] optimizaron y validaron un método para la determinaci3n de moxifloxacin por la técnica de HPLC en plasma sanguíneo. La extracci3n de la moxifloxacin del plasma se realiz3 usando una columna Supelco LC-Hisep , la fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y Na_3PO_4 a pH 3 (5:95), una velocidad de flujo de 1 mL/min y un sistema de detecci3n de fluorescencia. El método fue validado y mediante los parámetros de % de recuperaci3n, coeficiente de correlaci3n, linealidad, límite de detecci3n y cuantificaci3n, se demostr3 que la técnica analítica fue confiable y puede ser usado en los estudios de farmacocinética del principio activo.

Motwani y col. (2007) ^[13] validaron métodos espectrofotométricos para la estimaci3n de moxifloxacin en productos a granel y terminados. La moxifloxacin fue analizada en una soluci3n de ácido clorhídrico 0,1N (pH 1,2) a 296 nm y en una soluci3n de buffer fosfato (pH 7,4) a 289 nm. Al realizar análisis estadísticos se

demostró que los resultados no presentaron diferencias estadísticas. Mediante la validación se demostró que los procedimientos fueron exactos, precisos y reproducibles, por otro lado simples, económicos, consumen menos tiempo de análisis y pueden ser aplicados a diferentes presentaciones del producto (tabletas, gotas para los ojos, infusiones).

Djurđjević y col. (2009) ^[14] optimizaron la separación y determinación de moxifloxacin y sus compuestos relacionados por RP-HPLC en muestras de sangre. El procedimiento fue desarrollado para la determinación de impurezas en productos terminados e infusiones y para la determinación de compuestos de degradación en estudios de estabilidad de moxifloxacin. Las condiciones de separación fueron las siguientes: una columna Waters C₁₈ XTerra a 45°C, una fase móvil constituida por una mezcla (agua + trietilamina 2%): acetonitrilo 90:10 a un pH 6,0 ajustado con ácido fosfórico, una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y un detector de UV a 290nm.

Xu y col. (2010) ^[15] validaron y aplicaron un método para la determinación de moxifloxacin utilizando HPLC con detección ultravioleta en muestras de sangre. Utilizaron una columna Kromasil C8, una fase móvil constituida por acetonitrilo, metanol y KH₂PO₄ a pH 3.0 (15:20:65) con una pequeña cantidad de trietilamina y utilizando un detector de arreglo de diodos a 296nm. La validación indicó una excelente especificidad, selectividad, exactitud, precisión y estabilidad.

Khan y col. (2012) ^[16] desarrollaron y validaron un método por HPLC para la determinación simultánea de cuatro dímeros fluoroquinolones como potencial agente antibacterial. Las muestras fueron sometidas a reacciones de hidrólisis, oxidación, y degradación térmica. Para la separación se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 a 45 °C, una fase móvil constituida por metanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA) (85:15:0,1) y un detector PDA a 285nm. El proceso de validación demostró que el

método fue específico y estable y que no existe un método único para la determinación de los dímeros.

En la industria farmacéutica es necesario utilizar métodos confiables que permitan demostrar la calidad del producto fabricado, por ello se han creado diferentes farmacopeas (USP, EP, BP o la Japonesa) que establecen normas, procedimientos y métodos oficiales que ayudan a garantizar la calidad y seguridad de los medicamentos. Sin embargo, en algunos casos no existen métodos analíticos publicados para la determinación de un principio activo en diferentes presentaciones (tabletas, soluciones, etc), por esta razón los laboratorios farmacéuticos se han visto en la necesidad de desarrollar sus propios métodos y validarlos, para garantizar que cumplen con las especificaciones establecidas.

Al revisar tanto la Farmacopea Americana (USP34-NF29 y USP 36-NF31) como la Farmacopea Europea y Británica (EP Y BP), se observó que sólo existen métodos para la determinación de Moxifloxacina en materia prima o en solución oftálmica y no en forma de tabletas, es por ello que la empresa en donde se realizó el trabajo se vio en la necesidad de desarrollar su propio método analítico que requiere de la validación para cumplir con los requerimientos establecidos por las autoridades regulatorias del país a las industrias farmacéuticas. El presente trabajo de investigación consistió en la validación de un método analítico (desarrollado por un laboratorio farmacéutico que fabrica productos genéricos), para la determinación de Moxifloxacina en tabletas de 400mg, empleando la técnica de HPLC.

El proceso de validación es un requerimiento indispensable que toda industria farmacéutica debe cumplir, según las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la Farmacopea Americana de los Estados Unidos

(USP), para asegurar que el producto fabricado y el método de análisis empleado sean confiables.

Para la realización de este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Validar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de Moxifloxacin en tabletas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Elaborar un protocolo de validación para el método analítico planteado.
- 2.- Determinar los parámetros de validación para el método planteado de Moxifloxacin en tabletas.
- 3.- Aplicar el método validado para la determinación de Moxifloxacin en tabletas, en el ensayo de potencia.
- 4.- Aplicar el método validado para la determinación de Moxifloxacin, para el ensayo de disolución.
- 5.- Aplicar el método validado en 3 lotes del producto para verificar si cumple con las especificaciones establecidas.

METODOLOGÍA

La metodología validada en el presente trabajo fue la técnica usada para la determinación de Moxifloxacin en tabletas de 400mg, la cual fue desarrollada por el Laboratorio de Control de Calidad de una industria farmacéutica que elabora productos genéricos.

1. Materiales y métodos.

1.1. Equipos y materiales.

Los equipos utilizados en el siguiente trabajo fueron una Balanza Analítica modelo Santorius MPower (máx 210 g y d: 0,1 mg), pHmetro marca Metrohm 827 pH Lab, ultrasonido marca Elmasonic E60H, plancha de calentamiento y agitación marca Cinarec Barnstead Thermolyne, bomba de extracción al vacío modelo GARTP101-EB, equipo de agua MilliQ marca Ultra Pure Water System MiliQ Plus a 18,2 Ω /cm, disolutor (usando paletas) marca Euweka DT6 y cromatógrafo de HPLC modelo Modular 717 con sistema de bomba cuaternario y detector UV Dual λ serie 2487 marca Waters (Cienvar – Venezuela). El software utilizado para integrar los picos cromatográficos obtenidos y procesar los datos fue el Empower System (Cienvar – Venezuela).

Los materiales de vidrio utilizados fueron balones de 6000 mL, 500 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL y 10 mL (todos clase A), pipetas volumétricas de 4 mL y 2 mL (clase A), pipetas graduadas de 10 mL y 0,5

mL, cilindro graduado de 2000 mL, bureta de 10 mL y beaker o vaso precipitado de 250 mL.

1.2. Reactivos y Solventes.

Grado HPLC: metanol y acetonitrilo (marca Merck, Alemania).

Grado reactivo: ácido metanosulfónico (marca Merck, Alemania), fosfato tribásico de sodio dodecahidratado (marca J. T. Baker Analyzed, Mexico), ácido fosfórico (marca J. T. Baker, Estados Unidos) y ácido clorhídrico (marca Merck, Alemania)

1.3. Patrón y muestra.

El estándar utilizado fue Moxifloxacina Clorhidrato (marca USP: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland-USA) lote F0H454, (fecha de expiración Enero 2014, fabricado en Alemania). Las muestras evaluadas de Moxifloxacina 400 mg en tabletas fueron muestras de retención del laboratorio, lote 24027 con fecha de vencimiento de Octubre 2016.

1.4. Condiciones cromatográficas.

Cada uno de los parámetros de validación del presente trabajo fueron evaluados bajo las condiciones de HPLC desarrolladas por el Laboratorio para la determinación de Moxifloxacina en tabletas. Se empleó una columna XTerra RP 18 5µm 3.9x150mm marca Waters lote 0220322301, una fase móvil tipo fase reversa conformada por una mezcla buffer de fosfato de sodio

dodecahidratado: acetonitrilo: metanol: ácido metanosulfónico en proporciones de (50:25:25:1) a pH 5,5; longitud de onda 295 nm, velocidad de flujo de 0,8 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL.

1.4.1. Preparación de la fase móvil

La fase móvil se preparó de la siguiente manera: se pesó 22,80 g buffer de fosfato tribásico de sodio dodecahidratado ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) en 3000 mL de agua destilada y se llevó a pH 5,50 con o-ácido fosfórico. Luego se mezcló con 1500 mL acetonitrilo, 1500 mL metanol y 6 mL ácido metanosulfónico. Fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm x 47 mm marca HV Durapore, mediante el uso de una bomba de vacío y desgasificada mediante el uso de ultrasonido.

1.5. Determinación del peso promedio.

Una de las variables que debe tomarse en cuenta para la determinación de la cantidad de analito en la muestra (potencia) es el peso promedio. Según la técnica desarrollada para la determinación de Moxifloxacina en tabletas el peso promedio de tabletas recubiertas debe estar en un rango de (782,8 – 865,2) mg por tableta. Dicho intervalo fue obtenido a través de la fórmula maestra del producto ^[7].

Al pesar un total de 20 tabletas se obtuvo un peso promedio de:

Peso Promedio de tabletas de Moxifloxacina: 848,58 mg RSD: 0,69%

2. Validación.

2.1. ENSAYO DE POTENCIA.

Según la USP 36 ^[17], las especificaciones para el contenido de Moxifloxacin en soluciones oftalmológicas se encuentra entre (90-110) %, en base a esto, se tomó dicha especificación para el análisis de tabletas.

La metodología a validar, utilizada para preparar el estándar y las muestras para el ensayo de potencia fue la siguiente:

Preparación del Solvente: en un recipiente adecuado se mezcló 2000mL de agua + 1000mL acetonitrilo + 1000mL de metanol.

Preparación del estándar: pesar 25,0 mg de Moxifloxacin Estándar de Referencia en un balón de 100mL, disolver con solvente, llevar a volumen y mezclar. Tomar una alícuota de 2mL y llevar a un balón de 25mL con solvente. (Concentración final: 0,02 mg/mL; representa el 100%)

Preparación de muestra: pesar el equivalente a 25mg de Moxifloxacin en un balón de 100mL, disolver con solvente, llevar a volumen y mezclar. Tomar una alícuota de 2mL y transferir a un balón de 25mL, llevar a volumen con solvente y mezclar. (Concentración final: 0,02 mg/mL; representa el 100%).

Para conocer cuánto de muestra real había que pesar se utilizó una relación entre el peso promedio de las tabletas, el equivalente en peso y el valor declarado, obteniéndose que realmente se debía pesar 53,0 mg de polvo de tableta (ver ecuación de cálculo en anexo 1).

Placebo: Mezcla sintética de los excipientes que se encuentran en la tableta, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Control de Calidad donde fue realizado el estudio.

2.1.1. Aptitud del sistema.

Se inyectó una solución de estándar al 100% de concentración para determinar el número de platos teóricos (N), el factor de capacidad (k') y el factor de *Tailing* o de cola para comprobar que las condiciones a las que se va a trabajar son las adecuadas.

2.1.2. Especificidad.

Se preparó el estándar y la muestra como se menciona en el punto 2.1. Adicionalmente se preparó una solución de placebo pesando 53,0 mg de la mezcla de excipientes en un balón de 100 mL, completar a volumen con solvente, se tomó una alícuota de 2 mL, se transfirió a un balón de 25 mL y se llevó a volumen con solvente.

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas, se inyectó por triplicado muestra, placebo, fase móvil y solvente. El estándar se inyectó seis veces.

Criterio de aceptación: La fase móvil, el solvente y el placebo no deben interferir en la lectura del estándar y muestra, ni presentar en sus cromatogramas lecturas similares a la solución de referencia ^[3].

2.1.3. Linealidad e Intervalo.

Se prepararon soluciones estándar a 5 niveles de concentración (80%, 90%, 100%, 110% y 120%) ^[1], partiendo de una solución *stock madre*, luego se realizaron las diluciones correspondientes para cada nivel de concentración. Se determinaron las áreas de cada solución estándar empleando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. Se registraron mediante una gráfica los resultados obtenidos, la cual incluyó la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la curva de calibración y la suma de los cuadrados residuales.

Solución stock madre (SSM): se pesaron 25,4 mg estándar de Moxifloxacina Clorhidrato USP y se llevaron a un balón de 100 mL con solvente. (Concentración final: 0,25 mg/mL).

Solución 80%: Tomar 1,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,016 mg/mL)

Solución 90%: Tomar 1,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,018 mg/mL)

Solución 100%: Tomar 2,0 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente.
(Concentración Final: 0,020 mg/mL)

Solución 110%: Tomar 2,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente.
(Concentración Final: 0,022 mg/mL)

Solución 120%: Tomar 2,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente.
(Concentración Final: 0,024 mg/mL)

Criterio de aceptación: r^2 : (0,98-1,00) ^[18]

2.1.4. Precisión.

Criterio de aceptación: Desviación estándar relativa <2% ^[19]

2.1.4.1. Precisión del sistema.

Se prepararon seis muestras al 100% de concentración, según la metodología planteada (punto 2.1), cuyos pesos fueron 53,1 mg, 53,2 mg, 53,5 mg, 53,0 mg, 53,0 mg y 53,0 mg y se inyectó cada una por triplicado. También se preparó una solución de estándar al 100% como se indica en el punto 2.1 pesando 25,4 mg de estándar.

2.1.4.2. Precisión del método

Se prepararon tres soluciones de muestras de diferentes concentraciones con tres réplicas cada una, las cuales fueron de 80% (42,5 mg, 42,8 mg y 42,4 mg), 100% (53,0 mg, 53,0 mg y 53,0 mg) y 120 % (63,6 mg, 63,7 mg y 63,6 mg). Se inyectaron cada una por triplicado junto con el mismo estándar preparado en el apartado anterior (el cual se inyectó seis veces).

2.1.4.3. Reproducibilidad de las muestras.

Las mismas muestras preparadas anteriormente fueron almacenadas en la nevera por dos días y se midieron en el equipo de HPLC al día siguiente.

2.1.5. Exactitud.

Se prepararon tres niveles de concentración (50%, 100% y 150%) con tres réplicas cada una de placebo + principio activo, los cuales fueron pesados por separado. Las proporciones en que se pesaron tanto placebo como principio activo se determinaron a partir de la fórmula cuali-cuantitativa o fórmula maestra del producto y se determinó la cantidad equivalente en peso para preparar cada concentración. Se utilizó una materia prima de Moxifloxacina Clorhidrato Lote 31856, potencia 99,96% BH, vence: Mayo 2016 y fabricado por Europharma.

Solución de 50 %: se pesó 5,7 mg, 5,2 mg y 5,9 mg de placebo y 6,3 mg, 6,2 mg y 6,5 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes.

Solución de 100 %: se pesó 11,8 mg, 11,8 mg y 11,8 mg de placebo y 13,2 mg, 13,2 mg y 12,7 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes.

Solución de 150 %: se pesó 17,6 mg, 17,2 mg y 17,7 mg de placebo y 19,7 mg, 23,6 mg y 19,7 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes.

Se determinó el porcentaje de recuperación de las nueve determinaciones, se graficó la cantidad de muestra pesada en función de la cantidad de muestra recuperada para observar una tendencia lineal.

Criterio de aceptación: Porcentaje de recuperación: (98,0 – 102,0) % ^[19]

2.1.6. Límite de detección.

Se prepararon un total de 10 placebos en las mismas condiciones presentadas en el punto 2.1 para preparar las muestras, estos fueron inyectados en el equipo, pero no produjeron una señal que pudiera ser cuantificada, ya que se confundía con el ruido de fondo del equipo, es por ello que se utilizó otro método para estimar el límite de detección. Se construyó una curva de calibración de cinco niveles de concentración de estándar por debajo de los utilizados en la curva de linealidad, a partir de la

solución *stock madre* de estándar (SSM) preparada en el punto 2.1.3. Para la determinación del límite de detección se tomó en consideración el valor de la pendiente de la ecuación de la recta y de la desviación estándar del punto de intersección de la curva.

Solución 5%: 0,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,001 mg/mL)

Solución 15%: 1,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,003 mg/mL)

Solución 30%: 2,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,006 mg/mL)

Solución 45%: 3,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,009 mg/mL)

Solución 60%: Tomar 4,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,012 mg/mL)

Una vez estimado el Límite de detección, se utilizó la ecuación de la recta para determinar su concentración a través del método de regresión lineal. Se preparó una solución de muestra con dicho valor y se inyectó en el equipo. Al obtener el cromatograma de muestra se comparó con el cromatograma de placebo y se determinó la relación señal/ruido.

Criterio de Aceptación: El límite de detección corresponde a 3,3 veces la desviación estándar del punto de intersección con el eje de las ordenadas en relación a la pendiente de la curva de calibración; el cual no es cuantificado, sino detectado por el equipo de Cromatografía Líquida (HPLC) [3].

2.1.7. Límite de cuantificación.

Se utilizó la misma curva del punto 2.1.6 y se realizaron los mismos cálculos. Se preparó una solución de muestra por encima de la del límite de detección y se inyectó en el equipo por triplicado.

Criterio de Aceptación: El límite de cuantificación corresponde a 10 veces la desviación estándar del punto de intersección con el eje de las ordenadas en relación a la pendiente de la curva de calibración, las cuales son cuantificadas [3].

2.1.8. Robustez.

Se procedió a realizar un cambio en las condiciones cromatográficas, en este caso un cambio de columna.

