

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**Validación del método analítico por cromatografía
líquida de alta resolución (HPLC), para
determinación cuantitativa de Levofloxacin 500
mg/100 mL inyectable para infusión. Lima - 2011.**

Tesis para optar el título profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICA

Bach. MENDOZA ANCHAYHUA, MARITZA

AYACUCHO – PERÚ

2011

A mis padres: Miguel y Pilar por su dedicación, comprensión y apoyo. A mis abuelitos: Ricardo, Aurelia y Julia que me iluminan y guían desde el cielo; a mi añorado abuelito Luís que me acompaña en la vida. Y a mi único hermano Rolando añorado.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 Validación.....	6
2.2.1 Razones para hacer una validación.....	7
2.2.2 Tipos de validación.....	7
2.2.3 Documentación en la validación.....	9
2.2.4 Plan maestro de validación.....	9
2.2.5 Protocolo de validación	10
2.2.6 Informe Técnico.....	10
2.2.7 Validación de métodos analíticos.....	10
2.2.8 Características de funcionamiento de un método analítico.....	11
2.2.9 Clasificación de métodos analíticos.....	12
2.2.10 Parámetros de métodos analíticos.....	13
2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	16
2.4 Propiedades físicas, químicas y farmacológicas del analito.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Lugar de ejecución.....	21
3.2 Estándar de referencia.....	22
3.3 Diseño metodológico.....	22
3.4 Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución.....	22
3.5 Desarrollo de los parámetros de validación	23
3.5.1 Especificidad.....	23
3.5.2 Precisión.....	28
3.5.3 Exactitud.....	32
3.5.4 Linealidad.....	35
3.5.5 Robustez.....	38
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSIÓN.....	53
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. RECOMENDACIONES.....	62
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXO	

AGRADECIMIENTO

- ❖ A nuestra *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; forjadora de nuestra formación y realización profesional y humana.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que permitió mi formación profesional.
- ❖ Agradecimiento a Laboratorio Corporación Infarmasa S.A. que hizo posible la realización del presente trabajo.
- ❖ Agradecimiento profundo a la Q.F. Maricela López Sierralta, al Q.F. Emilio Ramírez Roca y a todas las personas quienes me apoyaron con el desarrollo del presente trabajo.

Título: Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/ 100 mL inyectable para infusión. Lima - 2011.

Autor: MENDOZA ANCHAYHUA, Maritza.

Asesor: LOPEZ SIERRALTA, Maricela.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo validar el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100 mL Inyectable para infusión, se desarrolló en el Laboratorio Infarmasa S.A, durante el periodo enero a mayo del 2011, con la finalidad de evidenciar y demostrar de manera sistemática y trazable, la efectividad de la validación del método analítico empleado por HPLC, para la determinación cuantitativa en la Ciudad de Lima.

El tipo de investigación es descriptiva y se evaluó los parámetros de especificidad, precisión, exactitud, linealidad y robustez; los resultados demuestran que el método es específico, la precisión intermedia resulta un CV de 0.70% siendo menor al 2% y la repetibilidad con un CV de 0.57% siendo menor al 1.5% lo cual se demostró la precisión del método que es capaz de dar resultados semejantes; la exactitud es de 99,69% con un CV de 0,67% el cual demuestra que está dentro de la especificación, con la que también se demuestra con prueba estadística de t estudent $t_{exp} < t_{tab}$ ($1.398 < 2.306$) lo cual estadísticamente no existe diferencia significativa entre el promedio de la recuperación y el 100%; confirmando que el método es exacto por dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero; la linealidad de sistema presentó una ecuación con una recta de regresión lineal ($y = 26438.05 x + 33.58$) con un $r = 0.99963$ y para la linealidad del método una recta de regresión lineal ($y=27376.17 x + 1.315$) con $r = 0.99951$ siendo r mayor 0.999 por lo que el método demuestra la capacidad para obtener resultados lineales, y por último con la robustez se demostró que el método permanece inafectado por pequeñas variaciones. Concluyéndose así que el método analítico propuesto es selectivo, preciso, reproducible, exacto, lineal, y robusto; de esta manera demostramos su validez; y se concluye que la validación sí cumple con las especificaciones establecidas.

Palabras claves: Validación de método analítico, cromatografía líquida de alta resolución, Levofloxacin.

I. INTRODUCCIÓN

El fin de la industria farmacéutica desde siempre ha sido producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Con los años, se han ido desarrollando recomendaciones e incorporando requerimientos que han evolucionado hasta una reglamentación estricta. Debido a esto, en los últimos años ha tomado fuerza el concepto de aseguramiento de la Calidad, que no es otra cosa que demostrar que lo que declara calidad, efectivamente la posea (Aguilar y col; 2002).

La calidad de un producto farmacéutico debe estar completamente probada, esto para cumplir con las exigencias de las autoridades sanitarias y sobretodo por brindar un producto verdaderamente eficaz a la población, tomando relevancia aun mayor por lo que si un medicamento no cuenta con los estándares de calidad adecuados pudiese tener consecuencias que perjudiquen a ésta. Por lo cual, en cualquier empresa es de suma importancia contar con sistemas que demuestren que el producto o servicio final es de calidad por ello, la industria farmacéutica se ha preocupado en implementar metodologías que intenten garantizarla. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máximas garantías de la calidad y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, es cuando surge el concepto de validación (Dalmau y

col, 1999). Una de las prácticas que se menciona en las guías de las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para desarrollar estos procesos de calidad en la industria farmacéutica es a través de la validación, herramienta que nos da la certeza de tener un proceso más eficiente y con menor ocurrencia de reprocesos y pérdidas. La validación es, por lo tanto, un procedimiento claramente diseñado para establecer en forma documentada que un sistema, un equipo, un proceso de producción o una metodología analítica de control de un producto, cumplen con los parámetros de calidad especificados (DIGEMID, 1999).

La validación de métodos analíticos es un tema de actualidad en el ámbito farmacéutico. Según las recomendaciones de diversas entidades como la Organización Mundial de Salud (OMS) y las Farmacopeas oficiales, entre otras entidades, además del creciente interés de la industria farmacéutica por el aseguramiento de la calidad y búsqueda de la mejora de la productividad, señalan la necesidad de validar los métodos analítico (OMS, 1996).

La validación de un método de análisis se define como la obtención de pruebas convenientemente documentadas, demostrativas, de que el método es suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de un intervalo definido (Calpena y col; 2001).

El análisis de productos farmacéuticos por HPLC, constituye actualmente una necesidad, y debido a su creciente difusión, representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio de análisis, como es el caso de la industria farmacéutica, debido a que evita o reduce errores que pueden llevar a situaciones de riesgo al consumidor, así como reducir repeticiones analíticas, dando en cambio mayor confiabilidad en los resultados obtenidos. (Castro y col; 2003).

Dada la importancia de obtener resultados cada vez mas precisos y exactos en el análisis cuantitativo de un producto farmacéutico y observando que el dosaje de levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión, como producto terminado no es tratado en las farmacopeas oficiales, surge la posibilidad de desarrollar la técnica de análisis alternativa empleándose un equipo de HPLC y los medios adecuados para su cuantificación.

Sin embargo, una vez desarrollado un método analítico por HPLC, o antes de su aplicación, al igual que cualquier otra técnica analítica debe ser validada con la finalidad de dejar en evidencia que el método analítico es confiable, exacto y reproducible.

Por todo lo manifestado anteriormente, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de levofloxacin 500 mg/ 100 mL inyectable para infusión.

Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar y determinar la especificidad del método analítico de levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión.
- 2.- Comprobar la precisión del método analítico para determinar el contenido de levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión.
- 3.- Evaluar y determinar la exactitud utilizando el método analítico de contenido para levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión.
- 4.- Determinar la linealidad utilizando el método analítico de contenido para levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión.
- 5.- Evaluar la robustez del método analítico de levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Saeed y col. (2007), optimizaron el análisis de levofloxacinó por HPLC utilizando la técnica de calibración multivariante. Un método rápido y sensible a la fase reversa de alto rendimiento de cromatografía líquida (HPLC) para el análisis de levofloxacinó en muestra a granel, formulaciones de dosificación y suero humano se describe. Este método empleó una columna Nucleosil, C18 (10 μm , 25 cm x 0,46 cm) de columna con una fase móvil de agua y acetonitrilo (6:5), donde el ácido fosfórico se utiliza para ajustar el pH a 2.9 y el propilparabeno como estándar interno. La Optimización del análisis de la levofloxacinó, se llevó a cabo utilizando la técnica de calibración multivariante y la respuesta del detector se registró a cinco diferentes longitudes de onda. Una respuesta lineal ($r > 0,9999$) se observó en el rango de 40 a 10.000 ng/mL. El método muestra buenas recuperaciones, la norma relativa intra e inter-día desviaciones fueron menos del 1,2%. Los parámetros de validación como especificidad, precisión y robustez también determinados. El método puede ser convenientemente utilizado para el análisis de levofloxacinó en suero humano por procesos farmacocinéticas, formulaciones farmacéuticas.

Lalitha y col. (2009), validaron la estabilidad del método de levofloxacino indicando la fase reversa por HPLC en presencia de los productos de degradación, sus impurezas relacionadas con el proceso y la identificación de producto de degradación oxidativa. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una estabilidad validada específica que indique en fase reversa método de cromatografía de líquidos para la determinación cuantitativa de levofloxacino, así como su determinación de sustancias relacionadas en muestras a granel, formas farmacéuticas, en presencia de los productos de degradación y sus impurezas relacionadas con el proceso. Obligados estudios de degradación se realizaron en muestras a granel de levofloxacino como por las condiciones propuestas por International Conference on harmonization of analytical procedures (ICH) estrés recetada con ácidos, bases, oxidantes, la hidrólisis del agua, el estrés térmico y la degradación fotolítica para mostrar el poder indicadores de la estabilidad del método. Degradación significativa se observó durante el estrés oxidativo y el producto de degradación formada fue identificado, la degradación leve a estrés ácido, no se observó degradación en las condiciones de estrés. El método cromatográfico fue optimizada utilizando las muestras generadas a partir de estudios de degradación forzada y la solución de la impureza de pinchos. Buena resolución entre los picos corresponden a procesos relacionados con las impurezas y productos de degradación de la sustancia analizada se han logrado en la columna de C18 con la fase móvil consiste en una mezcla de 0,5% (v / v) trietilamina en sodio dihidratado ortofosfato diácido (25 mM, pH 6,0) y metanol utilizando un gradiente lineal simple. La detección se realizó a 294 nm.

El límite de detección y el límite de cuantificación para el levofloxacino y

sus impurezas relacionadas con el proceso se establecieron.

Las soluciones de ensayo que se analizaron destacó a la norma calificada de trabajo de levofloxacino y el balance de masa en cada caso fue entre 99,4 y 99,8% lo que indica que el método por HPLC desarrollado fue indicadores para la estabilidad. La validación de los países desarrollados método de HPLC se llevó a cabo según los requisitos de la International conference on harmonization of analytical procedures (ICH). El método desarrollado por cromatografía líquida se encontró que era apropiada para verificar la calidad de las muestras a granel de levofloxacino en el momento de la liberación de los lotes y también durante sus estudios de estabilidad (estabilidad a largo plazo y acelerados).

2.2. VALIDACIÓN

La validación ha sido un concepto amplio y comúnmente definido. Sin embargo, los múltiples artículos publicados por expertos y estudiosos, poco han aportado a las ideas de Nash, quien en 1979 concluía en un artículo pionero, ya clásico en la materia, que la validación tendría su apogeo y reconocimiento dentro de al menos 15 años. Hoy, 30 años después, resulta que ha sido así: la validación es una especificación que se sobreentiende cuando se está desarrollando cualquier procedimiento farmacéutico, ya sea de análisis o de producción. Incluso los pasos y fases citados para desarrollar una validación, no difieren de algunas validaciones que se llevan a cabo hoy en día. Nash planteaba como parámetros básicos a asegurar la calibración de los equipos y el mantenimiento del proceso y de los equipos, la calificación de equipos y productos y una atención especial a los cambios: deberán ser auditados y monitorizados los pasos claves en el proceso. La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), define la validación como "la planificación, ejecución, verificación y documentación de

un plan que asegura que un equipo, procedimiento, proceso, actividad o servicio, cumple con las especificaciones establecidas previamente y lo hace de forma reproducible y homogénea a lo largo del tiempo (AEFI-A, 2001).

La validación, consiste en establecer la evidencia documentada que proporciona un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto, que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados (Palomino, 2008); (FDA, 2002),

2.2.1 RAZONES PARA HACER UNA VALIDACIÓN (Latfar International Consulting, 2009)

- Estar acordes con las regulaciones gubernamentales.
- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, para así mejorar la consistencia de la calidad.
- Reducir costos ya que un proceso correctamente validado y controlado minimizará el número de fallas y repeticiones.

2.2.2 TIPOS DE VALIDACIÓN

a) Validación Prospectiva

Consiste principalmente en ejecutar un protocolo de validación, antes de que el proceso sea liberado o aprobado. Generalmente se aplica para procesos de productos en etapa de desarrollo y a metodologías analíticas. Se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto, basado en resultados obtenidos antes de que el producto involucrado en ese proceso salga al mercado (Rodríguez, 2004).

b) Validación Concurrente

Es establecer, mediante evidencia documentada, que un proceso hace lo

que se presume de él, basándose en un protocolo planeado con anticipación. Consiste principalmente en el monitoreo de los procesos y etapas críticas durante los procesos de producción y en el producto final obtenido. Es el tipo de validación que se puede realizar para lotes de producción consecutivos de un producto (Rodríguez, 2004). Se basa en la información obtenida durante el desarrollo del mismo; aquí se toma en cuenta:

- Monitoreo de variables críticas en el proceso, para demostrar que el mismo se encuentra bajo control.
- Se recolecta datos sobre el proceso productivo.
- Se requiere como mínimo tres lotes consecutivos (Balbín, 2008).

c) Validación Retrospectiva

Se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos con la información histórica del producto involucrado (Chaloner y Larsson, 1998).

Está basada principalmente en la revisión y análisis de la información histórica del mismo, se realiza en productos que se encuentran en el mercado, cuyo proceso de manufactura se considera estable y cuando las características del producto, económicamente no justifica hacer una validación prospectiva o concurrente (Balbín, 2008).

Se utiliza principalmente para productos, procedimientos y procesos bien establecidos y cuando económicamente no se justifica realizar una validación prospectiva o concurrente, dado a su carácter poco preventivo (Rodríguez, 2004).

d) Revalidación

Repetición de la validación de un proceso para proporcionar la seguridad de que los cambios introducidos en el mismo (por ejemplo equipo), de acuerdo a

procedimientos de control de cambios, no afectarán adversamente las características del proceso ni la calidad del producto (Chaloner y Larsson, 1998). Es la repetición de un proceso de validación o una parte del mismo, es normalmente menos extensa que la validación inicial y se da por cambio o reemplazo de una pieza crítica en un sistema o equipo; cambio de uno de los componentes críticos de la formulación; cambio de instalaciones; cambio de tamaño del lote de fabricación; unidades producidas fuera de especificación en lotes consecutivos (Palomino, 2008).