Cambio de columna.

<i>Columna Inicial</i>	<i>Columna de cambio</i>
X Terra RP 18 5µm 3.9 x 150 mm Marca Waters	NovaPak C18 4 µm 3.9 x 150 mm Marca Waters

Criterio de aceptación: Los resultados obtenidos de las muestras analizadas bajo las nuevas condiciones en comparación con las de operación normal deben tener una diferencia <2% y RSD <2%.^[1].

2.2. ENSAYO DE DISOLUCIÓN Tolerancia: Q mínimo 80% ^[20] en 45 min.

Condiciones: Medio de disolución: Ácido Clorhídrico 0,1 N; volumen por vaso: 900 mL; aparato: 2 (paletas); velocidad de disolución: 45 r.p.m; tiempo de disolución: 45 min.

Condiciones de HPLC: misma de potencia.

La metodología a validar, utilizada para preparar el estándar y las muestras para el ensayo de disolución fue la siguiente:

Preparación del Solvente: en un recipiente adecuado se mezcló 2000mL de agua + 1000mL acetonitrilo + 1000mL de metanol.

Preparación del estándar: 10 mg de Moxifloxacina Estándar de Referencia en un balón de 50 mL, disolver con medio de disolución, llevar a volumen y mezclar. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un balón de 10 mL, llevar a volumen con solvente. (Concentración final: 0,08 mg/mL; representa el 100%).

Preparación de muestra: Colocar una tableta de Moxifloxacina en cada vaso de disolución que contiene 900 mL del medio de disolución, después de haber transcurrido el tiempo, tomar una porción, filtrar y medir una alícuota de 2 mL, transferir a un balón de 10 mL, agregar 2 mL de medio de disolución y llevar a volumen con solvente. (Concentración final: 0,08 mg/mL; representa el 100%).

Criterio de aceptación ^[21]

Criterios de aceptación para el ensayo de Disolución de un producto.

<i>Etapa</i>	<i>Numero de pruebas</i>	<i>Criterio de aceptación</i>
S_1^*	6	Cada unidad no menor a $Q^{**} + 5\%$
S_2^*	6	Promedio de $(S_1 + S_2) \geq Q^{**}$, y cada unidad no menor que $Q^{**} - 15\%$
S_3^*	12	Promedio de $(S_1 + S_2 + S_3) \geq Q^{**}$

*S: proviene de la palabra *stage* en inglés, y según la USP ^[21] indica las etapas (S_1 , S_2 y S_3) en la que un resultado puede ser aceptable.

**Q: cantidad de principio activo que se disuelve.

2.2.1. Especificidad.

Bajo las condiciones cromatográficas ya mencionadas, se inyectó por triplicado muestra, placebo, fase móvil, solvente y medio de disolución. El estándar se inyectó seis veces.

El placebo fue preparado pesando una cantidad equivalente al peso del estándar y diluido de la misma manera para obtener una concentración similar.

Criterio de aceptación: El medio de disolución, la fase móvil, el solvente y el placebo no deben interferir en la lectura del estándar y muestra, ni presentar en sus cromatogramas lecturas similares a la solución de referencia ^[3].

2.2.2. Linealidad e Intervalo.

Se prepararon diferentes niveles de concentración del estándar a partir de una solución madre: Q-25; Q-15; Q+5; Q+15 y Q+25 (que equivalen a 55%, 65%, 85%, 95% y 105% de Moxifloxacina).

Solución stock madre (SSM): se pesaron 10,5 mg estándar de Moxifloxacina Clorhidrato USP y se llevaron a un balón de 50 mL con medio de disolución. (Concentración final: 0,21 mg/mL).

Solución 55%: 2,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,044 mg/mL)

Solución 65%: 2,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,052 mg/mL)

Solución 85%: 3,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración Final: 0,068 mg/mL)

Solución 95%: 3,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración Final: 0,076 mg/mL)

Solución 105%: 4,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración Final: 0,084 mg/mL)

Criterio de aceptación: r^2 : (0,98 – 1,00) ^[18]

2.2.3. Precisión.

Una vez concluido el tiempo de disolución se filtró una cierta cantidad de muestra de cada vaso, se prepararon las seis soluciones de muestra al 100% como se indica en el apartado 2.2 y se inyectaron por triplicado junto con el estándar (inyectado seis veces).

Criterio de aceptación: Desviación estándar relativa <6% ^[19].

2.2.4. Robustez.

Se procedió a realizar un cambio en las condiciones cromatográficas, en este caso un cambio de columna.

Cambio de columna.

<i>Columna Inicial</i>	<i>Columna de cambio</i>
X Terra RP 18 5µm 3.9 x 150 mm Marca Waters	NovaPak C18 4 µm 3.9 x 150 mm Marca Waters

Criterio de aceptación: Los resultados obtenidos de las muestras analizadas bajo las nuevas condiciones en comparación con las de operación normal deben tener una diferencia <2% y RSD <2% ^[1].

(NOTA: En el anexo 1 se encuentran las fórmulas empleadas para obtener los resultados de la validación).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la validación del método de Moxifloxacin en tabletas primero se redactó el protocolo de validación (Anexo 2) en donde se especificaron cada uno de los pasos a seguir para la evaluación de los ensayos de potencia y disolución.

El primer parámetro a evaluar en la validación del método de Moxifloxacin en tabletas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fue la *Aptitud del Sistema*, el cual mediante un total de seis corridas del estándar certificado USP se verificó que el sistema cromatográfico fue adecuado para el análisis. El factor de capacidad (k'), el factor de cola o *Tailing* (T) y el número de platos teóricos de la columna (N), estuvieron dentro de los límites aceptables para un sistema idóneo (Tabla I).

Tabla I.- Condiciones para obtener un sistema apto para la validación del método de Moxifloxacin en tabletas de 400mg, utilizando una columna XTerra RP 18.

	Límite de aceptación	Valor obtenido
Factor de capacidad (k')	$1 < k' < 20$ ^[22]	1,11
Factor de cola o <i>Tailing</i> (T)	$T^* < 2$ ^[23]	1,26
Número de platos teóricos (N)	$N > 2000$ ^[23]	2045

*El factor de *Tailing* mientras más cercano sea a 1 más simétrico es el pico.

Para el ensayo de **Potencia** los parámetros de desempeño evaluados fueron los siguientes:

Especificidad.-

Se comparó el tiempo de retención de una muestra de Moxifloxacina con el tiempo de retención del estándar certificado de Moxifloxacina Clorhidrato USP. En la Figura 1, se observa que tanto la muestra como el estándar salen al mismo tiempo de retención. Por otro lado, se inyectó fase móvil, solvente y placebo, y no se observó la interferencia de ninguno en la señal de la muestra.

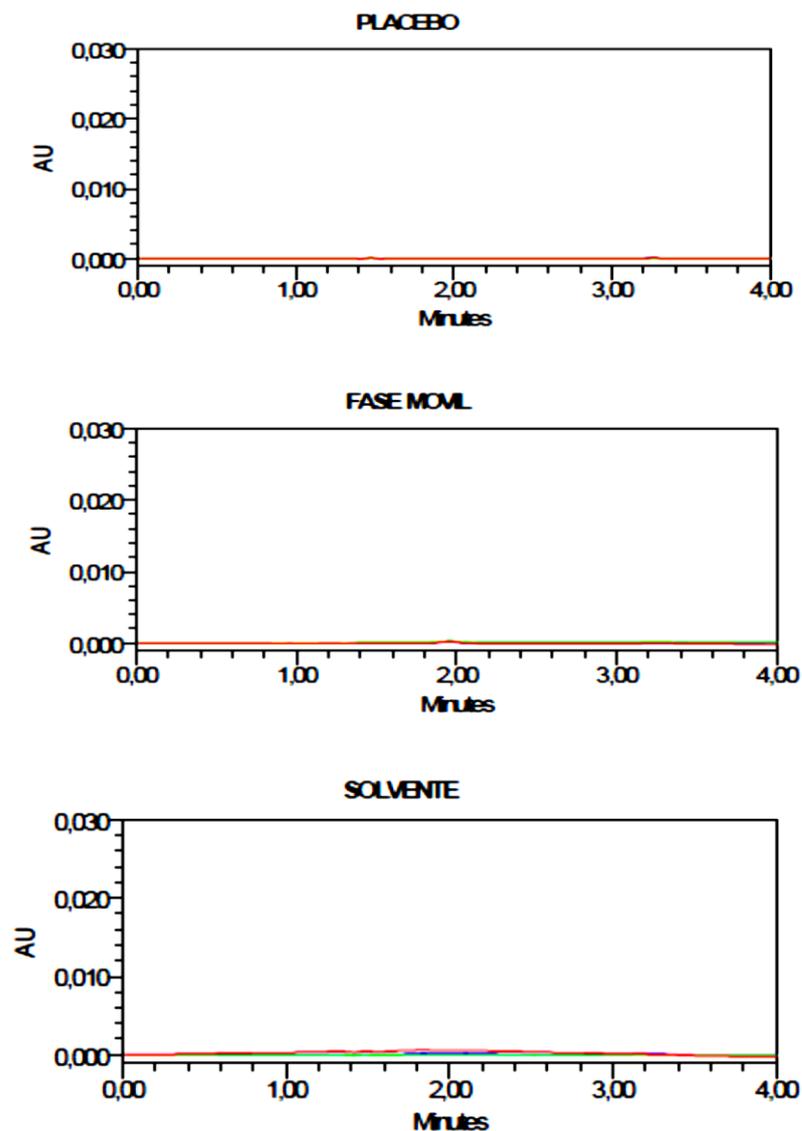


Figura 1.- Cromatogramas de placebo, fase móvil, solvente, estándar y muestra para la evaluación de la *Especificidad en el ensayo de Potencia*.

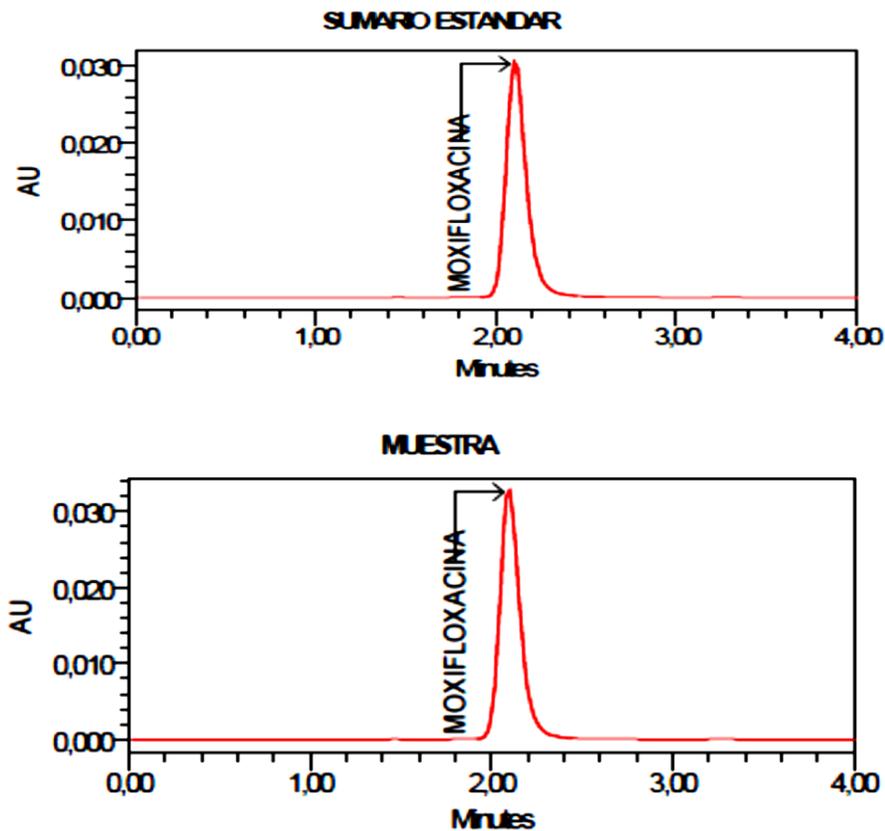


Figura 1 (continuación).- Cromatogramas de placebo, fase móvil, solvente, estándar y muestra, para la evaluación de la *Especificidad en el ensayo de Potencia*.

Linealidad y rango.-

Se construyó una curva de calibración con cinco niveles de concentración (Tabla II y Figura 2), para comprobar el comportamiento lineal del método. Según la USP 34 ^[1], para la valoración de un fármaco o de un producto terminado, el intervalo de linealidad debe estar entre 80% a 120% de la concentración de prueba.

Tabla II.- Concentración y áreas de los puntos correspondientes a la curva de linealidad para el ensayo de Potencia.

MUESTRA	CONCENTRACION (mg/mL)	ÁREA	PROMEDIO AREAS
STD1 (80%)	0,01559	195682	194985
		194521	
		194752	
STD2 (90%)	0,01754	216109	216470
		216308	
		216994	
STD3 (100%)	0,01949	238176	237448
		237374	
		236793	
STD4 (110%)	0,02144	273143	271499
		271063	
		270290	
STD5 (120%)	0,02338	297957	296817
		296759	
		295735	

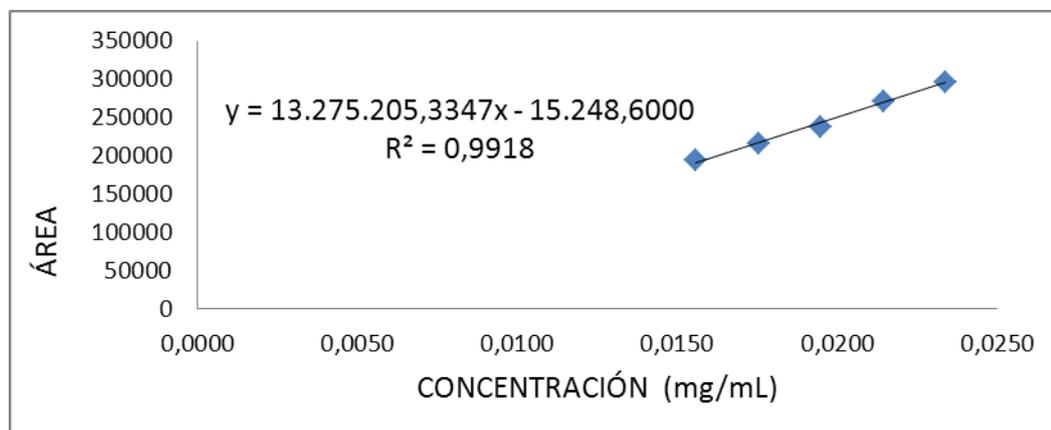


Figura 2.- Curva de linealidad del ensayo de Potencia

El coeficiente de correlación se encontró dentro del criterio de aceptabilidad establecido, indicando que la curva fue lineal y demostró que el método permite obtener resultados o áreas que son directamente proporcionales a la concentración de la muestra, dentro de un rango de concentración de (80 – 120) %.

Precisión.-

La precisión del sistema, del método y la reproducibilidad son tres formas diferentes y necesarias para evaluar la precisión de un método analítico.

En el caso de la *precisión del sistema*, seis muestras preparadas al 100% fueron inyectadas por triplicado en el equipo cromatográfico (Tablas III (A y B) y Figura 3), con el fin de verificar si el sistema no presentaba variaciones al momento de inyectar y registrar la señal, para determinar la concentración de Moxifloxacina en cada una de las muestras, es decir, si el sistema presentaba repetibilidad.

Tabla III (A).- Áreas del estándar para evaluar la precisión del sistema en el método de Moxifloxacina en tabletas de 400mg para el ensayo de Potencia.

<i>ESTÁNDAR</i>	<i>ÁREA</i>
1	238387
2	237147
3	238171
4	237901
5	238097
6	238090
PROMEDIO:	237966
RSD (%):	0,18

Tabla III (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% para evaluar la precisión del sistema en el ensayo de Potencia.

MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	PROMEDIO AREAS	POTENCIA (%)
M1(100%)	53,1	251635	251680	102,93
		253598		
		249807		
M2(100%)	53,2	250659	252206	102,95
		253962		
		251997		
M3(100%)	53,5	252149	254640	103,36
		255709		
		256062		
M4(100%)	53,0	253264	253921	104,04
		254064		
		254436		
M5(100%)	53,0	251113	251123	102,89
		251541		
		250715		
M6(100%)	53,0	244493	243914	99,94
		244685		
		242565		
POTENCIA PROMEDIO (%)				102,68
RSD (%)				1,38

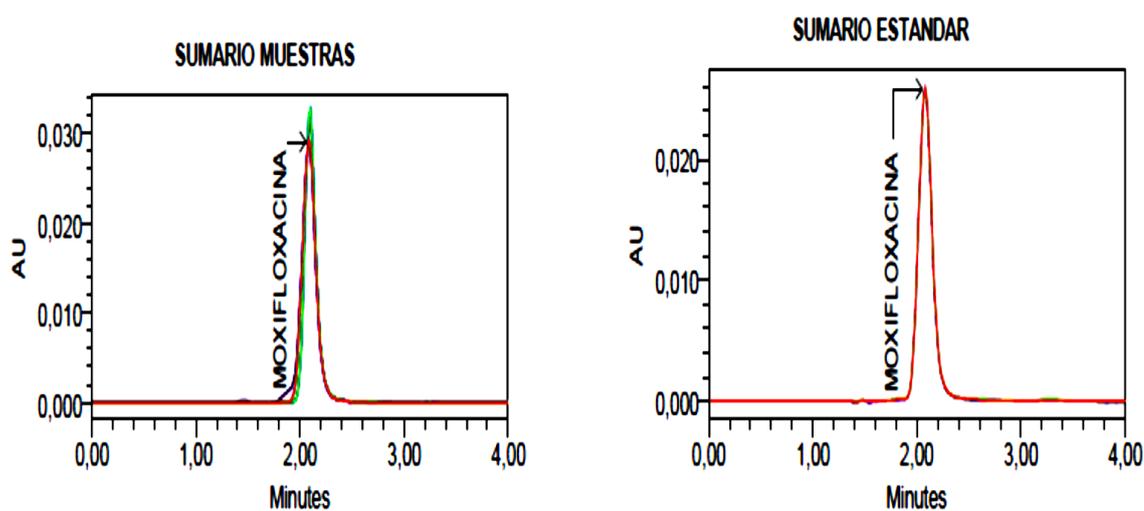


Figura 3.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión del Sistema en el ensayo de Potencia

Por otro lado, tres niveles de concentración (80%, 100% y 120%), de tres réplicas cada una, fueron preparadas para evaluar la *precisión del método* (Tabla IV y la Figura 4). Estas tres concentraciones fueron escogidas para abarcar todo el rango de linealidad. (Las áreas del estándar se muestran en la Tabla III A).