2.2.3 DOCUMENTACIÓN EN LA VALIDACIÓN

La documentación es parte esencial de la validación, esta tiene por objetivo definir las especificaciones de todos los materiales y métodos empleados, asegura que las personas autorizadas posean toda la información necesaria para decidir la aprobación de la validación. El diseño y uso de un documento depende del fabricante. La documentación debe estar diseñada de acuerdo con el proceso, sistema o producto específico. Se comienza con un protocolo y se culmina con un informe técnico (AEFI-C, 2001).

2.2.4 PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN

Es el desarrollo planificado y sistemático de todas las actividades relacionadas con el proceso de validación. El propósito del plan maestro de validación, es abarcar todo lo relacionado con el programa de validación, de uno o más elementos usados en un producto, proceso o sistema (Balbín, 2008). El plan maestro de validación, refleja el análisis que la empresa ha hecho de si misma en relación al cumplimiento del compromiso de las actividades involucradas. Incluye, desde luego un cronograma en el cual la empresa indica qué actividades, y con qué recursos alcanzará sus objetivos (Kibbe, 2000).

2.2.5 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Conjunto de registros que permiten documentar el proceso de validación, para proporcionar evidencia de los resultados obtenidos y permite analizar las fortalezas y debilidades del proceso. En el que se incluyen: objetivo, alcance, responsabilidades, flujo de producción y datos del proceso de fabricación, datos sobre la calificación de los equipos que intervienen en la fabricación, dictamen y certificado de la calificación (AEFI-C, 2001).

Es un documento que se revisa y autoriza antes de ser ejecutado, que describe la entidad bajo consideración, las pruebas planeadas y los criterios de aceptación (Salazar, 1999).

2.2.6 INFORME TÉCNICO

Es el documento donde se recoge los resultados de las pruebas realizadas según el protocolo. En este documento se adjunta gráficos, esquemas, certificados de calibración de los instrumentos de medición utilizados, etc. Este documento incluye: Objetivos, resultados, incidentes ocurridos, conclusiones, anexos y un dictamen (Latfar International Consulting, 2009).

2.2.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio que las características de ejecución de un método, cumple con los requerimientos para las aplicaciones habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos (USP 32, 2009). Es la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (AEFI-A, 2001); (Calpena y col; 2001).

El laboratorio deberá validar:

- Métodos no estandarizados.

- Métodos no diseñados o desarrollados internamente.
- Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados.
- Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y, si es necesario, se debe efectuar una nueva validación.

a) IMPORTANCIA

- La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Se trabaja con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales (AEFI-A, 2001).

b) INICIO DE UNA VALIDACIÓN

La validación empieza en la planificación, formalizada usualmente a través de un plan maestro de validación (PMV).

Esta planificación incluye prever la realización de todas las instancias de calibración, mantenimiento, capacitación, desarrollo de documentos, etc., que corresponda, antes de comenzar con las actividades de validación propiamente dichas (AEFI-A, 2001).

2.2.8 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en si mismo. No obstante el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases (AEFI-A, 2001); (Castro y col; 1999).

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

2.2.8.2 Características de idoneidad. La utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

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

2.2.9 CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos analíticos descritos varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación (USP 32, 2009) . Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

Categoría I. Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos.

Categoría II. Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos de límites.

Categoría III. Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de principios activos) de un producto farmacéutico.

Categoría IV. Ensayo de identificación de producto farmacéutico. Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica.

En la tabla se indica los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

TABLA N° 01: Datos requeridos para la validación según las categorías de métodos analíticos.

Características de desempeño Analítico	Ensayos Categoría I	Ensayos Categoría II		Ensayos Categoría III	Ensayos Categoría IV
		Prueba de limite Cuantitativa	Prueba de limite cualitativa		
Linealidad	Si	Si	No	*	No
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
Rango	Si	Si	*	*	No

Fuente: USP 32, 2009

(*) Puede requerirse, mientras dependa de la naturaleza de la prueba específica.

2.2.10 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en

función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en validación son:

TABLA Nº 02: Especificaciones de los parámetros de validación para el levofloxacin hemihidrato.

PRUEBAS EFECTUADAS	ESPECIFICACIONES
ESPECIFICIDAD	
Lectura del placebo	Interferencia no mayor al 2.0 %
Principio activo y muestra	90,0% - 110%
PRECISIÓN	
Repetibilidad del sistema	
Coefficiente de variación (CV)	<1,5%
Precisión Intermedia	
Coefficiente de variación (CV)	<2,0%
EXACTITUD	
Porcentaje de recuperación	98,0% - 102,0%
Coefficiente de variación del % de recuperación total	f < 5 %
LINEALIDAD	
Recta de regresión	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	>0,999
Coefficiente de determinación (r^2):	> 0,999
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f):	<5,0%
Pendiente distinta de cero	(t exp > t tabla)
Intercepto (a) cercano a cero	(t exp < t tabla)
ROBUSTEZ	
Coefficiente de variación del método	<1,5%
Coefficiente de variación entre el resultado del estudio de robustez y el resultado de estudio de repetibilidad	<2,0%

FUENTE: AEFI – 2001; Balbín, 2008.

2.2.10.1 Especificidad. Es la capacidad del método para evaluar únicamente el principio activo íntegro de forma exacta y específica, en presencia de los componentes que puedan esperar estar presentes en la muestra, como por ejemplo: impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz (USP 32, 2009).

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma (AEFI-A, 2001).

2.2.10.2 Precisión. Expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas (Lau, 2004).

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio. El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más – menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos (AEFI-A, 2001).

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí aunque, la USP 32 expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, mientras que la Norma Británica incluye sólo la repetibilidad y la reproducibilidad (USP 32, 2009).

- **Repetibilidad.** Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos durante una misma sesión de trabajo en un período corto.

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

Uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito (Lau, 2004).

- **Precisión intermedia.** Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas, días diferentes, equipos o aparatos diferentes y en un mismo laboratorio. Se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad (Lau, 2004).

2.2.10.3 Exactitud. Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él (AEFI-A, 2001); (USP 32, 2009).

2.2.10.4 Linealidad. Es la capacidad del método analítico para determinar la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método (AEFI, 2001-A), (USP 32, 2009).

2.2.10.5 Robustez. Medida de la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas pero deliberadas variaciones en el procedimiento (USP 32, 2009).

2.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

La cromatografía se ha desarrollado para llegar a ser el principal método de Separación de especies químicas estrechamente relacionadas.

Según define la IUPAC, "La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede ser extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa".

Se basa en la partición de solutos entre dos fases: La fase estacionaria y la fase móvil, la separación ocurre por migración de los analitos en mezclas a diferentes velocidades. (USP 32, 2009).

La velocidad de migración está gobernada por diferentes interacciones entre un soluto (conducido por un líquido e movimiento) y el absorbente (sólido o líquido).

En el caso más simple un cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: La bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora (Quattrochi, 1992).

2.3.1 Calibración del equipo HPLC

Actividad destinada a demostrar que un instrumento de medida produce

resultados dentro de los límites de error establecido y comparable a los obtenidos con un sistema de referencia en un rango apropiado de medidas. La calibración forma parte de la calificación, se aplica a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto en el ámbito modular como del sistema completo.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

- Calificación de instalación.
- Calificación de operación.
- Calificación de desempeño.
- Calificación de mantenimiento.

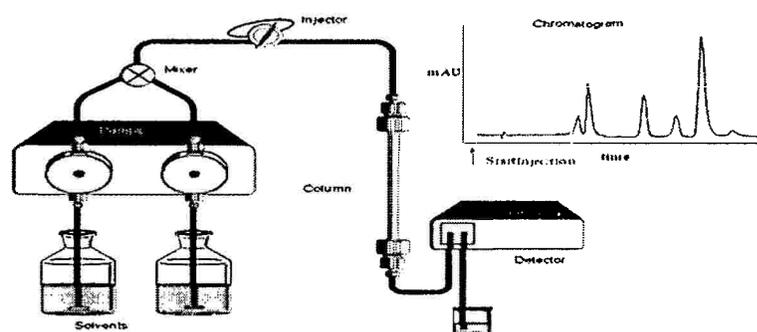


FIGURA N° 01: Componentes del equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

FUENTE: Grupo tecnológico "Agilent technologies".

2.4 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL ANALITO

2.4.1 LEVOFLOXACINO (Flores, 2002)

Fórmula química: $C_{18}H_{20}N_3FO_4$

Peso molecular : 361.368 g/mol.

Características : Polvo cristalino amarillo claro, inodoro y amargo.

Solubilidad : Poco soluble en agua, en metanol y en etanol.

FORMULA ESTRUCTURAL

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

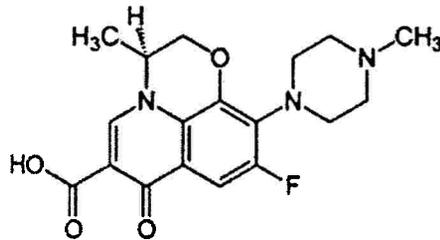


FIGURA N° 02: Estructura química de levofloxacin.

FUENTE: The Merck Index, 1993.

El levofloxacin es un antibiótico sintético de amplio espectro. El levofloxacin es el enantiómero S del racemato, ofloxacin, un agente antimicrobiano de fluoroquinolona, con casi el doble de la potencia de la ofloxacin con sustancialmente menos toxicidad. La actividad antibacteriana del ofloxacin radica principalmente en el enantiómero S. El mecanismo de actuación del levofloxacin y de otro antimicrobiano de fluoroquinolona implica la inhibición de la ADN girasa (topoisomerasa II bacteriana), una enzima necesaria para la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN. El levofloxacin está disponible que puede administrarse por vía oral o por vía intravenosa.

El levofloxacin es efectivo en contra de un buen número de bacterias Gram positivas y Gram negativas, por lo que se considera un antibiótico de amplio espectro. Por esa razón, se acostumbra administrar el levofloxacin de manera empírica en infecciones como la neumonía bacteriana, adquirida en la comunidad o infecciones urinarias antes de que se conozca el organismo causal específico. Una vez identificado el germen etiológico, se puede omitir el levofloxacin a cambio de un antibiótico de espectro más específico.

Presentaciones: Tabletas de 500 mg, 750 mg; Solución inyectable de 100 mL con 500 mg de levofloxacino; solución inyectable de 150 mL con 750 mg de levofloxacino.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se realizó en el Área de Control de Calidad; del Laboratorio de Corporación Infarmasa (Av. Nicolás Ayllón 3130. Antes Carretera Central Km. 4,5 Ate, Lima – Perú) durante los meses de enero a mayo 2011.

3.2 Población: Levofloxacin 500 mg/100 mL bajo la forma farmacéutica de inyectable, del lote N° E-2126329 que consta de 300 unidades, producto terminado contenido en envase definitivo en el Área de Control Físico-Químico del departamento de Control de Calidad de Laboratorio de la Corporación Infarmasa.

3.3 Muestra: 10 viales de levofloxacin 500 mg/100 mL, llevando a un pool de 1 litro de muestra (el muestreo se realizó cogiendo tres del inicio de la producción de 100 unidades, cuatro del medio de la producción de 100 unidades y tres del final de la producción de 100 unidades de un total de un lote de 300 unidades, de acuerdo al instructivo para el análisis físico-químico de validación). El excipiente a utilizar son preparados por el área de producción; analizado por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) del área de fisicoquímico - Departamento de Control de Calidad – Laboratorio Corporación Infarmasa.

3.4 ESTANDAR DE REFERENCIA

El estándar que se utilizó fue levofloxacino hemihidrato (Farmacopea Británica BP).

Nombre : Levofloxacino hemihidrato

Lote : SV102515

Fecha-Expiración : 2012-06-30

Potencia : 98,92%

3.5 DISEÑO METODOLÓGICO

3.5.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrolló la validación del método analítico siguiendo estrictamente el procedimiento del protocolo de validación de contenido de levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable para infusión realizando todos los parámetros de estudio para la validación utilizado por el Laboratorio Corporación Infarmasa.

3.5.2 ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Este proceso se realizó inyectando sucesivamente la solución estándar de referencia, con lo cual se comprobó el funcionamiento del sistema: bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos, conforme a la técnica de análisis.

3.5.2.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE PARA INFUSIÓN:

3.5.2.1.1 PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL

Lauril sulfato de sodio 0,24 %, se pesó 2,4 g de lauril sulfato de sodio grado HPLC y se llevó a una fiola de 1 L y se disolvió con 450 mL de agua, se enrasó con agua y se homogenizó. Se preparó una mezcla filtrada y desgasificada de 348 mL de lauril sulfato de sodio al 0,24 %, 490 mL de acetonitrilo y 12 mL de ácido acético glacial.

3.5.2.1.2 PREPARACIÓN DE DILUYENTE

Ácido clorhídrico 0,05 N (Se tomó 4,2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se llevó a una fiola de 1 L que contiene 500 mL de agua, se enrasó con agua y se homogenizó).

3.5.2.1.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LEVOFLOXACINO HEMIHDRATO:

COLUMNA : Octadecilsilano (C18 –150 x 4,0 mm x 5 micrones marca Zorbax) o equivalente.

FLUJO : 1,0 mL/min.

TEMPERATURA : 40° C.

LONGITUD DE ONDA : 294 nm.

VOLUMEN DE INYECCION : 5 uL.

FASE MOVIL : Lauril sulfato de sodio al 0,24 %:
acetoniitrilo: ácido acético glacial
(348:490:12).

TIEMPO DE RETENCIÓN APROX. : 2,3 minutos.

TIEMPO DE ELUCIÓN : 5,0 minutos.

3.5.3 DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación de la técnica analítica de levofloxacin hemihidrato, se realizó según los siguientes parámetros:

3.5.3.1 ESPECIFICIDAD

Se procedió a evaluar sometiendo el excipiente, analito y levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable a estrés como degradación de termólisis, fotólisis, alcalina, ácida y oxidación. Se consideró los siguientes factores en la comparación de este parámetro:

a) PREPARACIÓN DEL ESTANDAR: (Por triplicado)

Se pesó con precisión alrededor de 53 mg de levofloxacino hemihidrato. Se transfirió a una fiola de 100 mL, se añadió 60 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5,0 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró. Se llevó a una concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

b) DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Para el caso de levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable por no contar con su producto de degradación se sometió a una degradación forzada (tratamiento por calor, luz artificial, con hidróxido de sodio 1N, ácido clorhídrico 1N, peróxido de hidrógeno al 3%,) el producto terminado, analito y el excipiente.

➤ TRATAMIENTO POR CALOR, LUZ ARTIFICIAL (Por triplicado)

Se sometió al analito excipiente y producto terminado a tratamiento por calor a 80 °C y se expuso a la luz artificial por 07 días y se procedió a su análisis según metodología analítica.

Para el excipiente: Se transfirió 5 mL del excipiente de levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para Infusión a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente; se hizo lo mismo con el excipiente sometido a la luz, sometido al calor.

Para el analito: Se pesó 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato, (una muestra sometido a tratamiento de la luz, sometida al calor), se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, homogenizó y filtró.

Para el producto terminado: Se tomó 5 mL de producto terminado sometido a tratamiento por luz y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente; se hizo lo mismo con el producto terminado, se sometió a tratamiento por calor.