Tabla IV.- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la precisión del método en el ensayo de Potencia.

MUESTRA	ÁREA	PROMEDIO AREAS	POTENCIA (%)
M1(80%)	202631	202400	103,42
	201817		
	202752		
M2(80%)	206629	207500	105,28
	207574		
	208297		
M3(80%)	203740	204048	104,51
	203102		
	205303		
M1(100%)	254269	254134	104,13
	254350		
	253783		
M2(100%)	251309	251132	102,90
	250923		
	251163		
M3(100%)	244916	244605	100,22
	244373		
	244526		
M1(120%)	306683	306972	104,81
	307582		
	306651		
M2(120%)	301129	302043	102,97
	302429		
	302572		
M3(120%)	301030	300817	102,71
	300783		
	300637		
POTENCIA PROMEDIO (%)			103,44
RSD (%)			1,46

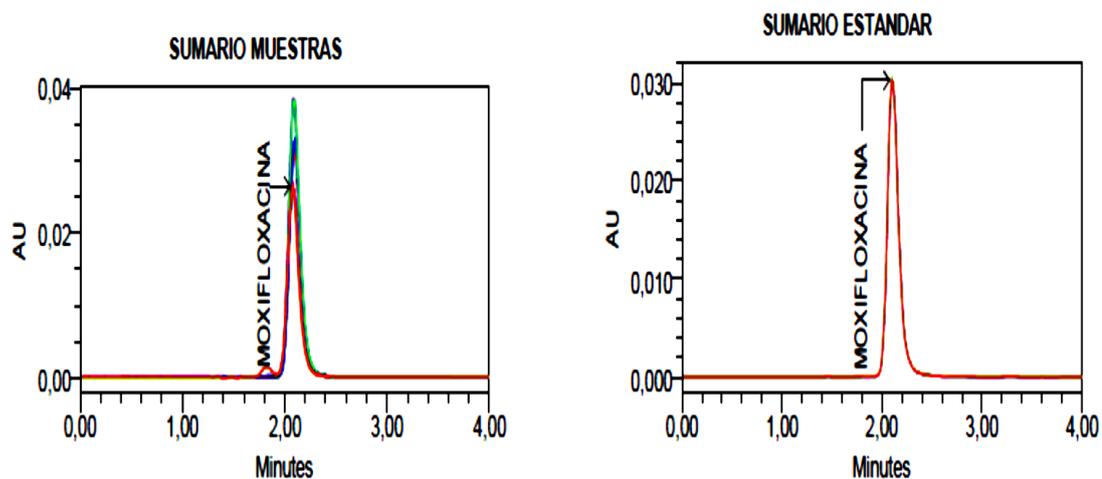


Figura 4.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión del Método para el ensayo de Potencia.

Mediante la *Precisión intermedia* se pudo evaluar la *reproducibilidad* del método. Las mismas muestras preparadas para estudiar la precisión del método el primer día, fueron almacenadas en la nevera e inyectadas nuevamente dos días después (Tabla V (A y B) y Figura 5), observándose poca variación en los resultados cuando se compararon con los de las muestras recién preparadas (Tabla IV y Figura 4).

Tabla V (A).- Áreas del estándar de Moxifloxacina para evaluar la reproducibilidad del método de Moxifloxacina en tabletas de 400mg para el ensayo de Potencia.

ESTÁNDAR	ÁREA
1	239413
2	239066
3	237680
4	238251
5	239056
6	237212
PROMEDIO:	238446
RSD (%):	0,37

Tabla V (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la reproducibilidad del método en el ensayo de Potencia.

MUESTRA	AREA	PROMEDIO AREAS	POTENCIA (%)
M1(80%)	202334	202354	103,19
	202010		
	202719		
M2(80%)	207997	207539	105,09
	207335		
	207285		
M3(80%)	203164	202996	103,76
	202766		
	203057		
M1(100%)	254053	253549	103,68
	253678		
	252917		
M2(100%)	250303	250719	102,52
	251117		
	250738		
M3(100%)	243312	243215	99,45
	243590		
	242743		
M1(120%)	305657	306182	104,33
	305941		
	306947		
M2(120%)	301650	302409	102,88
	302170		
	303407		
M3(120%)	301343	301369	102,69
	301817		
	300946		
POTENCIA PROMEDIO (%)			103,06
RSD (%)			1,54

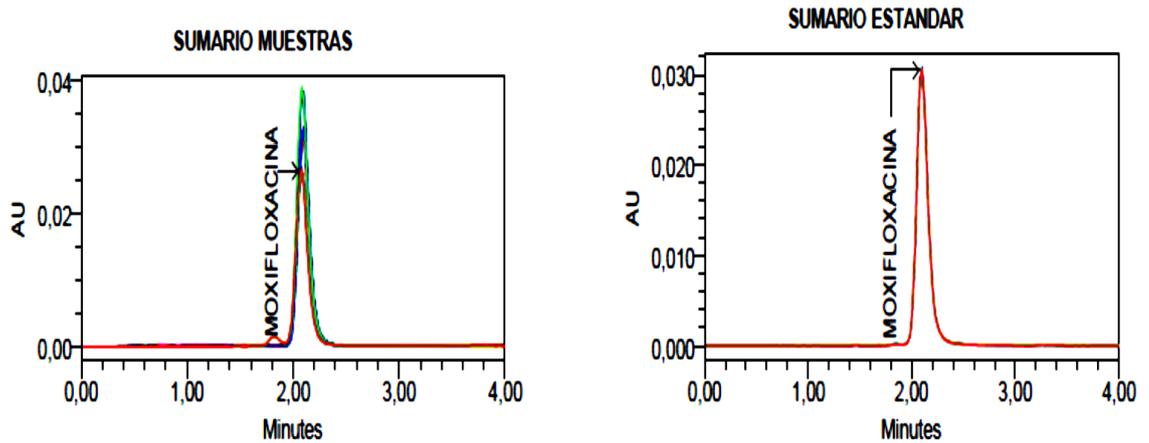


Figura 5.- Cromatograma de muestra y estándar al evaluar la Precisión Intermedia en el ensayo de Potencia.

Por medio de las tres formas en que se estudió la precisión se pudo concluir que el método presentó repetibilidad y reproducibilidad, evaluando la desviación estándar relativa (RSD), la cual es una medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio^[18] y las obtenidas fueron menores al 2% cumpliendo con el criterio de aceptabilidad. Además, también se observó que no hubo variaciones en los resultados cuando se dejó las muestras de un día para otro, ya que al realizar un análisis estadístico aplicando la prueba *F* y la prueba *t-Student* (tabla VI) a los resultados obtenidos en las tablas IV y V, se demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativa entre ellos, por lo que las muestras presentaron cierta estabilidad entre días.

Tabla VI.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza a los resultados obtenidos en las tablas IV y V para el ensayo de Potencia.

<i>F crítico</i>	4,43
<i>F calculado</i>	1,09
<i>Se acepta la Hipótesis nula (H₀)</i>	F crítico ≥ F calculado ($s_A^2 = s_B^2$)
<i>t crítico</i>	2,1199
<i>t calculado</i>	0,52
<i>Se acepta la Hipótesis nula (H₀)</i>	t crítico ≥ t calculado ($x_A = x_B$)

Exactitud.-

Para el estudio de la exactitud fue necesario utilizar la mezcla sintética de todos aquellos compuestos añadidos a la tableta (sin el principio activo) conocido como placebo, el cual fue suministrado por el Laboratorio de Control de Calidad donde fue realizado el estudio.

Se prepararon muestras a tres concentraciones diferentes (50%, 100% y 150%), con tres réplicas cada una, las cuales consistieron en una mezcla de principio activo + placebo, y fueron pesadas por separado para cada balón. Las proporciones en que se pesaron tanto placebo como principio activo se determinaron a partir de la fórmula cuali-cuantitativa del producto y se determinó la cantidad equivalente en peso para preparar cada concentración. La escogencia de estos de niveles de concentración fue para diferenciarlo de los niveles de concentración escogidos para el ensayo de precisión a la hora de cuantificar en el equipo y en la preparación de las muestras, y también, para tomar en consideración todos los errores posibles que se cometieron al momento de preparar las muestras, puesto que lo que

se realiza es una pequeña simulación al mezclar los ingredientes para preparar una tableta. Por otro lado, fue un criterio establecido por el departamento de Control de Calidad en donde se realizó el estudio y que se encuentra debidamente documentado en el Procedimiento Estándar de Operación (SOP) para la Validación de Métodos [24].

Una de la formas de reportar la exactitud, es a través del porcentaje de recuperación, el cual nos indica las diferencias entre la cantidad añadida y la cantidad recuperada de muestra. Los resultados obtenidos se observan en las Figura 6 y Tabla VII.

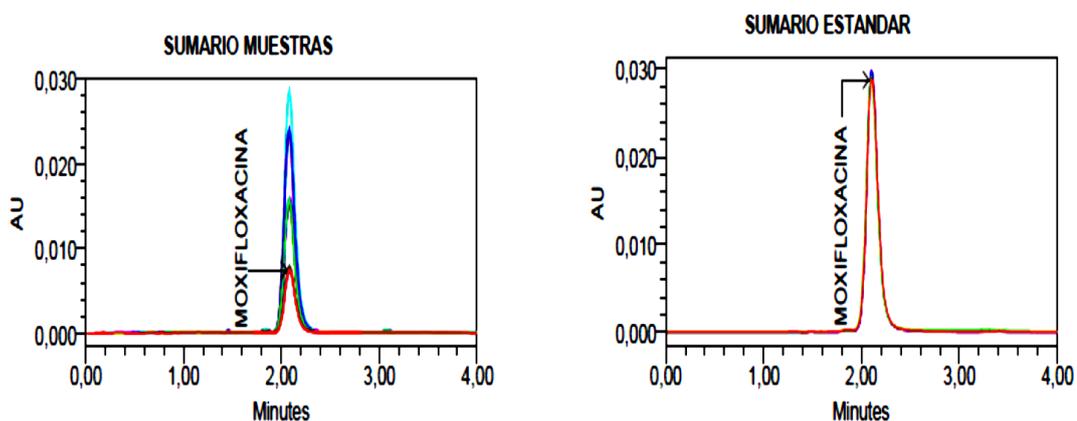


Figura 6.- Cromatogramas de muestra y estándar para la evaluación del parámetro de exactitud en el ensayo de Potencia.

Tabla VII.- Porcentaje de Recuperación obtenido al evaluar el parámetro de exactitud para ensayo de Potencia.

MUESTRA	PESO REAL DE MOXIFLOXACINA (mg)	AREA	PROMEDIO DE AREAS	PESO DE MOXIFLOXACINA RECUPERADO (mg)	% RECUPERADO
M1(50%)	6,30	60591	61466	6,22	98,75
		61421			
		62386			
M2(50%)	6,20	60120	59736	6,04	97,52
		59388			
		59699			

Tabla VII (continuación).- Porcentaje de Recuperación obtenido al evaluar el parámetro de exactitud para ensayo de Potencia.

MUESTRA	PESO REAL DE MOXIFLOXACINA (mg)	AREA	PROMEDIO DE AREAS	PESO DE MOXIFLOXACINA RECUPERADO (mg)	% RECUPERADO
M3(50%)	6,50	62984	62739	6,35	97,69
		62129			
		63104			
M1(100%)	13,19	128623	128618	13,01	98,62
		129516			
		127714			
M2(100%)	13,19	130135	129122	13,06	99,01
		128718			
		128514			
M3(100%)	12,69	123903	123214	12,47	98,20
		123565			
		122174			
M1(150%)	19,69	191622	190839	19,31	98,05
		190220			
		190674			
M2(150%)	23,59	231202	229439	23,21	98,40
		227762			
		229353			
M3(150%)	19,69	190787	191908	19,42	98,60
		192381			
		192557			
POTENCIA PROMEDIO (%)					98,32
RSD (%)					0,50

El peso real de Moxifloxacin mostrado en la Tabla VII consistió en una corrección realizada con la cantidad pesada de principio activo y el valor determinado de potencia al momento de analizar la materia prima, lo que da como resultado el **peso real de principio activo utilizado en el análisis** (ver anexo 1)

El porcentaje de recuperación obtenido se encontró dentro del criterio de aceptación establecido y se concluye que el método es capaz de analizar la cantidad de principio activo que se encuentra en la tableta [25].

Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los miligramos pesados inicialmente y los recuperados se procedió a realizar un análisis estadístico aplicando la prueba de *t-Student*. En la Tabla VIII se muestran los resultados obtenidos en el análisis estadístico y se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, se construyó una curva lineal para comprobar que la cantidad de analito añadido en las muestras es directamente proporcional a la cantidad de analito recuperado, y que el coeficiente de correlación (R^2) se encontró dentro del intervalo especificado (Figura 7).

Tabla VIII.- Aplicación de la prueba t-Student 95% de confianza para la evaluación de la exactitud en el ensayo de Potencia.

t crítico	2,306
t calculado	1,40
Se acepta la Hipótesis nula (H_0)	t crítico \geq t calculado

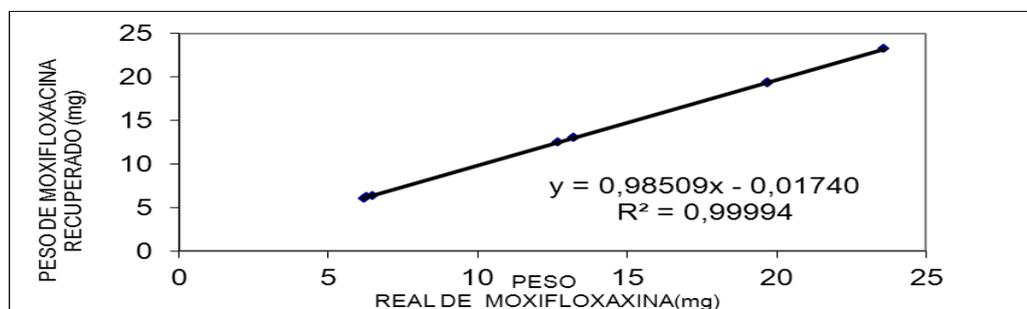


Figura 7.- Curva de calibración de cantidad de Moxifloxacina pesado inicialmente y cantidad de Moxifloxacina recuperados para el ensayo de Potencia.

Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LOQ).-

Según la ICH ^[3], los límites de detección y cuantificación pueden ser determinados de varias formas, en base a la relación señal/ruido y utilizando la pendiente y la desviación estándar del punto de intersección de una curva de calibración a bajas concentraciones.

En función de la relación señal/ruido, diez muestras de placebo fueron preparadas e inyectadas en el equipo cromatográfico, sin embargo, no mostraron una señal diferente a la del ruido de fondo que pudiera ser detectable o cuantificable.

Para estimar la mínima cantidad de muestra que puede ser detectable y la que puede ser cuantificable se empleó el método basado en la construcción de una curva de calibración a bajas concentraciones (Figura 8).

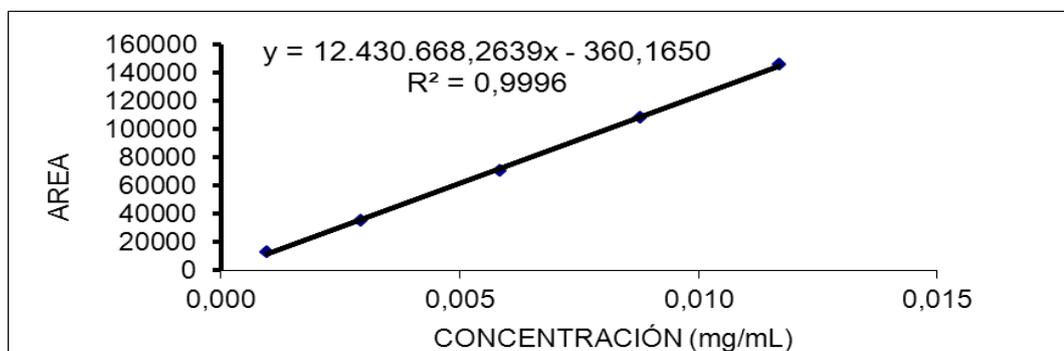


Figura 8.- Curva de calibración para la determinación del Límite de Detección y Cuantificación.