➤ **TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO, ACIDO CLORHIDRICO**
(Preparación por triplicado)

Las muestras tanto del analito puro, el excipiente y producto terminado, se preparó según la metodología analítica, se sometió a hidrólisis ácida y básica con la adición de 10% de diluyente para disolver (principalmente al analito) y 20% de volumen de HCl 1N y/o 20% de volumen de NaOH 1N respectivamente y se llevaron a baño maría a 80 °C por 30 minutos. Luego de la exposición al baño maría se neutralizó inmediatamente con 20% de volumen de NaOH 1N y/o HCl 1N respectivamente. Se procedió:

Para el excipiente: Se transfirió 5 mL de excipiente a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10mL de HCl 1N y/o 10mL de NaOH 1N. Se sometió a baño maría a 80°C x 30minutos. Luego de este sometimiento, se neutralizó inmediatamente con 10 mL de NaOH 1N y/o adicionó 10 mL de HCl 1N, se enfrió y enrasó a volumen con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

Para el analito: Se pesó 26,5 mg de levofloxacin hemihidrato y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10 mL de HCl 1N y/o 10 mL de NaOH 1N. Se sometió a baño maría a 80°C x 30 minutos. Luego de este sometimiento, se neutralizó inmediatamente con 10 mL de NaOH 1N y/o adicionó 10 mL de

HCl 1N, se enfrió y enrasó a volumen con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

Para el producto terminado: Se tomó 5 mL de producto terminado y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10 mL de HCl 1N y/o 10 mL de NaOH 1N. Se sometió a baño maría a 80°C x 30 minutos. Luego de este sometimiento, se neutralizó inmediatamente con 10 mL de NaOH 1N y/o adicionó 10 mL de HCl 1N, se enfrió y enrasó a volumen con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

➤ **TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 3% (Preparación por triplicado)**

Las muestras tanto del analito excipiente y producto terminado fueron sometidas a oxidación con la adición de 10% de diluyente para disolver (principalmente al analito) y se adicionó de 20% de volumen de peróxido de hidrogeno al 3% y se llevó a baño maría a 80 °C por 30 minutos. Se procedió:

Para el excipiente: Se transfirió 5 mL de excipiente a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10 mL de peróxido de hidrogeno al 3% y se sometió a baño maría a 80°C x 30 minutos. Se Enfrió y enrasó a volumen con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

Para el analito: Se pesó 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10 mL de peróxido de hidrogeno al 3% y se sometió a baño maría a 80°C x 30 minutos. Se enfrió y enrasó a volumen con

diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

Para el producto terminado: Se tomó 5 mL de producto terminado y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 5 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos y luego se adicionó 10ml de peróxido de hidrogeno al 3% y se sometió a baño maría a 80°C x 30 minutos. Se enfrió y se enrasó a volumen con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente.

CÁLCULOS:

$$\text{Factor de Estándar} = \frac{Wst1 \times 5 \times Pst \times 361,37}{100 \times 50 \times 370,37 \times Ast1}$$

Donde:

Pst : Potencia del estándar expresada en porcentaje tal cual como levofloxacino hemihidrato.

Wst1: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

Wst2: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

100; 5; 50: Volumen de dilución del estándar.

361,37: Peso molecular de la levofloxacino base.

370,37: Peso molecular de la levofloxacino hemihidrato.

Ast1: Área promedio del pico principal del primer estándar.

Ast2: Área promedio del pico principal del segundo estándar.

Fpst : Promedio de los 2 factores de estándares de levofloxacino (1) y (2)

$$Fpst = \frac{\text{Factor estándar de levofloxacino (1)} + \text{Factor estándar de levofloxacino (2)}}{2}$$

El coeficiente de variación (CV) de los factores de los estándares no debe ser mayor de 2,0%.

$$\text{Factor de muestra (1) y (2)} = \frac{50 \times 50 \times 100}{5 \times 5 \times 500}$$

Donde:

5: Volumen de muestra tomado para la prueba.

50; 5; 50: Volumen de dilución de la muestra.

500: cantidad teórica de levofloxacino por vial (100 mL).

% Levofloxacino M1 = $F_{pst} \times F_{mta1} \times A_{mta 1}$

% Levofloxacino M2 = $F_{pst} \times F_{mta2} \times A_{mta 2}$

% Levofloxacino/100 mL = Promedio entre los resultados individuales de % M1 y % M2.

Se determinó:

- El contenido del analito en el producto terminado (levofloxacino 500 mg/100 mL) y del propio. Según la especificación: 90%-110%.
- La interferencia del excipiente; no mayor al 2%.

3.5.2 PRECISIÓN

3.5.2.1 REPETIBILIDAD: Se realizó bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo corto de tiempo. Se preparó 6 muestras individuales de concentraciones iguales según se indica en la técnica analítica (5 mL de muestra).

Preparación del Estándar (Por duplicado)

Se pesó con precisión alrededor de 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato. Se transfirió a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de diluyente; sonicar durante 10 minutos, enrasar con diluyente y homogenizar. Transferir 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, homogenizar y filtró.

Llegándose a una concentración teórica final: 0,050 mg/ml.

Preparación de la muestra (Preparar 6 muestras)

Se tomó una cantidad de muestra equivalente a 26,5 mg de levofloxacino

(5 mL), se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente. Concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

CÁLCULOS:

$$\text{Factor de Estándar} = \frac{Wst1 \times 5 \times Pst \times 361,37}{100 \times 50 \times 370,37 \times Ast1}$$

Donde:

Pst: Potencia del estándar expresada en porcentaje tal cual como levofloxacino hemihidrato.

Wst1: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

Wst2: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

100; 5; 50: Volumen de dilución del estándar.

361,37: Peso molecular de la levofloxacino base.

370,37: Peso molecular de la levofloxacino hemihidrato.

Ast1: Área promedio del pico principal del primer estándar.

Ast2: Área promedio del pico principal del segundo estándar.

Fpst : Promedio de los 2 factores de estándares de levofloxacino (1) y (2)

$$Fpst = \frac{\text{Factor estándar de levofloxacino (1)} + \text{Factor estándar de levofloxacino (2)}}{2}$$

El coeficiente de variación (CV) de los factores de los estándares no debe ser mayor de 2,0%.

$$\text{Factor de Muestra (1) y (2)} = \frac{50 \times 50 \times 100}{5 \times 5 \times 500}$$

Donde:

5: Volumen de muestra tomado para la prueba.

50; 5; 50: Volumen de dilución de la muestra.

500: cantidad teórica de levofloxacino por vial (100 mL).

% Levofloxacino M1 = $F_{pst} \times F_{mta1} \times A_{mta 1}$

% Levofloxacino M2 = $F_{pst} \times F_{mta2} \times A_{mta 2}$

% Levofloxacino/100 mL = Promedio entre los resultados individuales de % M1 y % M2.

Se determinó:

- El contenido del analito en el producto terminado (Levofloxacino 500 mg/100 mL). Según la especificación: 90%-110%.
- Coeficiente de variación de repetibilidad: Menor de 1,5%.

3.5.2.2 PRECISIÓN INTERMEDIA: Para el estudio de la precisión intermedia los cambios de condiciones fueron:

- En tiempos diferentes (Al menos en 2 días diferente al ensayo de repetibilidad).
- Diferente analista (Miguel Valdivia y Maritza Mendoza en el Laboratorio Corporación Infarmasa).
- Diferente equipo (Agilent-1200 DAD-3).

Preparación del Estándar

Se pesó con precisión alrededor de 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato. Se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, homogenizó y filtró.

Llegándose a una concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

Preparación de la muestra (Preparar 6 muestras)

Se tomó una cantidad de muestra equivalente a 26.5 mg de levofloxacino

(5,0 mL), se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomó 5 mL de la última dilución y se llevó a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente. Llegándose a una concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

$$\text{Factor de Estándar} = \frac{Wst1 \times 5 \times Pst \times 361,37}{100 \times 50 \times 370,37 \times Ast1}$$

Donde:

Pst: Potencia del estándar expresada en porcentaje tal cual como levofloxacino hemihidrato.

Wst1: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

Wst2: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

100; 5; 50: Volumen de dilución del estándar.

361,37: Peso molecular de la levofloxacino base.

370,37: Peso molecular de la levofloxacino hemihidrato.

Ast1: Área promedio del pico principal del primer estándar.

Ast2: Área promedio del pico principal del segundo estándar.

Fpst : Promedio de los 2 factores de estándares de levofloxacino (1) y (2)

$$Fpst = \frac{\text{Factor estándar de levofloxacino (1)} + \text{Factor estándar de levofloxacino (2)}}{2}$$

El coeficiente de variación (CV) de los factores de los estándares no debe ser mayor de 2,0%.

$$\text{Factor de Muestra (1) y (2)} = \frac{50 \times 50 \times 100}{5 \times 5 \times 500}$$

Donde:

5: Volumen de muestra tomado para la prueba.

50; 5; 50: Volumen de dilución de la muestra.

500: cantidad teórica de levofloxacino por vial (100 mL).

% Levofloxacino M1 = $F_{pst} \times F_{mta1} \times A_{mta1}$

% Levofloxacino M2 = $F_{pst} \times F_{mta2} \times A_{mta2}$

% Levofloxacino/100 mL = Promedio entre los resultados individuales de % M1 y % M2.

Se determinó:

- El contenido del analito en el producto terminado (Levofloxacino 500 mg/100 mL). Según la especificación: 90%-110%.
- Coeficiente de variación: Menor de 2%.

3.5.3 EXACTITUD

Para la evaluación de este parámetro se empleó el excipiente que consistió en adicionar una cantidad de analito sobre el excipiente equivalente al volumen de la muestra en este caso 5 mL. La adición de los analitos se realizó a tres niveles de concentración los cuales fueron: 80%, 100% y 120%, y tres determinaciones repetidas de cada concentración.

Preparación del Estándar (Por triplicado)

Se pesó con precisión alrededor de 53,0 mg de levofloxacino hemihidrato. Se transfirió a una fiola de 100 mL, se añadió 60 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró. Llegándose a una concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

Preparación de la muestra (Por triplicado)

- El 80% corresponde a una concentración teórica 0,040 mg/mL levofloxacino base, se preparó 21,2 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se

enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

- El 100% corresponde a una concentración teórica 0,050 mg/mL levofloxacino base, se preparó 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

- El 120% corresponde a una concentración teórica 0,060 mg/ mL levofloxacino base, se preparó 31,8 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

Se determinó:

- Porcentaje de recuperación para cada concentración (98%-102%).
- Porcentaje de recuperación global (98%-102%).
- Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación (<5%).
- Los 2 Test estadísticos.

CÁLCULOS:

$$\text{Factor de Estándar} = \frac{Wst1 \times 5 \times Pst \times 361,37}{100 \times 50 \times 370,37 \times Ast1}$$

Donde:

Pst: Potencia del estándar expresada en porcentaje tal cual como levofloxacino hemihidrato.

Wst1: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

Wst2: Peso del estándar de levofloxacino hemihidrato en mg.

100; 5; 50: Volumen de dilución del estándar.

361,37: Peso molecular de la levofloxacino base.

370,37: Peso molecular de la levofloxacino hemihidrato.

Ast1: Área promedio del pico principal del primer estándar.

Ast2: Área promedio del pico principal del segundo estándar.

Fpst: Promedio de los 2 factores de estándares de levofloxacino (1) y (2)

$$Fpst = \frac{\text{Factor estándar de levofloxacino (1)} + \text{Factor estándar de levofloxacino (2)}}{2}$$

El coeficiente de variación (CV) de los factores de los estándares no debe ser mayor de 2,0%.

$$\text{Factor de Muestra (1) y (2)} = \frac{50 \times 50 \times 100}{5 \times 5 \times 500}$$

Donde:

5: Volumen de muestra tornado para la prueba.

50; 5; 50: Volumen de dilución de la muestra.

500: cantidad teórica de levofloxacino por vial (100 mL).

% Levofloxacino M1 = Fpst x Fmta1 x A mta 1

% Levofloxacino M2 = Fpst x Fmta2 x A mta 2

% Levofloxacino/100 mL = Promedio entre los resultados individuales de % M1 y % M2.

Con estos datos se determina: el porcentaje de recuperación: 98,0% - 102,0%.

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

1.- según el test student:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100-R|}{CV} \times \sqrt{n}$$

2.- prueba de Cochran Homogeneidad de varianza

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2 \text{máxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

3.5.4 LINEALIDAD

3.5.4.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se efectuó el análisis empleando estándares de referencia en las concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. Se preparó las muestras por triplicado así como también, se realizó inyecciones por triplicado por cada preparación del estándar según método analítico.

De acuerdo a como se indicó en la siguiente especificación a diferentes concentraciones de levofloxacino hemihidrato para su determinación de la linealidad del sistema.

- Para 50% corresponde a una concentración 0,025 mg/mL levofloxacino base, se preparó 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 100 mL, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.
- Para 75% corresponde a una concentración 0,0375 mg/mL levofloxacino base, se preparó 39,75 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 100 mL, se enrasó con diluyente y se homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

- Para 100% corresponde a una concentración 0,050 mg/mL levofloxacino base, se preparó 53,0 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 100 mL, se enrasó con diluyente y se homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.
- Para 125% corresponde a una concentración 0,0625 mg/mL levofloxacino base, se preparó 66,25 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 100 mL, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.
- Para 150% corresponde a una concentración 0.075 mg/mL levofloxacino base, se preparó 79,5 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 100 mL, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasar con diluyente, se homogenizó y filtró.

Con los datos se ploteó una curva de calibración relacionando concentraciones versus áreas. Se preparó la ecuación de la recta.

3.5.4.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se trabajó a diferentes concentraciones de levofloxacino hemihidrato para determinar la linealidad del método. Se realizó con la adición del analito al excipiente.

- Al 80% corresponde a una concentración teórica 0,040 mg/mL levofloxacino base; se preparó 21,2 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

➤ Al 100 % corresponde a una concentración teórica 0,050 mg/mL levofloxacino base, se preparó 26,5 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

➤ Al 120 % corresponde a una concentración teórica 0,060 mg/mL levofloxacino base preparó 31,8 mg de levofloxacino hemihidrato en una fiola de 50 mL más 5 mL de excipiente, se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se tomo 5 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, se homogenizó y filtró.

Las muestras se analizaron de acuerdo al método, por triplicado y también se realizó inyecciones por triplicado por cada preparación del estándar.

Con los datos se ploteo una curva de calibración relacionando concentraciones versus áreas. Se preparó la ecuación de la recta.

Ecuación de la línea recta:

$$y = bx + a$$

$$b = \frac{\sum (xi-x) (yi-y)}{\sum (xi-x)}$$

La pendiente (b) relacionada con la sensibilidad, diferente de cero.

Intercepto (a) relacionada con el error sistemático debe pasar por el origen.

Coefficiente de correlación (r): Es el grado de linealidad donde $r > 0.999$

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

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Prueba estadística:

$$t = \frac{|r| \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Test de linealidad

- Prueba de linealidad: Es la significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente (b). El intervalo no debe incluir a cero.

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Límites de confianza:

$$b \pm t * S_b$$

- Prueba de proporcionalidad (Intercepto): Para evaluar si la recta pasa por el origen si es significativamente diferente de cero. El intervalo debe incluir a cero.

$$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Límites de confianza:

$$a \pm t * S_a$$

3.5.5 ROBUSTÉZ

Para el estudio de la Robustez los cambios de condiciones fueron:

- 1.- Variación de temperatura en la columna (de 40 °C a 30 °C).
- 2.- Variación del tipo de columna de Zorbax 18 x 150 mm a RP-18 125 mm Merck.

3.- Análisis en tiempos diferentes (2 ° día de preparado las muestras y estándar).