Mediante el uso de la pendiente de la curva, la desviación estándar del punto de intersección (Tabla IX) y las ecuaciones correspondientes a los límites de detección y cuantificación utilizando estas variables, se

determinaron las señales de dichos parámetros. Luego mediante el uso de la ecuación de la recta se convirtieron esas señales en concentraciones (Tabla X).

Tabla IX.- Variables que conforman la ecuación de la recta, sus desviaciones estándar y desviación estándar de los ejes de coordenadas de la curva lineal para determinar los límites de detección y cuantificación.

<i>Pendiente de la curva (m)</i>	12430668,2639
<i>Punto de corte de la curva (b)</i>	360,1650
<i>Coefficiente de correlación (R²)</i>	0,9996
<i>Desviación estándar de la pendiente (Sm)</i>	± 143949,3516
<i>Desviación estándar del punto de corte (Sb)</i>	± 1032,575155
<i>Desviación estándar del coeficiente de correlación (Sr)</i>	± 1245,045253
<i>Sxx</i>	7,48085E-05
<i>Syy</i>	11564170420

Tabla X.- Señal y concentración del Límite de Detección y del Límite de Cuantificación teóricos.

	<i>Áreas</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>
<i>Límite de Detección</i>	0,000274120	0,000028974
<i>Límite de Cuantificación</i>	0,000830700	0,000028974

Teóricamente ambos parámetros presentaron la misma concentración, por lo que se procedió a preparar una solución de muestra a dicha concentración, se inyectó en el equipo de HPLC y se obtuvo el cromatograma de la Figura 9, en donde se comparó la señal de la muestra

con la del placebo y se pudo observar que no fue posible diferenciar la señal de Moxifloxacin del ruido de fondo del equipo.

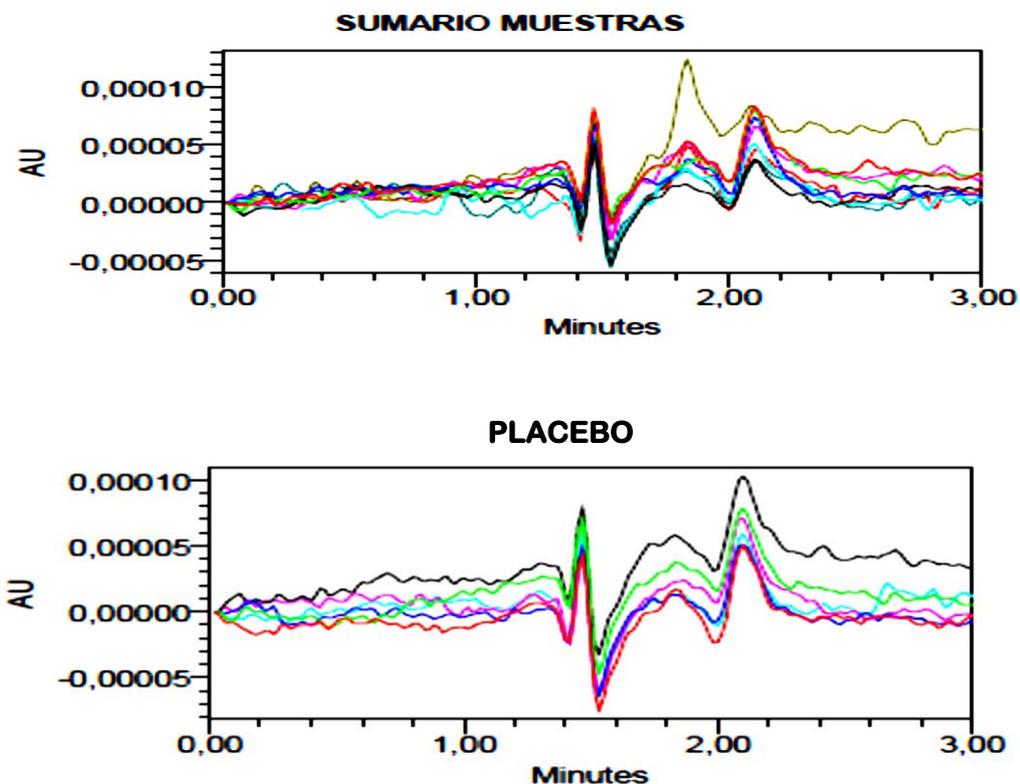


Figura 9.- Cromatograma de muestra a una concentración de 0,000029 mg/mL.

Debido a los resultados obtenidos, tanto para el Límite de Detección como para el Límite de Cuantificación, se procedió a preparar soluciones más concentradas y mediante pruebas sucesivas de ensayo y error con concentraciones diferentes de muestras, se logró obtener aquella menor concentración que pudiera ser detectada y aquella mínima concentración que pudiera ser cuantificada. En la Tabla XI y XII y en las Figuras 10 y 11, se observan los resultados y cromatogramas obtenidos al preparar las soluciones a 0,000052mg/mL para el LOD y 0,00052mg/mL para el LOQ.

Tabla XI.- Mínima concentración de muestra detectada en el equipo. Límite Detección.

MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	AREA	PROMEDIO AREAS
M1	15,4	0,000052	0	0
M2	15,4	0,000052	0	0
M3	15,4	0,000052	0	0

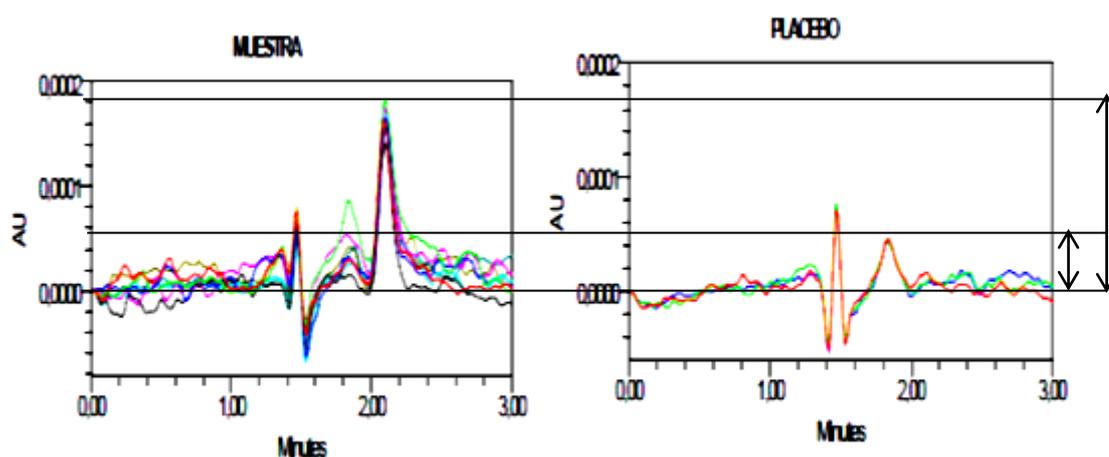


Figura 10.- Mínima concentración a ser detectada en el equipo de HPLC (0,000052mg/mL)

En la figura 10 es posible diferenciar la señal de Moxifloxacina del ruido de fondo del equipo, al compararla con la señal del placebo. A partir de dicho cromatograma, se pudo determinar la relación señal/ ruido, trazando una línea paralela al eje X a 1 cm de distancia y luego midiendo altura del pico de moxifloxacina, obteniéndose una relación señal ruido de 3,2 a 1. Con toda esta información obtenida se aceptó la concentración de 0,000052 mg/mL como el Límite de Detección.

Tabla XII.- Mínima concentración de muestra de ser cuantificada. Límite de Cuantificación.

MUESTRA	PESO (mg)	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	AREA	PROMEDIO AREAS	POTENCIA (%)
M1	15,4	0,00052	2865	2880	102,99
			2899		
			2877		
M2	15,4	0,00052	2878	2868	102,54
			2872		
			2853		
M3	15,4	0,00052	2896	2895	103,50
			2886		
			2902		

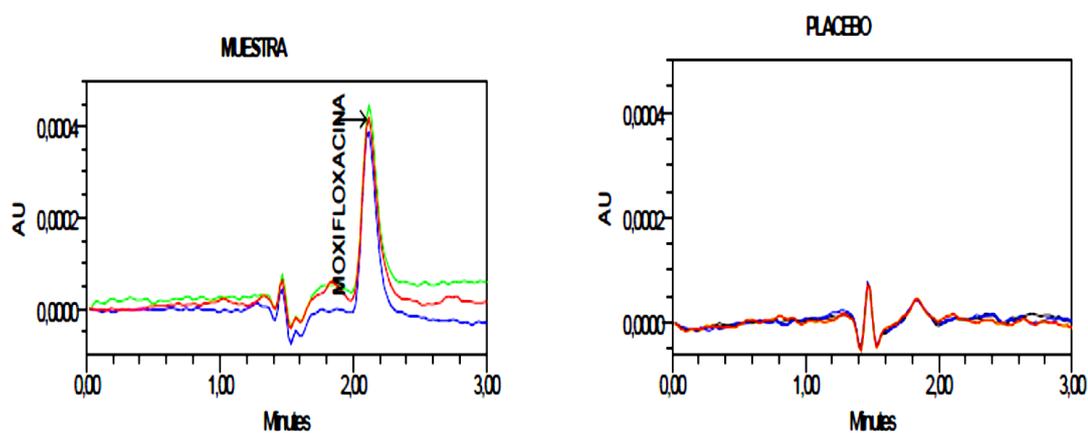


Figura 11.- Mínima concentración a ser cuantificada en el equipo de HPLC (0,00052mg/mL)

Como se observa en la Figura 11, a la concentración de 0,00052 mg/mL, la señal del analito en la muestra pudo ser detectada y cuantificada, por lo que se consideró esta concentración como el Límite de Cuantificación.

Robustez.-

Para la evaluación de este parámetro se decidió realizar un cambio de columna, se pasó de una columna XTerra RP 18 a una Novapak C18. Para realizar dicho cambio se evaluó el comportamiento de la nueva columna bajo las condiciones de trabajo, mediante el *system suitability*, obteniéndose los valores de factor de capacidad (k'), número de platos teóricos (N) y factor de *Tailing* o de cola (T), como se muestra en la Tabla XIII.

Tabla XIII.- Estudio de una columna Novapak C18 para la evaluación de la Robustez en el ensayo de Potencia.

	Límite de aceptación	Valor obtenido
Factor de capacidad (k')	$1 < k' < 20$ ^[22]	1,29
Factor de cola o <i>Tailing</i> (T)	$T^* < 2$ ^[23]	2,20
Número de platos teóricos (N)	$N > 2000$ ^[23]	2020

*El factor de *Tailing* mientras más cercano sea a 1 más simétrico es el pico.

En la Tabla XIV (A y B) se comparon los resultados obtenidos con ambas columnas al inyectar las mismas muestras preparadas el mismo día (Figura 12 A y B).

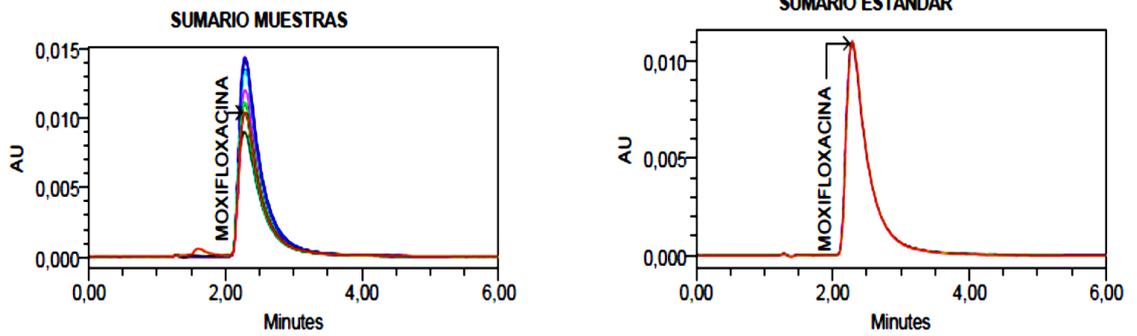


Figura 12 A.- Muestras de Moxifloxacin a concentraciones de 80%, 100% y 120% con una columna Novapak C18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Potencia.

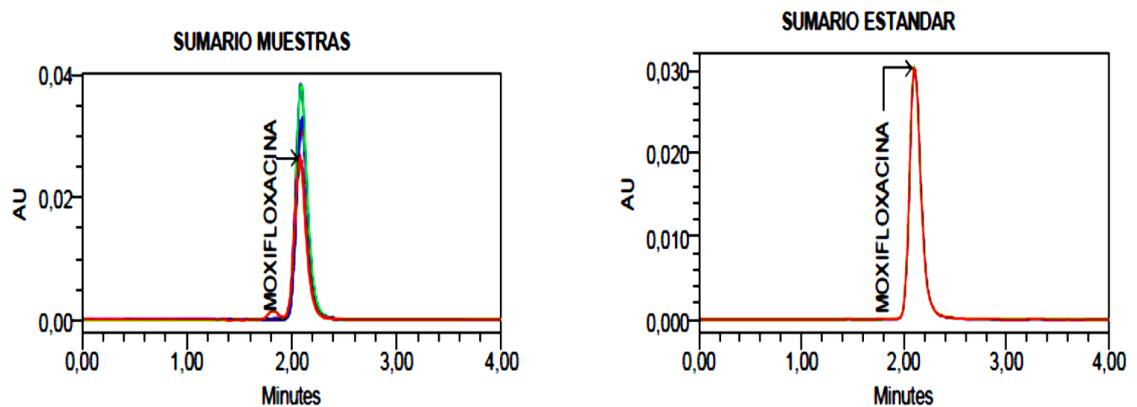


Figura 12 B.- Muestras de Moxifloxacin a concentraciones de 80%, 100% y 120% con una columna XTerra RP18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Potencia.

En los cromatogramas obtenidos (Figura 12 A y B) se pudo observar que al utilizar la columna Novapak C18 se produjo un ensanchamiento de pico. Al evaluar su factor de *Tailing* o cola este fue mayor a 2, lo que indicó una mayor afinidad del analito con la columna, por lo que la corrida fue más larga y el pico cromatográfico fue menos simétrico. Por otro lado, al utilizar

la columna XTerra RP18 se obtuvo un pico bien definido y delgado, que es el resultado que se espera en la técnica de cromatografía. Se pudo haber utilizado en el análisis otras columnas, sin embargo en el laboratorio donde fue realizado el estudio se cuenta con éstas dos clases de columnas.

Tabla XIV A.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (estándar) para el ensayo de Potencia.

Columna XTerra RP 18		Columna Nova Pak C 18	
<i>ESTÁNDAR</i>	<i>AREA</i>	<i>ESTÁNDAR</i>	<i>AREA</i>
1	238387	1	214934
2	237147	2	215828
3	238171	3	215375
4	237901	4	215953
5	238097	5	216048
6	238090	6	215868
<i>PROMEDIO:</i>	<i>237966</i>	<i>PROMEDIO:</i>	<i>215668</i>
<i>RSD (%):</i>	<i>0,18</i>	<i>RSD (%):</i>	<i>0,20</i>

Tabla XIV B.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (muestras) para el ensayo de Potencia.

<i>REPLICA</i>	Columna XTerra RP 18			Columna Nova Pak C 18			
	<i>PESO DE MUESTRA (mg)</i>	<i>AREA</i>	<i>POTENCIA (%)</i>	<i>PESO DE MUESTRA (mg)</i>	<i>AREA</i>	<i>POTENCIA (%)</i>	
M1	53,0	254269	104,18	53,0	223913	101,23	
		254350	104,21		222527	100,60	
		253783	103,98		222386	100,54	
M2	53,0	251309	102,97	53,0	226555	102,42	
		250923	102,81		228016	103,08	
		251163	102,91		229019	103,54	
M3	53,0	244916	100,35	53,0	227762	102,97	
		244373	100,13		230384	104,15	
		244526	100,19		227602	102,90	
<i>PROMEDIO (%):</i>			<i>102,41</i>	<i>PROMEDIO (%):</i>			<i>102,38</i>
<i>RSD (%)</i>			<i>1,69</i>	<i>RSD (%)</i>			<i>1,27</i>

Se aplicaron la prueba F y la prueba t-Student (Tabla XV) a los resultados obtenidos con ambas columnas y se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados al cambiar de columnas, a pesar de los valores superiores del factor de *Tailing* o de cola obtenidos con la columna Novapak

Tabla XV.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza para el estudio de la Robustez en el ensayo de Potencia.

<i>F</i> crítico	39,00
<i>F</i> calculado	1,77
Se acepta la Hipótesis nula (H_0)	$F \text{ crítico} \geq F \text{ calculado } (s_A^2 = s_B^2)$
<i>t</i> crítico	2,306
<i>t</i> calculado	1,40
Se acepta la Hipótesis nula (H_0)	$t \text{ crítico} \geq t \text{ calculado } (x_A = x_B)$

Para el ensayo de **Disolución** los resultados obtenidos en la validación fueron los siguientes:

Especificidad.-

Se inyectó solvente, placebo, fase móvil, muestra, estándar y el medio de disolución para demostrar que no se presentaba interferencia en la señal, obteniéndose la Figura 13.