4.- Variación del volumen de inyección de 5 uL a 2 uL.

5.- Variación de flujo de 1,0 mL/min a 0,7 mL/min.

6.- Variación de proporción en la composición de la fase móvil: El diluyente cambió de HCl 0,05N por HCl 0,1N. La proporción que se usó de fase móvil fue de 358 mL lauril sulfato de sodio al 0,24%: 480 mL de acetonitrilo: 12 mL de ácido acético glacial.

Preparación del Estándar

Se pesó con precisión alrededor de 26,5 mg de levofloxacin hemihidrato. Se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió 30 mL de diluyente; se sonicó durante 10 minutos, se enrasó con diluyente y homogenizó. Se transfirió 5,0 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, se enrasó con diluyente, homogenizó y filtró.

Llegándose a una concentración teórica final: 0,050 mg/mL.

Preparación de la muestra

Se trabajó con las mismas muestras del estudio de repetibilidad. Se trabajó por duplicado. Se trabajó con estándar y muestra según técnica analítica.

CÁLCULOS:

$$\text{Factor de Estándar} = \frac{Wst1 \times 5 \times Pst \times 361,37}{100 \times 50 \times 370,37 \times Ast1}$$

Donde:

Pst: Potencia del estándar expresada en porcentaje tal cual como levofloxacin hemihidrato.

Wst1: Peso del estándar de levofloxacin hemihidrato en mg.

Wst2: Peso del estándar de levofloxacin hemihidrato en mg.

100; 5; 50: Volumen de dilución del estándar.

361,37: Peso molecular de la levofloxacin base.

370,37: Peso molecular de la levofloxacin lehidrato.

Ast1: Área promedio del pico principal del primer estándar.

Ast2: Área promedio del pico principal del segundo estándar.

Fpst : Promedio de los 2 factores de estándares de levofloxacin (1) y (2)

$$Fpst = \frac{\text{Factor estándar de levofloxacin (1)} + \text{Factor estándar de levofloxacin (2)}}{2}$$

El coeficiente de variación (CV) de los factores de los estándares no debe ser mayor de 2,0%.

$$\text{Factor de Muestra (1) y (2)} = \frac{50 \times 50 \times 100}{5 \times 5 \times 500}$$

Donde:

5: Volumen de muestra tomado para la prueba.

50; 5; 50: Volumen de dilución de la muestra.

500: cantidad teórica de Levofloxacin por vial (100 mL).

% Levofloxacin M1 = Fpst x Fmta1 x A mta 1

% Levofloxacin M2 = Fpst x Fmta2 x A mta 2

% Levofloxacin/100 mL = Promedio entre los resultados individuales de % M1 y % M2.

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Se determinó:

- Con estos datos la valoración del analito en el producto terminado (Levofloxacin 500 mg/100 mL). Según la especificación: 90%-110%.
- Coeficiente de variación del método: menor a 2%.

- Coeficiente de variación entre el resultado del estudio de robustez y el resultado del estudio de repetibilidad : menor a 2%.

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron introducidos en un ordenador excel y se calcularon los promedios, desviación estándar, coeficiente de variación, regresión lineal y el intervalo de confianza y se realizó la interpretación estadística mediante la prueba t Student, test de Cochran, para comparar se realizó el análisis de varianza con un 95% de confianza; para hallar el grado de eficiencia significativa.

IV. RESULTADOS

TABLA N° 4: INTERFERENCIA DEL ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD A TRAVEZ DE LA DEGRADACIÓN FORZADA DEL EXCIPIENTE DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA – 2011.

EXCIPIENTE	MUESTRA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS	% LEVOFLOXACINO
SIN DEGRADACION	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%
SOMETIDO A HIDRÓLISIS ÁCIDA	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%
SOMETIDO A HIDRÓLISIS BÁSICA	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%
SOMETIDO A OXIDACIÓN	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%
SOMETIDO A CALOR 80°C	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%
SOMETIDO A LUZ ARTIFICIAL	M1	NO MAYOR DE 2,0 %	No se observa interferencia	0%
	M2		No se observa interferencia	0%
	M3		No se observa interferencia	0%

TABLA Nº 5: ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DE LEVOFLOXACINO 500 mg/100 mL INYECTABLE SOMETIDO A UNA DEGRADACIÓN FORZADA. LIMA–2011.

ANALITO DE LEVOFLOXACINO HEMIHDRATO	Cantidad Agregados (mg)	% Muestra Levofloxacino
SOMETIDO A HIDRÓLISIS ÁCIDA	26.55	97.63
SOMETIDO A HIDRÓLISIS BÁSICA	26.65	97.32
HIDRÓLISIS CON PEROXIDO DE HIDROGENO	26.63	95.89
SOMETIDO AL CALOR (80°C)	26.63	98.07
SOMETIDO A LA LUZ ARTIFICIAL	26.60	97.45
LEVOFLOXACINO 500 mg/100 mL INYECTABLE	Cantidad Agregados (mL)	%Muestra Levofloxacino
SOMETIDO A HIDRÓLISIS ÁCIDA	5.0	108.78
SOMETIDO A HIDRÓLISIS BÁSICA	5.0	108.22
HIDRÓLISIS CON PEROXIDO DE HIDROGENO	5.0	108.80
SOMETIDO AL CALOR (80°C)	5.0	103.73
SOMETIDO A LA LUZ ARTIFICIAL	5.0	104.42

LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL inyectable (90,0% - 110,0%)

TABLA N° 6: ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE REALIZADO POR UN MISMO ANALISTA. LIMA-2011.

	ANALISTA 1 FECHA : 2011-04-03	ANALISISTA:2 FECHA : 2011-04-04
	LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL inyectable (90,0% -110,0%)	
M1	104.94	103.35
M2	105.94	103.45
M3	104.70	104.24
M4	104.78	102.97
M5	104.75	104.14
M6	104.08	104.85
PROMEDIO (%)	104.87	103.83
DS(%)	0.60	0.70
CV < 1.5%	0.57	0.67
RESULTADO	CUMPLE	CUMPLE

TABLA N° 7: ANÁLISIS DE PRECISIÒN INTERMEDIA DE LEVOFLOXACINO 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA-2011.

	ANALISTA 1 FECHA : 2011-04-03	ANALISISTA:2 FECHA: 2011-04-04
	LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL inyectable (90,0%-110,0%)	
PROMEDIO (%) INDIVIDUAL	104.87	103.83
PROMEDIO (%) GLOBAL	104.35	
CV < 2,0%	0.70	
RESULTADO	CUMPLE	

F exp < F tabla por tanto: cumple

TABLA N° 8: ANÁLISIS DE EXACTITUD DEL MÉTODO DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE A DIFERENTES CONCENTRACIONES. LIMA – 2011.