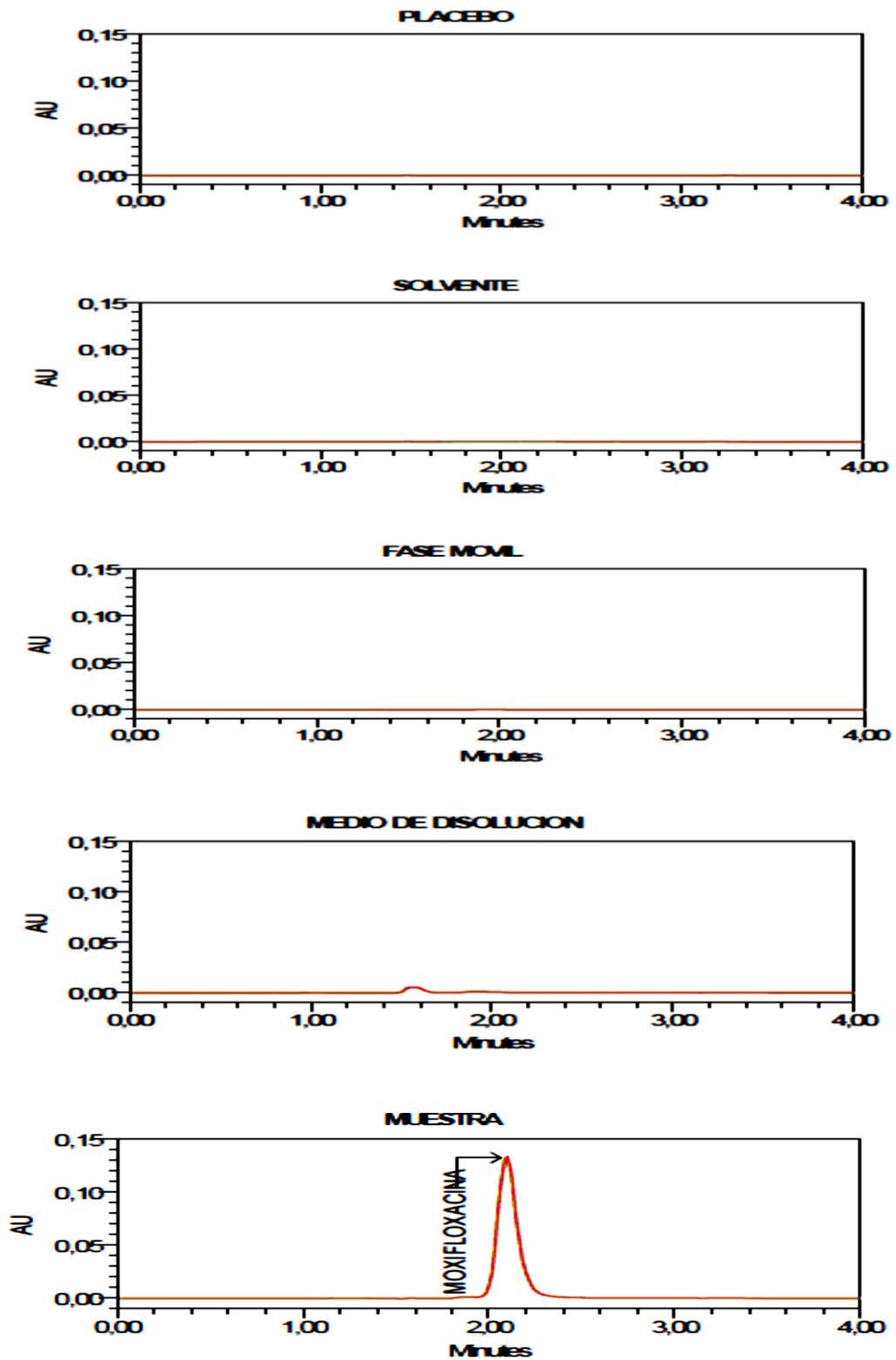


Figura 13.- Cromatogramas de placebo, solvente, fase móvil, medio de disolución, muestra y estándar para la evaluación de la *Especificidad en el ensayo de Disolución*.

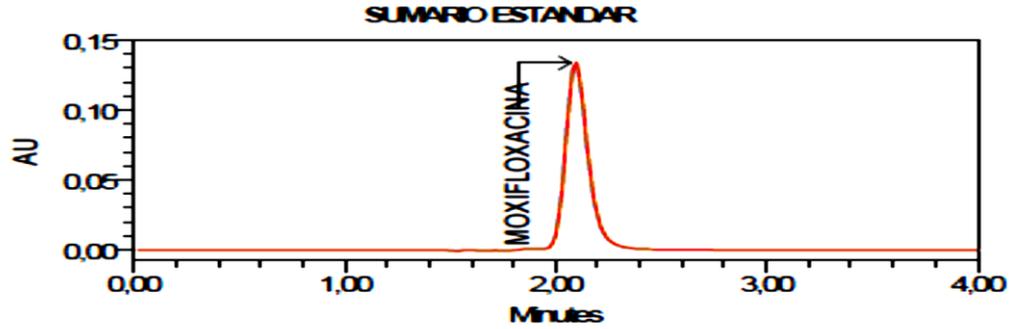


Figura 13 (continuación).- Cromatogramas de placebo, solvente, fase móvil, medio de disolución, muestra y estándar para la evaluación de la *Especificidad en el ensayo de Disolución*

Linealidad.-

Una curva de calibración de cinco puntos de concentración fue construida para determinar el comportamiento lineal del método (Tabla XVI y Figura 14).

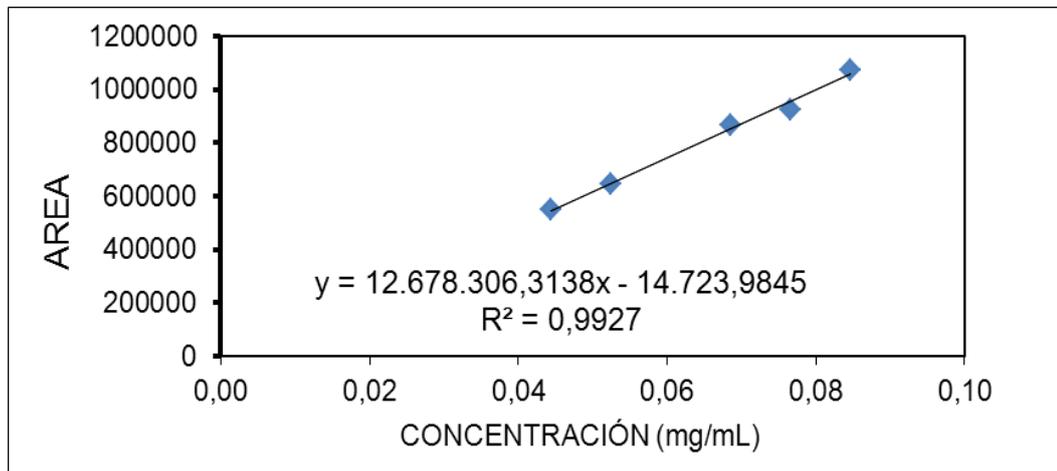


Figura 14.- Curva de linealidad para el ensayo de Disolución.

Tabla XVI.- Concentración y áreas de los puntos correspondientes a la curva de linealidad del ensayo de Disolución.

MUESTRA	CONCENTRACION (mg/mL)	AREA	PROMEDIO AREAS
STD1(55%) (Q-25)%	0,04431	550663	549224
		547264	
		549746	
STD2(65%) (Q-15)%	0,05236	649024	646687
		644607	
		646430	
STD3(85%) (Q+5)%	0,06847	869466	867394
		868856	
		863860	
STD4(95%) (Q+15)%	0,07653	925497	926164
		926051	
		926943	
STD5(105%) (Q+25)%	0,08458	1076953	1073231
		1070776	
		1071965	

Dichos niveles de concentración fueron escogidos para abarcar todo el intervalo de disolución que se considera aceptable hasta la etapa S₃ (ver criterio de aceptabilidad para Disolución en la metodología), debido a que en el proceso de Disolución no es posible controlar cuanto de analito se libera de la muestra. Como Q es igual a 80%, se trabajó en un rango de linealidad de (55 – 105)% . El coeficiente de correlación se encontró dentro del criterio de aceptabilidad establecido, lo que indicó que la curva fue lineal.

Precisión.-

Una vez transcurrido el tiempo de disolución, se tomó una cierta cantidad de muestra, se preparó de acuerdo a la metodología y se inyectó

en el equipo, obteniéndose los resultados de la Tabla XVII (A y B) y Figura 15. Dichos resultados demostraron que el método es reproducible y confiable.

Tabla XVII (A).- Áreas del estándar de Moxifloxacina para la determinación de Moxifloxacina en tabletas de 400mg en el ensayo de Disolución.

ESTÁNDAR	AREA
1	984371
2	983358
3	980692
4	981318
5	985921
6	983477
PROMEDIO:	983190
RSD (%):	0,20

Tabla XVII (B).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% en el ensayo de Disolución.

MUESTRA	AREA	DISOLUCIÓN (%)
1	984220	90,72
	983284	90,63
	985401	90,83
2	969907	89,40
	968383	89,26
	972147	89,61
3	923940	85,16
	933089	86,01
	931967	85,90

Tabla XVII (B continuación).- Porcentaje de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% en el ensayo de Disolución.

MUESTRA	AREA	DISOLUCIÓN (%)
4	1007656	92,88
	1003602	92,51
	1005824	92,71
5	1052266	96,99
	1046008	96,42
	1049262	96,72
6	935792	86,26
	935266	86,21
	929289	85,66
PROMEDIO (%)		90,22
RSD (%)		4,35

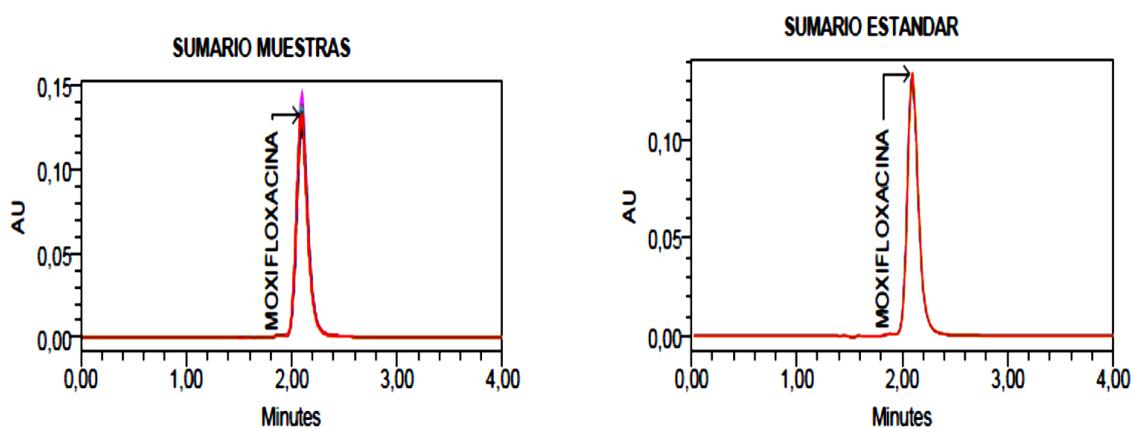


Figura 15.- Cromatograma de muestra y estándar para la evaluación de la Precisión en el ensayo de Disolución.

Robustez.-

Para la evaluación de este parámetro se decidió realizar el mismo cambio de columna realizado en el ensayo de potencia, se pasó de una

columna XTerra RP 18 a una Novapak C18. En la Tabla XVIII, se muestra el *system suitability* de la columna nueva.

Tabla XVIII.- Estudio de una columna Novapak C18 para la evaluación de la Robustez en el ensayo de Disolución.

	Límite de aceptación	Valor obtenido
Factor de capacidad (k')	$1 < k' < 20$ ^[22]	1,14
Factor de cola o <i>Tailing</i> (T)	$T^* < 2$ ^[23]	2,72
Número de platos teóricos (N)	$N > 2000$ ^[23]	2020

*El factor de *Tailing* mientras más cercano sea a 1 más simétrico es el pico.

En la tabla XIX (A y B) se comparan los resultados obtenidos con ambas columnas al inyectar las mismas muestras preparadas el mismo día (Figura 16 A y B).

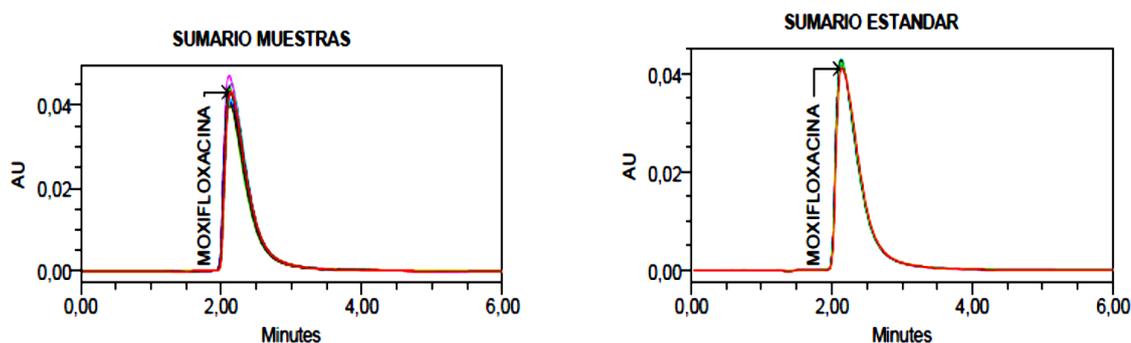


Figura 16 A.- Muestras de Moxifloxacin a concentraciones de 100% con una columna Novapak C18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Disolución.

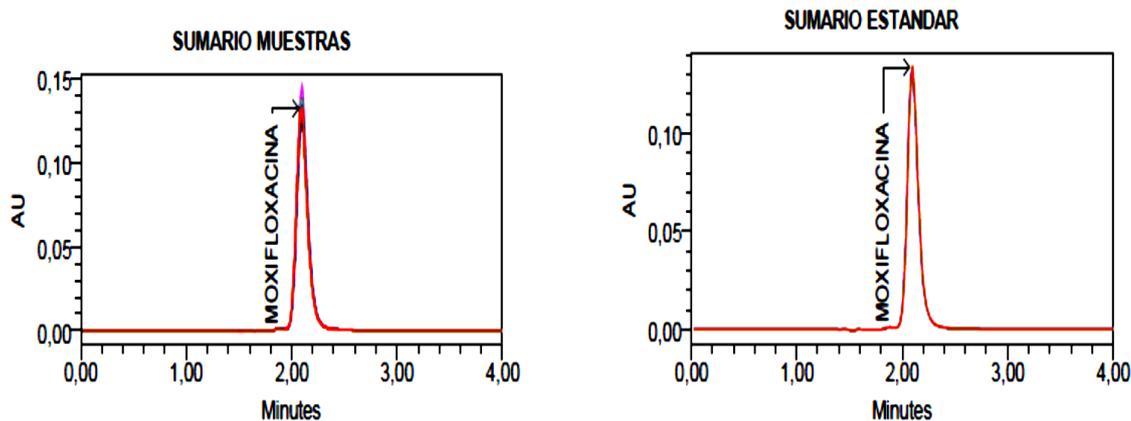


Figura 16 B.- Muestras de Moxifloxacin a concentraciones de 100% con una columna XTerra RP18, F:0,9 mL/min, volumen de inyección: 10µL para el ensayo de Disolución.

En los cromatogramas obtenidos (Figura 16 A y B) se pudo observar el mismo caso presentado en el ensayo de Potencia al utilizar la columna Novapak C18, en donde se produjo un ensanchamiento del pico, indicando una mayor afinidad del analito con la columna, por lo que la corrida fue más larga. Al utilizar la columna XTerra RP18 se obtuvo un pico bien definido y delgado, que es el resultado que se espera en la técnica de cromatografía. Se pudo haber utilizado en el análisis otras columnas, sin embargo en el laboratorio donde fue realizado el estudio se cuenta con éstas dos clases de columnas.

Tabla XIX A.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (estándar) para el ensayo de Disolución.

Columna XTerra RP 18		Columna Nova Pak C 18	
<i>ESTÁNDAR</i>	<i>AREA</i>	<i>ESTÁNDAR</i>	<i>AREA</i>
1	984371	1	926795
2	983358	2	928891
3	980692	3	920580
4	981318	4	928935
5	985921	5	926858
6	983477	6	929839
<i>PROMEDIO:</i>	983190	<i>PROMEDIO:</i>	926983
<i>RSD (%):</i>	0,20	<i>RSD (%):</i>	0,36

Tabla XIX B.- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (muestra) para el ensayo de Disolución.

<i>RÉPLICA</i>	<i>CONCENTRACIÓN (mg/mL)</i>	Columna XTerra RP18		Columna Novapak C 18	
		<i>AREA</i>	<i>DISOLUCIÓN (%)</i>	<i>AREA</i>	<i>DISOLUCIÓN (%)</i>
M1	0,089	984220	90,72	925546	90,49
		983284	90,63	927765	90,70
		985401	90,83	929295	90,85
M2	0,089	969907	89,40	928617	90,79
		968383	89,26	926133	90,54
		972147	89,61	933212	91,23
M3	0,089	923940	85,16	909689	88,93
		933089	86,01	909834	88,95
		931967	85,90	903822	88,36
M4	0,089	1007656	92,88	957367	93,60
		1003602	92,51	950779	92,95
		1005824	92,71	954489	93,31
M5	0,089	1052266	96,99	1009515	98,69
		1046008	96,42	1008143	98,56
		1049262	96,72	1006172	98,37

Tabla XIX B (continuación).- Comparación de resultados obtenidos en el estudio de Robustez (muestra) para el ensayo de Disolución.

		Columna XTerra RP18		Columna Novapak C 18	
RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	AREA	DISOLUCIÓN (%)	AREA	DISOLUCIÓN (%)
M6	0,089	935792	86,26	907411	88,71
		935266	86,21	903661	88,35
		929289	85,66	901989	88,18
		Promedio (%)	90,22	Promedio (%)	91,75
		RSD (%)	4,35	RSD (%)	3,85

Se aplicaron la prueba F y la prueba t-Student (Tabla XX) a los resultados obtenidos con ambas columnas y se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados al cambiar de columnas, a pesar de los valores superiores del factor de *Tailing* o de cola obtenidos con la columna Novapak.

Tabla XX.- Aplicación de la prueba F y la prueba t-Student a 95% de confianza para el estudio de la Robustez en el ensayo de Disolución.

<i>F</i> crítico	7,15
<i>F</i> calculado	0,81
Se acepta la Hipótesis nula (H_0)	$F \text{ crítico} \geq F \text{ calculado } (s_A^2 = s_B^2)$
<i>t</i> crítico	2,2281
<i>t</i> calculado	1,23
Se acepta la Hipótesis nula (H_0)	$t \text{ crítico} \geq t \text{ calculado } (x_A = x_B)$

La validación del método permitió comprobar que el método desarrollado para la determinación de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg permite obtener resultados confiables, exactos y precisos, además de que las muestras pueden mantenerse estables. Para demostrar esta afirmación,

se decidió aplicar el método a tres lotes diferentes de productos para los ensayos de Potencia y Disolución (Tabla XXI (a y b) y Figuras 17 (A y B); 18 (A y B) Y 19 (A yB)).

Tabla XXI a.- Determinación de potencia en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.

<i>Muestras</i>	<i>Lote</i>	<i>Peso real (mg)</i>	<i>Replica</i>	<i>Potencia (%)</i>
M1	22296	52,9	1	104,45
			2	104,74
			3	104,50
M2		53,2	1	102,55
			2	101,45
			3	101,82
M3		53,1	1	103,73
			2	104,26
			3	104,28
			<i>Promedio (%)</i>	103,53
			<i>RSD (%)</i>	1,21
M1	23040	51,5	1	108,01
			2	107,96
			3	108,26
M2		51,4	1	106,80
			2	105,66
			3	106,04
M3		51,6	1	107,41
			2	107,96
			3	107,98
			<i>Promedio (%)</i>	107,34
			<i>RSD (%)</i>	0,89

Tabla XXI a (continuación).- Determinación de potencia en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.

Muestras	Lote	Peso real(mg)	Replica	Potencia (%)
M1	24028	52,3	1	106,32
			2	106,17
			3	106,50
M2		52,2	1	106,02
			2	105,72
			3	105,51
M3		52,3	1	105,99
			2	105,75
			3	105,30
			Promedio (%)	105,92
			RSD (%)	0,37

Tabla XXI b.- Determinación de disolución en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.

Muestra	Lote	Replica	Disolución (%)	
D1	22296	1	106,82	
		2	106,63	
		3	106,71	
D2		1	1	105,07
			2	105,18
			3	104,52
D3		1	1	104,53
			2	104,84
			3	104,86

Tabla XXI b (continuación).- Determinación de disolución en tres lotes de Moxifloxacin en tabletas de 400mg.

<i>Muestra</i>	<i>Lote</i>	<i>Replica</i>	<i>Disolución (%)</i>
D4	22296	1	103,36
		2	103,77
		3	103,12
D5		1	104,77
		2	104,67
		3	104,66
D6		1	103,06
		2	103,86
		3	103,93
		<i>Promedio (%)</i>	104,69
		<i>RSD (%)</i>	1,08
D1	23040	1	107,31
		2	107,11
		3	107,20
D2		1	105,55
		2	105,67
		3	105,00
D3		1	105,01
		2	105,34
		3	105,32
D4		1	104,24
		2	103,59
		3	103,83
D5		1	105,14
		2	105,15
		3	105,25

Tabla XXI b (continuación).- Determinación de disolución en tres lotes de Moxifloxacina en tabletas de 400mg.

<i>Muestra</i>	<i>Lote</i>	<i>Replica</i>	<i>Disolución (%)</i>	
D6	23040	1	103,53	
		2	104,33	
		3	104,41	
		<i>Promedio (%)</i>	105,17	
		<i>RSD (%)</i>	1,08	
D1	24028	1	85,85	
		2	85,68	
		3	85,85	
D2		1	96,67	
		2	96,78	
		3	96,92	
D3		1	95,81	
		2	96,03	
		3	95,87	
D4		1	94,77	
		2	94,79	
		3	94,92	
D5		1	97,05	
		2	95,40	
		3	96,51	
D6		1	90,15	
		2	89,40	
		3	89,91	
		<i>Promedio (%)</i>	93,24	
		<i>RSD (%)</i>	4,49	

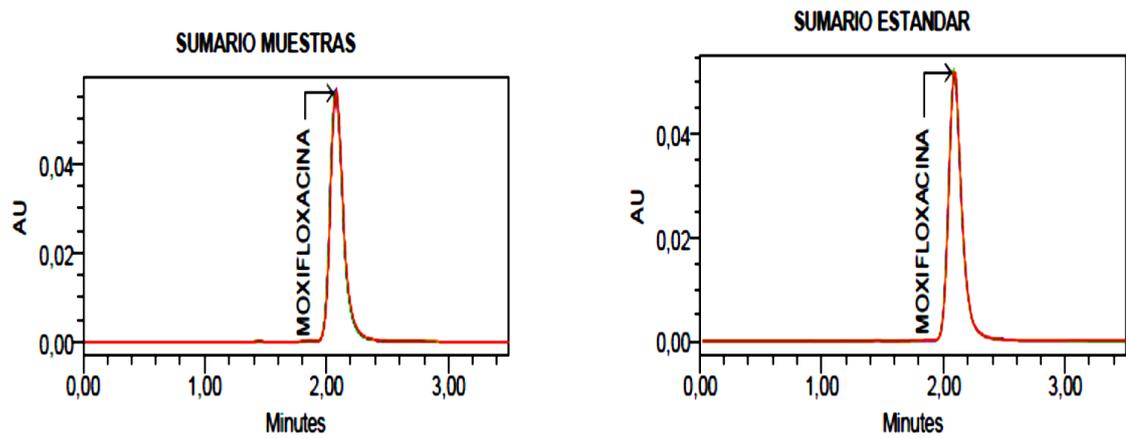


Figura 17 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg lote 22296.

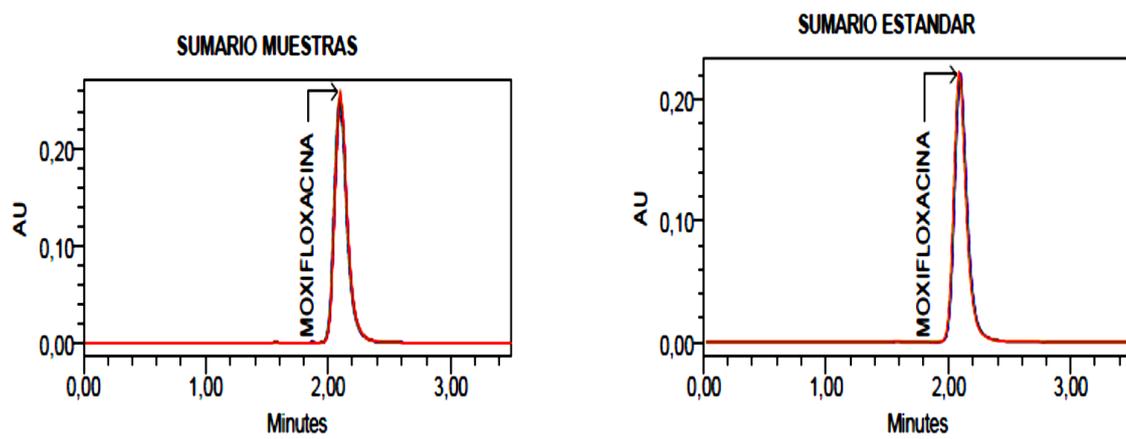


Figura 17 B.- Cromatograma de muestras de Disolución de Moxifloxacina en tabletas de 400 mg lote 22296.

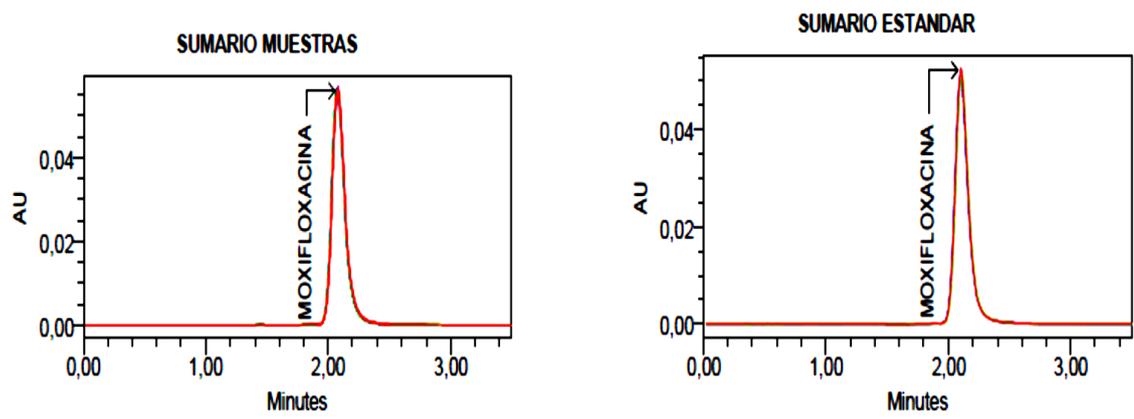


Figura 18 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 23040.

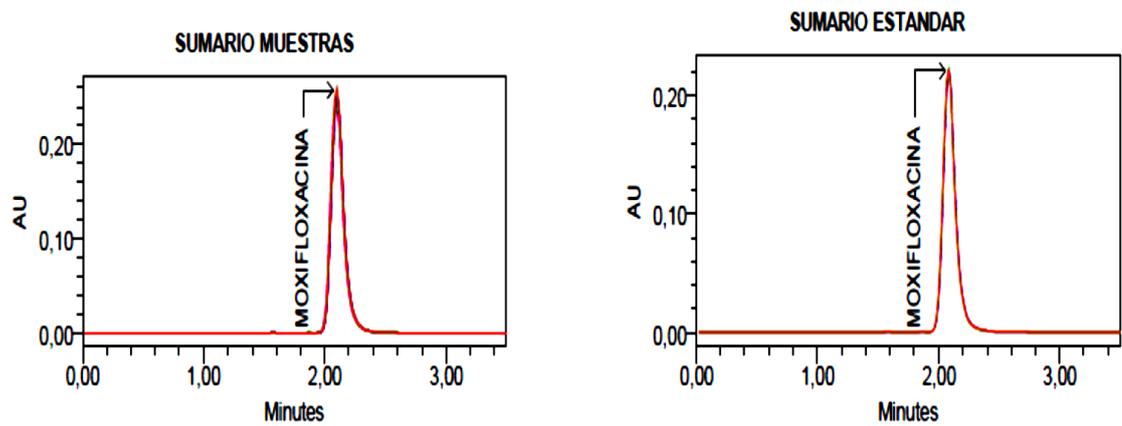


Figura 18 B.- Cromatograma de muestras de Disolución de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 23040.

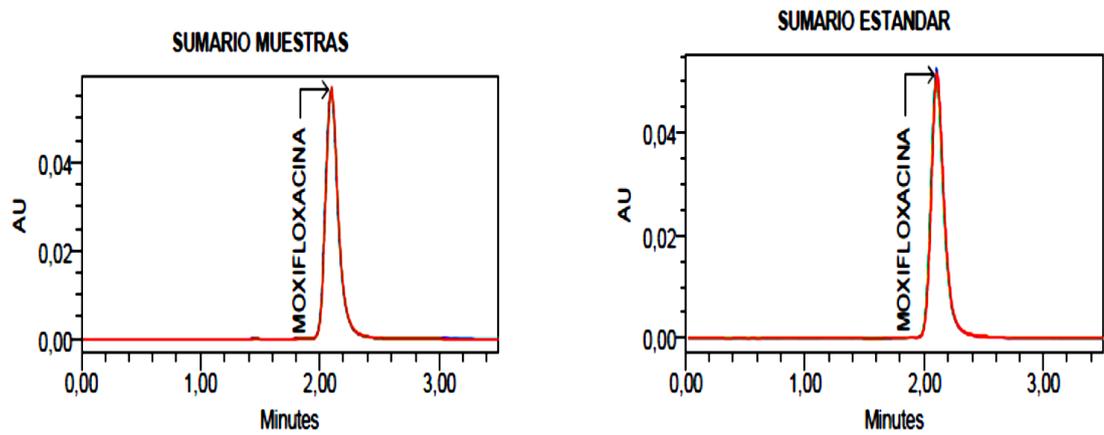


Figura 19 A.- Cromatograma de muestras de Potencia de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 24028.

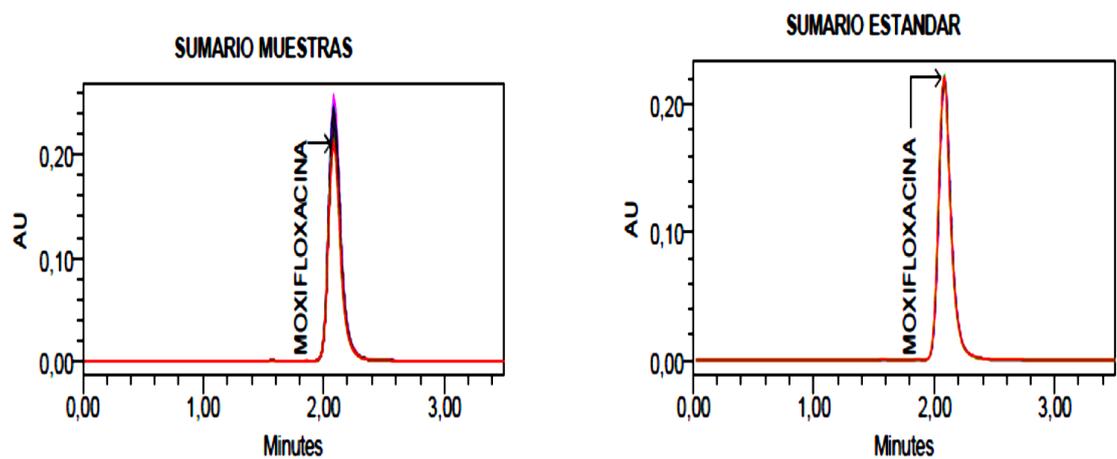


Figura 19 B.- Cromatograma de muestras de Disolución de Moxifloxacin en tabletas de 400 mg lote 24028.

CONCLUSIONES

Una vez realizada la parte experimental y analizados los resultados se llegó a las siguientes conclusiones:

La validación del método de Moxifloxacin 400 mg en tabletas permitió obtener resultados reproducibles, exactos y confiables.

Los resultados obtenidos para los ensayos de Potencia y Disolución se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

Las pruebas estadísticas permitieron corroborar que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados comparados.

Las muestras presentaron estabilidad al dejarlas preparadas de un día para otro y evaluar la reproducibilidad del sistema.

Al realizar cambios de columnas en el sistema se obtuvieron picos cromatográficos más anchos, sin embargo los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas y fueron confiables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- United States Pharmacopoeial Convention. The National Formulary (NF 29). USP 34: United States Pharmacopoeia. 34 ed. Rockville: Mack Printing; 2011. <1225> Validación de Procedimientos Analíticos. p. 857 – 862.
- 2.- World Health Organization (WHO). Buenas prácticas de la OMS para laboratorio de Control de Calidad de productos farmacéuticos. Reporte 44th. Ginebra: WHO; 2010. Serie de Informes Técnicos: 957. Anexo 1. p. 32 – 34.
- 3.- International Conference Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology. Ginebra: ICH; 1996.
- 4.- Organización Mundial de la Salud. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación. Ginebra: OMS; 1998.
- 5.- Instituto de Salud Pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública; 2010.
- 6.- Romero M.A. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de industrias farmacéuticas [Tesis doctoral. Monografía en Internet]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Unidad de

Química Analítica, 2001. [accesado 05 Junio 2013]. Disponible en:
<http://www.tdx.cat/handle/10803/3127>.

7.- Universidad de Antioquia. Parámetros de Calidad de los Comprimidos.
[database on Internet]. Medellin, Colombia. [citado 01 de Mayo de 2014].
Disponible en:
<http://docencia.udea.edu.co/qf/farmacotecnia/10/parametros.html#06>

8.- United States Pharmacopoeial Convention. The National Formulary (NF
29). USP 34: United States Pharmacopoeia. 34 ed. Rockville: Mack Printing;
2011. <711> Disolución. p 303.