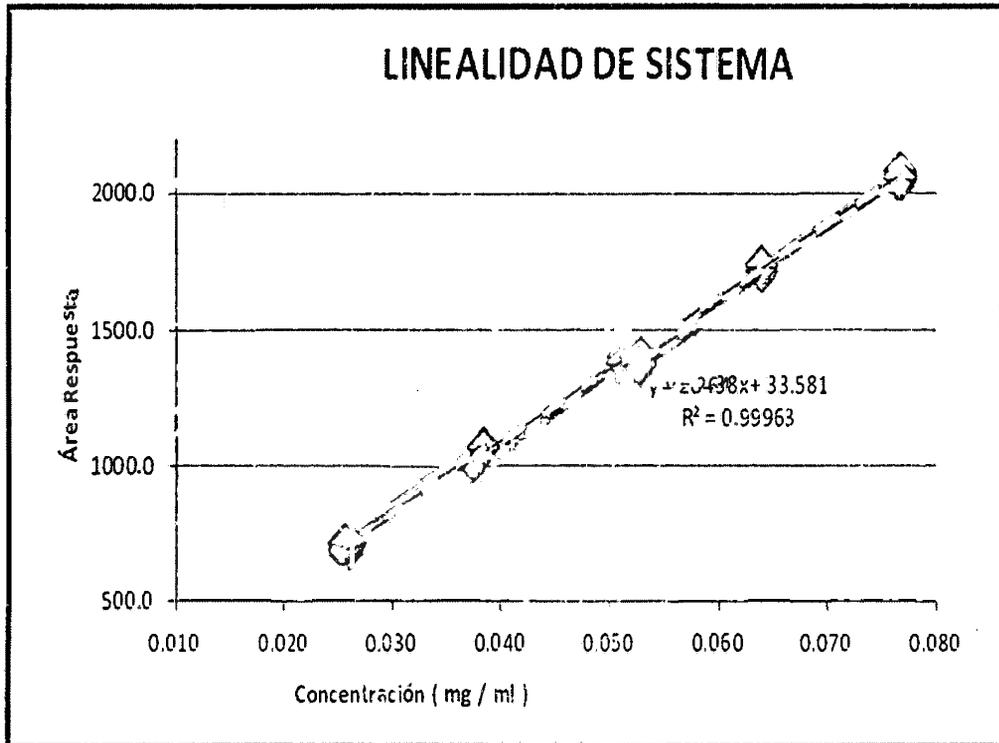
	80%	100%	120%
%PROMEDIO INDIVIDUAL	99.74	100.07	99.25
% PROMEDIO GLOBAL (Porcentaje de recuperación: 98%-102.0%)	99.69		
%DS	1.11	0.13	0.20
CV <5%	1.11	0.13	0.21
CV <5% Global	0.67		
RESULTADO	CUMPLE		

T exp < T tabla: cumple

G exp < G tabla: no cumple

TABLAN° 9: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA-2011.

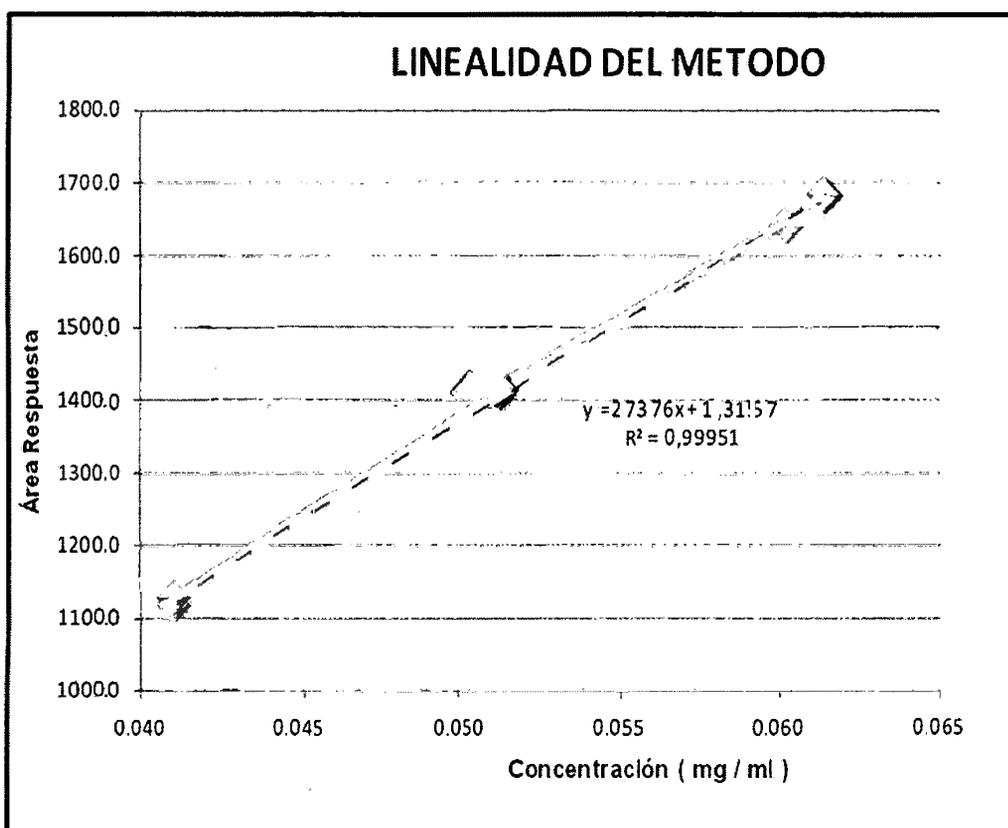
PRUEBA ESTADÍSTICA	CONDICION ESTADISTICA	RESULTADO	CONCLUSION
Test estadístico (b) Para la pendiente de la recta	$t_{exp} > t_{tabla}$	138.293 > 2.145	Cumple
Test estadístico (a) Para el intercepto de la recta	$t_{exp} < t_{tabla}$	0.886 < 2.145	Cumple
Coficiente de correlación	$r > 0,999$	$r = 0.99963$	Cumple
Cofiente de variación(cv)	$CV < 5\%$	% CV=1.662	Cumple



GRÁFICA N° 1: RECTA DE REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE 0.025 mg/mL HASTA 0.075 mg/mL DEL ESTANDAR DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA- 2011.

TABLAN° 10: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD DEL MÉTODO DE LEVOFLOXACINO 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA - 2011.

PRUEBA ESTADISTICA	CONDICION ESTADISTICA	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Test estadístico (b) Para la pendiente de la recta	$t_{exp} > t_{tabla}$	$90.120 > 2.306$	Cumple
Test estadístico (a) Para el intercepto de la recta	$t_{exp} < t_{tabla}$	$0.028 < 2.306$	Cumple
Coefficiente de correlación	$r > 0,999$	$r = 0.99951$	Cumple
Coefficiente de variación (cv)	$CV < 5\%$	$\% CV = 0.55$	Cumple



GRÁFICA Nº 2: RECTA DE REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE 0.04 mg/mL HASTA 0.06 mg/mL DEL ESTANDAR DE LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL INYECTABLE PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO. LIMA - 2011.

TABLA N° 11: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE ROBUSTEZ DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEVOFLOXACINO 500 mg/100 mL INYECTABLE. LIMA-2011.

LEVOFLOXACINO			
FACTOR EVALUADO	RESULTADO (%)	%CV DEL METODO	%CV ENTRE ESTUDIO
Análisis a tiempo cero (estudio de repetibilidad)	104.87	0.35	-----
Cambio de T° en la columna (Horno) de 40 °Ca 30 °C.	105.1	0.49	0.15
Cambio de columna de 15.0 cm x 4.6 mm (Zorbax) a una columna cartucho Merck de 125 mm x 4 mm	105.87	0.62	0.67
Análisis después de tres días de preparado la muestra (medio ambiente).	105.36	0.64	0.33
Cambio del volumen de inyección de 5ul a 2ul	105.14	0.61	0.18
Cambio de flujo en el método de 1ml/min a 0.7ml/min	105.05	0.52	0.12
Modificación de proporción de mezcla de la fase móvil (lauril sulfato de sodio/ acetonitrilo/acido acético glacial 358:480:12)	103.78	0.11	0.74

Si CV< 2.0%: CUMPLE

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de levofloxacin 500 mg/ 100 ml bajo la forma farmacéutica de infusión, la cual no figura en ninguna farmacopea oficial; como se sabe éste producto farmacéutico solo es selectivo y específico para ser cuantificado por método de HPLC ya que no puede ser cuantificado por métodos espectrofotométricos y volumétricos por otro lado este tipo de método presenta mayores ventajas debido a su rapidez de análisis, aceptabilidad, exactitud, fiabilidad y de alta eficacia.

Se evaluó todos los parámetros tales como: especificidad, precisión, exactitud, linealidad y robustez del método requeridas por