9.- Skoog D., Holler J., Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed.
España: Mc Graw Hill; 2001. p. 785 – 830.

10.- Medline Plus. [homepage en Internet]. EEUU: Biblioteca Nacional de
Medicina EEUU; c2011 [actualizada 02 de mayo de 2013; consultado 26 de
mayo 2013]. Disponible en:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a600002-es.html>

11.- Nguyen H, Grellet J, Ba B, Quentin C, Saux M. Simultaneous
determination of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in serum by liquid
chromatography with column switching. *J. Chromatogr. B.* 2004; 810 (1): 77-
83.

- 12.- Laban-Djurdjević A, Jelikić M, Djurdjević P. Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. *J. Chromatogr. B.* 2006; 844 (1): 104-111.
- 13.- Motwani S, Chopra S, Ahmad F, Khar R. Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. *Spectrochim Acta A.* 2007; 68(2): 250-256.
- 14.- Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J. Pharmaceut Biomed.* 2009; 50: 117-126.
- 15.- Xu Y.H, Li D, LiuX, Li Y, Lu J. High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese. *J. Chromatogr. B.* 2010; 878 (32): 3437-3441.
- 16.- Khan M, Reddy C, Ravindra G, Reddy K, Dubey P. Development and validation of a stability indicating HPLC method for simultaneous determination of four novel fluoroquinolone dimmers as potential antibacterial agents. *J. Pharmaceut Biomed.* 2012; 59: 162-166.
- 17.- United States Pharmacopoeial Convention. The National Formulary (NF 31). USP 36: United States Pharmacopoeia. 36 ed. Rockville: Mack Printing; 2013. Moxifloxacin Ophthalmic Solution. p. 4414 - 4416.

18.- Miller J., Miller J. Método de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En: Estadística y Quimiometría para Química Analítica. España: Prentice Hall; 2002. p. 115-116.

19.- Ministerio de Salud de Costa Rica. Guía de validación de métodos analíticos. [database on Internet]. Costa Rica. [citado 22 de Febrero de 2014]. Disponible en:

<http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>

20.- Food and Drug Administration. [homepage of Internet]. Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. Estados Unidos: FDA U.S. Department of Health and Human Services; c1997 [actualizado 24 Febrero 2010; consultado 05 de Junio 2013]. Disponible en:

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>

21.- United States Pharmacopoeial Convention. The National Formulary (NF 31). USP 36: United States Pharmacopoeia. 36 ed. Rockville: Mack Printing; 2013. <711> Disolución. p. 307-313.

22.- Skoog D., Holler J., Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. España: Mc Graw Hill; 2001. p. 736.

23.- Regnault M. Desarrollo de un método analítico por HPLC. Caracas: Universidad Central de Venezuela. ISBN No. 980-12-0052-9. 2005

24.- Procedimiento Estándar de Operación (SOP) "Validación de Métodos Analíticos". N° C-SOP-05054. Laboratorio Calox International. Última revisión Marzo 2013.

25.-. Eurachem. Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. México: Centro Nacional de Metrología; 2005. Segunda edición.

Anexo 1

Fórmulas para la determinación de los resultados.

Cantidad de muestra real a pesar:

$$\text{Peso real de muestra: } \frac{\text{Peso promedio de tabletas} \times \text{Equivalente en peso de Moxifloxacina}}{\text{Cantidad declarada de la tableta}}$$

Potencia de Moxifloxacina:

$$\text{Potencia} = \frac{\text{Area}_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX} \times PP \times 100}{\text{Area}_{STD} \times DD \times P_{MX}}$$

Área_{MX} : Área de la muestra

Área_{STD} : Área del estándar

C_{STD} : Concentración del estándar

Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

PP : Peso Promedio de tabletas (mg)

P_{MX} : Peso de muestra (mg)

DD : Dosis declarada de las tabletas (400mg)

Disolución de Moxifloxacina:

$$\text{Disolución} = \frac{\text{Area}_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX} \times 100}{\text{Area}_{STD} \times DD}$$

Area_{MX} : Área de la muestra

Area_{STD} : Área del estándar

C_{STD} : Concentración del estándar

Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

DD : Dosis declarada de las tabletas (400mg)

Corrección de la cantidad materia prima real a pesar para la evaluación del parámetro de exactitud:

$$Peso\ real\ de\ Moxifloxacina\ MP = cantidad\ pesada \times potencia\ de\ MP$$

MP: materia prima

Peso Recuperado de Moxifloxacina en la determinación de exactitud:

$$Peso_{RECUPERADO} = \frac{Area_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX}}{Area_{STD}}$$

$Area_{MX}$: Área de la muestra

$Area_{STD}$: Área del estándar

C_{STD} : Concentración del estándar

Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

Porcentaje de Recuperación de Moxifloxacina en la determinación de exactitud:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{Peso_{RECUPERADO} \times 100}{P_{REAL}}$$

$Peso_{RECUPERADO}$: mg obtenidos de Moxifloxacina

$Peso_{REAL}$: mg calculado de Moxifloxacina

100: Factor para llevar a porcentaje

Límite de Detección (LOD):

$$LoD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

σ : Desviación estándar del punto de intersección

S: Pendiente de la curva

Límite de Cuantificación (LOQ):

$$LoQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ : Desviación estándar del punto de intersección

S: Pendiente de la curva

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS:

Media Aritmética de y: $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

Desviación Estándar: $s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$

Coeficiente de Variación: $CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$

Intervalo de Confianza de la Media: $IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$ t (95% probabilidad, n-1)

Pendiente de la Curva:
$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al Origen:
$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de Regresión:
$$R^2 = \frac{(n(\sum xy) - \sum x \sum y)^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Desviación Estándar de la Regresión:
$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Desviación Estándar de la Pendiente:
$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Desviación Estándar de la Ordenada al Origen:
$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Prueba t-Student a 95% de confianza:
$$t_{\text{exp}} = \frac{(\mu - \bar{x})\sqrt{N}}{s}$$

μ : cantidad de principio activo añadido

x : cantidad de principio activo recuperado

N : número de replicas (9)

s : desviación estándar del porcentaje de recuperación.

$t_{\text{crítico}}$: valor tabulado

t_{exp} : valor calculado

Hipótesis nula: $t_{\text{crítico}} > t_{\text{exp}}$ no existen diferencias significativas

Prueba F a 95% de confianza: $F_{\text{exp}}: S_a^2/S_b^2$

Hipótesis nula: $F_{\text{crítico}} > F_{\text{exp}} \quad S_a = S_b$

Grados de libertad: $N_a + N_b - 2$

$$S_{\text{conjunto}} = \sqrt{\frac{(N_a - 1)S_a^2 + (N_b - 1)S_b^2}{N_a + N_b - 2}}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{X_A - X_B}{S_{\text{conjunto}} \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}}}$$

Hipótesis nula: $t_{\text{crítico}} > t_{\text{exp}} \quad \text{no existen diferencias significativas}$

Anexo 2

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL
MÉTODO DE
MOXIFLOXACINA 400 mg TABLETAS

HOJA DE APROBACIÓN

Elaborado por:	Karla Lima	Firma/Fecha
	Analista de de Control de Calidad	
Revisado y Aprobado:	XXXXX	Firma/Fecha
	Jefe de Validación de Métodos Analíticos y Estabilidad On Going	
	YYYYYY	Firma/Fecha
	Gerencia de Control de Calidad	
ZZZZZZ	Firma/Fecha	
	Gerencia de Aseguramiento de la Calidad	

1. **OBJETIVO:** Proveer un procedimiento adecuado para la validación del método analítico de MOXIFLOXACINA 400mg TABLETAS, descrito en la técnica de análisis M-P-V41029101-2, Edición N° 2 (Potencia y Disolución), según metodología de Desarrollo Local, HPLC, a fin de demostrar que se desempeña uniformemente en conformidad con el nivel especificado.
2. **ALCANCE:** Aplica para ensayos de Valoración de Moxifloxacin bajo la forma farmacéutica de TABLETAS.
3. **RESPONSABLES:** Analista de Validación de Métodos, Jefe de Validación de Métodos, Gerencia de Control de Calidad y Aseguramiento de la Calidad.
4. **FRECUENCIA:** Cada vez que se realice un cambio a la metodología de análisis, formulación u otras características críticas del producto descrito en el alcance de este protocolo.

CONTENIDO

- 1. Definiciones**
- 2. Normas**
 - 2.1** Para el Personal
 - 2.2** Para el Producto
 - 2.3** Generales
 - 2.4** Equipos y Materiales
 - 2.5** Reactivos
- 3. Preparación de Reactivos**
- 4. Placebo, Estándar y Muestra**
- 5. Pruebas realizadas**
- 6. Acciones y/o Procedimientos para Potencia**
 - 6.1.** Aptitud del Sistema
 - 6.2.** Especificidad / Selectividad para Potencia
 - 6.3.** Linealidad del Sistema para Potencia
 - 6.4.** Precisión del Sistema para Potencia
 - 6.5.** Precisión del Método para Potencia
 - 6.6.** Robustez del Método para Potencia
 - 6.7.** Exactitud del Método para Potencia
 - 6.8.** Límite de Detección para Potencia
 - 6.9.** Límite de Cuantificación para Potencia
- 7. Acciones y/o Procedimientos para Disolución**
 - 7.1.** Especificidad / Selectividad para Disolución
 - 7.2.** Linealidad del Sistema para Disolución
 - 7.3.** Precisión del Método para Disolución
 - 7.4.** Robustez del Método para Disolución
- 8. Cálculos - Reporte de procedimiento**
- 9. Referencias**
- 10. Histórico**

1. DEFINICIONES

- **Validación:** Es comprobar y certificar, con evidencias convenientemente documentadas, que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal y como estaba previsto, dentro de intervalos definidos.
- **Verificación:** Confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos establecidos, es decir, consiste en evaluar el desempeño del método para el uso previsto.
- **Aptitud del sistema:** se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y muestras analizadas constituyen un sistema que puede evaluarse.
- **Precisión del sistema o adecuabilidad del sistema:** Verificar que el sistema (instrumento, analista, sustancia de referencia, etc.) se esté operando bajo criterios preestablecidos (referencia de textos oficiales) con el fin de asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
- **Placebo:** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.
- **Especificidad y/o Selectividad:** Capacidad de una técnica analítica de originar resultados que dependan en forma exclusiva del analito en presencia de posibles interferencias como componentes de la matriz, productos de degradación, etc.
- **Linealidad:** Capacidad de una técnica analítica dentro de cierto rango para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración.
- **Repetibilidad:** Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día) en la misma muestra homogénea y en un mismo equipo.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.
- **Precisión Intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, días, equipos, etc.

- **Límite de Detección:** Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual pueda ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
- **Límite de Cuantificación:** Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.
- **Sensibilidad:** Cambio de la respuesta del sistema de medición en función del cambio de la concentración del analito, es decir la sensibilidad corresponde a la pendiente de la curva de calibración.
- **Exactitud:** Grado de concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- **Recuperación:** Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.
- **Robustez:** Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
- **Ensayos Tipo I:** Ensayos que constituyen la medición cuantitativa del componente presente en la muestra. Se incluye en estos, los ensayos de potencia y uniformidad.
- **Ensayos Tipo II:** Ensayos que constituyen la medición cuantitativa de impurezas conocidas y desconocidas presentes en la muestra.
- **Ensayos Tipo III:** Ensayos que constituyen la medición de características propias del desempeño del producto terminado. Se incluye en este, la prueba de disolución.
- **Ensayos Tipo IV:** Incluyen los ensayos de identificación

2. NORMAS:

2.1. PARA EL PERSONAL:

- Utilice todo el equipo de seguridad: guantes, mascarillas, lentes de seguridad, máscaras contra gases y propipeta, de acuerdo al C: SOP-173 (Seguridad en el laboratorio de Control de Calidad)
- Trabajar bajo campanas de extracción los solventes orgánicos e inorgánicos utilizados en el análisis, de acuerdo al C: SOP-238 (Preparación, registro, identificación y almacenamiento de soluciones reactivos, valoradoras, fase móvil y medios de disolución).

2.2. PARA EL PRODUCTO:

- Trabajar con material de vidrio clase "A".

2.3. GENERALES:

- Siga las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Cualquier precedente u observación debe quedar registrado en el informe.

2.4. EQUIPOS Y MATERIALES:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC) Modular 717. Detector UV Dual λ 2487.
- Balanza Santorius MPower
- Ultrasonido Elmasonic E60H.
- Disolutor Erweka DT6
- Plancha de calentamiento / agitación.
- pH-metro Metrohm 827 pH Lab.
- MiliQ Ultra Pure Waters System MiliQ Plus

MATERIAL	DESCRIPCIÓN
Balones aforados	6000 mL /500 mL/100 mL / 50 mL / 25 mL / 10 mL
Pipetas volumétricas	4 mL / 2 mL / 0,5 mL
Pipetas graduadas	10 mL
Cilindro graduado	2000 mL
Bureta	10 mL
Beaker	250 mL
Mortero	-
Espátula	-

2.5. REACTIVOS UTILIZADOS:

- Metanol (grado HPLC)
- Acetonitrilo (grado HPLC)
- Fosfato Tribásico de Sodio Dodecahidratado
- Ácido Metanosulfónico
- Ácido Clorhídrico

3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS A UTILIZAR:

- **Buffer Tribásico de Sodio Dodecahidratado:** En un recipiente de capacidad adecuada, agregar 3,80 g de Fosfato Tribásico de Sodio

Dodecahidratado, disolver con agua destilada en cantidad suficiente para 1000 mL y mezclar.

- **Preparación de la Fase Móvil:** Buffer Fosfato Tribásico de Sodio: Acetonitrilo: Metanol: Ácido Metanosulfónico (50:25:25:1). Preparar una mezcla de Buffer Fosfato Tribásico de Sodio, Acetonitrilo, Metanol y Ácido Metanosulfónico en una proporción de 50:25:25:1, agitar y filtrar a través de membrana de 0,45 micras o similar.
- **Solvente para diluir el estándar y las muestras:** En un recipiente de capacidad adecuada, agregar 500 mL de Acetonitrilo, 500 mL de Metanol y 1000 mL de agua destilada y mezclar.

4. PLACEBO Y MUESTRAS:

4.1. PLACEBO:

El placebo es preparado a partir de materias primas suministradas por el Departamento de Control de Calidad tomando en cuenta la fórmula cuali – cuantitativa del producto que se muestra a continuación:

FORMULA MAESTRA				
PRODUCTO:	Moxifloxacina 400 mg Tabletas			Número de Registro: E.F.G. XXXXX
CODIGO SEMITERMINADO:	V41029101-2			
Nº FÓRMULA MAESTRA:	H-450			
TAMAÑO ESTANDAR:	54	KILOS		
	INSUMO	% EXCESO	FÓRMULA UNITARIA mg/tab.	CANTIDAD A PESAR (Kg)
	A		11,000	3,300
	B		138,233	41,470
	C		5,400	1,620
	D		9,000	2,700
	E		9,000	2,700
	F		0,900	0,270
	G		0,900	0,270
	H		0,167	0,050
	I		1,800	0,540
	J		3,600	1,080
	K		20,000	6,000
	L		97,920	29,376
	PESO TOTAL		180,000	54 Kg.

4.2. ESTÁNDAR:

Moxifloxacina Clorhidrato, Estándar Primario USP. Lote: F0H454. Potencia: 95,90%. Fecha de Expiración: 01/2014. Suministrado por el Departamento de Control de Calidad.

4.3. MUESTRAS:

Las muestras utilizadas en el análisis de validación son suministradas por el Departamento de Control de Calidad provenientes de Producción, se recibe una cantidad representativa acorde al análisis requerido de la validación, en este caso particular se hizo uso de Moxifloxacina 400 mg Tabletas. Lote: 24027. Fecha de elaboración: 10/2013. Fecha de expiración: 10/2016. El aspecto de la tableta es oblonga, con ranura de color amarillo.

5. PRUEBAS REALIZADAS:

Análisis	Potencia	Disolución
Especificidad/Selectividad	+	+
Linealidad del Sistema	+	+
Precisión del Sistema	+	-
Precisión del Método	+	+
Robustez	+	+
Exactitud	+	-
Límite de Detección	+	-
Límite de Cuantificación	+	-

(+)= Aplica

(-)= No aplica

(*)=Aplica igual condiciones de la potencia

6. ACCIONES Y/O PROCEDIMIENTOS PARA POTENCIA:

6.1. APTITUD DEL SISTEMA:

Procedimiento: Preparar una solución de estándar como se especifica en el punto 6.2.3 e inyectar seis veces en el equipo para determinar el factor de capacidad (k'), factor de simetría (T) y número de platos teóricos (N).

6.2. ESPECIFICIDAD / SELECTIVIDAD PARA POTENCIA:

Procedimiento: Determinar las áreas de la fase móvil, solvente, placebo, estándar y muestra, empleando las siguientes condiciones cromatográficas:

Condiciones Cromatográficas – Desarrollo Local:

- Columna: X Terra RP18; 5 micras; (3,9 x 150) mm.
- Flujo: 0,8 mL/min.
- Longitud de onda: 295 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL
- Fase Móvil:(Buffer Fosfato Tribásico de Sodio: Acetonitrilo: Metanol: Ácido Metanosulfónico) (50:25:25:1)
- Tiempo de Retención: \pm 2,3 min

6.2.1 Preparación del Placebo: Pesar alrededor de 53 mg de la preparación del placebo, transferir cuantitativamente a un balón de 100 mL, agregar solvente (punto 3) y disolver colocando en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos, completar a volumen con solvente. Tomar una alícuota de 2 mL, transferir a un balón de 25 mL y completar hasta el aforo con solvente.

6.2.2 Preparación del Estándar: Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Moxifloxacina Estándar de Referencia, transferir cuantitativamente a un balón de 10 mL, agregar solvente (punto 3), colocarlo en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos y completar a volumen con solvente. Tomar una alícuota de 2 mL y transferir a un balón de 25 mL, llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,02 mg/mL)

6.2.3 Preparación de la Muestra: Pesar exactamente el equivalente a 25 mg de Moxifloxacina en polvo en un balón aforado de 100 mL, agregar solvente (punto 3) y colocar en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos, completar a volumen con solvente. Tomar una alícuota de 2 mL y transferir a un balón de 25 mL, llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,02 mg/mL)

Criterio de Aceptación: La fase móvil, el solvente y el placebo no deben interferir en la lectura del estándar, ni presentar señales o lecturas similares a la solución de referencia.

6.3. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA POTENCIA:

Procedimiento: Se preparan soluciones estándar a 5 niveles de concentración, partiendo de una solución stock madre, luego realizar las diluciones correspondientes para cada nivel de concentración. Determinar las áreas de cada solución estándar empleando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. Registrar mediante una gráfica los resultados obtenidos, la cual debe incluir la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la curva de calibración y la suma de los cuadrados residuales.

Preparación de la Solución Stock Madre (SSM): Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Moxifloxacina Estándar de Referencia, transferir

cuantitativamente a un balón de 100 mL, agregar solvente, colocar en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos, completar a volumen con el mismo solvente. (Concentración Final: 0,25 mg/mL)

Para cada nivel de concentración tomar una alícuota de SSM y proceder de la siguiente manera:

- **Solución 80%:** Tomar 1,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,016 mg/mL)
- **Solución 90%:** Tomar 1,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,018 mg/mL)
- **Solución 100%:** Tomar 2,0 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,020 mg/mL)
- **Solución 110%:** Tomar 2,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,022 mg/mL)
- **Solución 120%:** Tomar 2,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 25 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,024 mg/mL)

- Inyectar por triplicado cada solución y obtener el promedio.
- Introducir los datos y obtener la curva de Área vs. Concentración real (mg/mL).
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM-V41029101-2-1.

Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación debe encontrarse entre 0,98 y 1,00.

6.4. PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA POTENCIA:

Procedimiento: Preparar una solución de muestra a la concentración de trabajo del 100% (Concentración Final: 0,02 mg/mL), tal como se describe en el punto 6.1.3 y determinar el área realizando 6 inyecciones empleando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

Criterio de Aceptación: RSD<2%

6.5. PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA POTENCIA:

Procedimiento: Preparar tres (3) muestras al 80%, tres (3) muestras al 100% y tres (3) muestras al 120% siguiendo el procedimiento indicado en el punto 6.1.4, usando un estándar a la concentración de trabajo (100%), tal como se describe en el punto 6.1.3. Para cada nivel de concentración se procede de la siguiente manera:

- **Muestra 80%:** Pesar exactamente alrededor de 41,2 mg de polvo de tableta y seguir el procedimiento descrito en el punto 6.1.4. (Concentración Final: 0,016 mg/mL)
- **Muestra 100%:** Pesar exactamente alrededor de 51,5 mg de polvo de tableta y seguir el procedimiento descrito en el punto 6.1.4. (Concentración Final: 0,020 mg/mL)
- **Muestra 120%:** Pesar exactamente alrededor de 61,8 mg de polvo de tableta y seguir el procedimiento descrito en el punto 6.1.4. (Concentración Final: 0,024 mg/mL)

- Inyectar 6 réplicas de estándar al 100%.
- Inyectar por triplicado cada muestra y obtener el promedio.
- Calcular el % obtenido y la desviación estándar relativa.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de Aceptación: RSD < 2%

6.6. ROBUSTEZ DEL MÉTODO PARA POTENCIA:

Procedimiento: Utilizar las mismas tres (3) muestras al 100% de Precisión Potencia (punto 6.4) y realizar algún cambio aleatorio y analizar las muestras bajo esas condiciones.

- **Condiciones iniciales:** Columna: XTerra RP18; 5 micras; 3,9 x 150 mm
- **Cambio a realizar:** Columna: NovaPack C18; 4 micras; 3,9 x 150 mm

- Inyectar 6 replicas de estándar al 100%
- Inyectar por triplicado cada muestra y obtener el promedio.
- Calcular el % obtenido y la desviación estándar relativa.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de aceptación: Los resultados obtenidos de las muestras analizadas bajo las nuevas condiciones en comparación con las de operación normal deben tener una diferencia < 2% y RSD < 2%.

6.7. EXACTITUD DEL MÉTODO PARA POTENCIA:

Procedimiento: Preparar tres (3) muestras para cada concentración como se indica en el **punto 6.1.4** a las concentraciones: 50%, 100% y 150% usando placebo + principio activo.

Pesar por separado el equivalente en peso de placebo y principio activo según el método. Hallar el porcentaje de recuperación de las nueve (9) determinaciones. Determinar el promedio y graficar para obtener la curva.

- Inyectar 6 replicas de estándar al 100%
- Inyectar por triplicado cada muestra y obtener el promedio.
- Calcular el % de recuperación y la desviación estándar relativa.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de aceptación:

- El Intervalo de confianza para la pendiente debe estar comprendido dentro de un intervalo alrededor de uno (1), alternativamente que el valor de la pendiente sea uno (1).
- El porcentaje de recuperación debe estar entre 98,0% y 102,0%
- RSD <2%

6.8. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD):

Procedimiento: Preparar soluciones estándar a 5 niveles de concentración (por debajo de las utilizadas en el **punto 6.2**), partiendo de una solución stock madre, luego realizar las diluciones correspondientes para cada nivel de concentración. Determinar las áreas de cada solución estándar empleando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. Registrar mediante una gráfica los resultados obtenidos, la cual debe incluir la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la curva de calibración y la suma de los cuadrados residuales.

Preparación de la Solución Stock Madre (SSM): Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Moxifloxacin Estándar de Referencia, transferir cuantitativamente a un balón de 100 mL, agregar solvente, colocar en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos, completar a volumen con el mismo solvente. (Concentración Final: 0,25 mg/mL)

Para cada nivel de concentración tomar una alícuota de SSM y proceder de la siguiente manera:

- **Solución 5%:** Tomar 0,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,001 mg/mL)

- **Solución 15%:** Tomar 1,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,003 mg/mL)
- **Solución 30%:** Tomar 2,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,006 mg/mL)
- **Solución 45%:** Tomar 3,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,009 mg/mL)
- **Solución 60%:** Tomar 4,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 100 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,012 mg/mL)

- Inyectar por triplicado cada solución y obtener el promedio.
- Introducir los datos y obtener la curva de Área vs. Concentración real (mg/mL).
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM-V41029101-2-1.

Una vez calculado el límite de detección, este debe ser comprobado mediante la inyección de tres (3) muestras que contenga el analito (Moxifloxacina) preparadas a una concentración conocida cercana al LOD y determinar la relación señal/ruido.

Criterio de Aceptación: El límite de detección corresponde a 3.3 veces la desviación estándar del punto de intersección con el eje de las ordenadas en relación a la pendiente de la curva de calibración; las cuales no son cuantificadas, solo detectadas por el equipo de Cromatografía Líquida (HPLC).

6.9. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ):

Procedimiento: Se usa la misma curva de calibración del punto 6.7 y calcula la concentración del LOQ tomando en consideración la pendiente y la desviación del punto de corte. Una vez calculado el límite de cuantificación, este debe ser comprobado mediante la inyección de tres (3) muestras que contenga el analito (Moxifloxacina) preparadas a una concentración conocida cercana al LOQ.

Criterio de Aceptación: El límite de cuantificación corresponde a 10 veces la desviación estándar del punto de intersección con el eje de las ordenadas en relación a la pendiente de la curva de calibración; y las cuales son cuantificadas.

7. ACCIONES Y/O PROCEDIMIENTOS PARA DISOLUCIÓN.

Condiciones de Disolución – Desarrollo Local:

- Aparato: 2 (Paleta)
- Medio: Ácido Clorhídrico 0,1N
- Volumen: 900 mL
- Velocidad de agitación: 45 r.p.m.
- Tiempo: 45 minutos

7.1. ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD PARA DISOLUCIÓN:

Procedimiento: Determinar las señales de la fase móvil, solvente, placebo, medio de disolución, estándar y muestra, empleando las siguientes condiciones cromatográficas:

Condiciones Cromatográficas – Desarrollo Local:

- Columna: X Terra RP18; 5 micras; (3,9 x 150) mm.
- Flujo: 0,8 mL/min.
- Longitud de onda: 295 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL
- Fase Móvil:(Buffer Fosfato Tribásico de Sodio: Acetonitrilo: Metanol: Ácido Metanosulfónico) (50:25:25:1)
- Tiempo de Retención: ± 2,3 min

7.1.1 Preparación del Estándar: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Moxifloxacina Estándar de Referencia, transferir cuantitativamente a un balón de 50 mL, disolver en medio de disolución, colocar en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos y completar a volumen con medio de disolución. Tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un balón de 10 mL, llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,08 mg/mL)

7.1.2 Preparación de la Muestra: Preparar la disolución como se indica en el método (ver condiciones en Precisión del método para Disolución, punto 7.3), al finalizar el tiempo, filtrar una porción de solución de muestra, tomar una alícuota de 2 mL y añadir 2 mL de Ácido Clorhídrico 0,1N, transferir a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,08 mg/mL)

Criterio de Aceptación: La fase móvil, el solvente y el placebo no deben interferir en la lectura del estándar, ni presentar señales o lecturas similares a la solución de referencia.

- Inyectar el estándar 6 veces y las soluciones de solvente, placebo, medio de disolución y muestra por triplicado.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

7.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA DISOLUCIÓN:

Procedimiento: Se preparan soluciones estándar a 5 niveles de concentración (Q-25%; Q-15%; Q+5%; Q+15%; Q+25%), partiendo de una solución stock madre, luego realizar las diluciones correspondientes para cada nivel de concentración. Determinar las áreas de cada solución estándar empleando las condiciones de análisis correspondientes. Registrar mediante una gráfica los resultados obtenidos, la cual debe incluir la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la curva de calibración y la suma de los cuadrados residuales.

Preparación de la Solución Stock Madre (SSM): Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Moxifloxacina Estándar de Referencia, transferir cuantitativamente a un balón de 50 mL, agregar medio de disolución, colocar en un baño ultrasónico por un tiempo de 10 minutos, completar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,2 mg/mL)

Para cada nivel de concentración tomar una alícuota de SSM y proceder de la siguiente manera:

- **Solución 55%:** Tomar 2,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,044 mg/mL)
- **Solución 65%:** Tomar 2,6 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,052 mg/mL)
- **Solución 85%:** Tomar 3,4 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,068 mg/mL)
- **Solución 95%:** Tomar 3,8 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,076 mg/mL)
- **Solución 105%:** Tomar 4,2 mL de SSM desde una bureta de 10 mL, trasvasar a un balón de 10 mL y llevar a volumen con solvente. (Concentración Final: 0,084 mg/mL)

- Inyectar por triplicado cada solución y obtener el promedio.
- Introducir los datos y obtener la curva de Área vs. Concentración real (mg/mL).
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación debe encontrarse entre 0,98 y 1,00.

7.3. PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA DISOLUCIÓN:

Procedimiento: Preparar las muestras según las condiciones mencionadas anteriormente y según el punto 7.1.3. Prepara un estándar al 100% como se menciona en el punto 7.1.2.

- Inyectar 6 replicas de estándar al 100%
- Inyectar por triplicado cada muestra y obtener el promedio.
- Calcular el porcentaje de disolución obtenido y la desviación estándar relativa.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de Aceptación: Q >80% y RSD<6%.

7.4. ROBUSTEZ DEL MÉTODO PARA DISOLUCIÓN:

Procedimiento: Utilizar las mismas seis (6) muestras al 100% de Precisión Disolución (punto 7.3) y realizar algún cambio aleatorio y analizar las muestras bajo esas condiciones.

- **Condiciones iniciales:** Columna: XTerra RP18; 5 micras; 3,9 x 150 mm
- **Cambio a realizar: Columna:** NovaPack C18; 4 micras; 3,9 x 150 mm

- Inyectar 6 replicas de estándar al 100%
- Inyectar por triplicado cada muestra y obtener el promedio.
- Calcular el % obtenido y la desviación estándar relativa.
- Ver reporte de procedimientos, cálculos y resultados en el Informe de Validación de Método de Análisis de Producto N° CC-INFM- V41029101-2-1.

Criterio de aceptación: Los resultados obtenidos de las muestras analizadas bajo las nuevas condiciones en comparación con las de operación normal deben tener una diferencia <2% y RSD <6%.

8. CÁLCULOS - REPORTE DE PROCEDIMIENTOS:

Cantidad de muestra real a pesar:

Peso real de muestra:
$$\frac{\text{Peso promedio de tabletas} \times \text{Equivalente en peso Moxifloxacina}}{\text{Cantidad declarada de la tableta}}$$

Potencia de Moxifloxacin:

$$Potencia = \frac{Area_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX} \times PP \times 100}{Area_{STD} \times DD \times P_{MX}}$$

$Area_{MX}$: Área de la muestra

$Area_{STD}$: Área del estándar

C_{STD} : Concentración del estándar

Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

PP : Peso Promedio de tabletas (mg)

P_{MX} : Peso de muestra (mg)

DD : Dosis declarada de las tabletas (400mg)

Disolución de Moxifloxacin:

$$Disolución = \frac{Area_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX} \times 100}{Area_{STD} \times DD}$$

$Area_{MX}$: Área de la muestra

$Area_{STD}$: Área del estándar

C_{STD} : Concentración del estándar

Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

DD : Dosis declarada de las tabletas (400mg)

Corrección de la cantidad materia prima real a pesar para la evaluación del parámetro de exactitud:

$$Peso\ real\ de\ Moxifloxacin\ MP = cantidad\ pesada \times potencia\ de\ MP$$

MP : materia prima

Peso Recuperado de Moxifloxacin en la determinación de exactitud:

$$Peso_{RECUPERADO} = \frac{Area_{MX} \times C_{STD} \times Fd_{MX}}{Area_{STD}}$$

$Area_{MX}$: Área de la muestra

$Area_{STD}$: Área del estándar
 C_{STD} : Concentración del estándar
 Fd_{MX} : Factor de dilución de la muestra

Porcentaje de Recuperación de Moxifloxacin en la determinación de exactitud:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{Peso_{RECUPERADO} \times 100}{P_{REAL}}$$

$Peso_{RECUPERADO}$: mg obtenidos de Moxifloxacin
 $Peso_{REAL}$: mg calculado de Moxifloxacin
100: Factor para llevar a porcentaje

Límite de Detección (LOD):

$$LoD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

σ : Desviación estándar del punto de intersección
S: Pendiente de la curva

Límite de Cuantificación (LOQ):

$$LoQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ : Desviación estándar del punto de intersección
S: Pendiente de la curva

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS:

Media Aritmética de y: $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

Desviación Estándar: $s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$

Coefficiente de Variación: $CV = \frac{s}{y} \times 100$

Intervalo de Confianza de la Media Poblacional: $IC_{(\mu)} = \bar{y} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$

t (95% probabilidad, n-1)

Pendiente de la Curva: $b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$

Ordenada al Origen: $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$

Coefficiente de Regresión: $R^2 = \frac{(n(\sum xy) - \sum x \sum y)^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$

Desviación Estándar de la Regresión: $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$

Desviación Estándar de la Pendiente: $S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$

Intervalo de Confianza de la Pendiente: $IC(b_1) = b_1 \pm tS_{b_1}$
t (95% probabilidad, n-1)

Desviación Estándar de la Ordenada al Origen: $S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$

Intervalo de Confianza de la Ordenada al Origen: $IC(b_0) = b_0 \pm tS_{b_0}$
t (95% probabilidad, n-1)

9. REFERENCIAS:

- Validación de Métodos Analíticos. Capítulo General <1225> USP 34.
- International Conference on Harmonization ICH- Q2B
- Validación de métodos de análisis. Manual basado en la guía de la EURACHEM Recopilado, traducido y editado por Alexis Oramas.
- Técnica de Análisis de Productos: Moxifloxacin 400 mg Tabletas. Código M-P- V41029101-2.

- SOP de Elaboración de Protocolo e Informe de Métodos Analítico N° C-SOP- 0504-2
- SOP de Validación de Métodos Analíticos N° C-SOP- 0505-4

10. HISTÓRICO:

Nº de la edición anterior / Fecha	Nº de la presente edición	Fecha de elaboración / Actualización	Justificación del cambio
N/A	CC-PRTM- V41029101-2-1		N/A

Autorización y entrada en vigencia		
Revisado por:	Revisado por:	Aprobado por:
_____	_____	_____
Jefe de Validación de Métodos Fecha:	Gte. Control de Calidad Fecha:	Gte. Aseguramiento de Calidad Fecha: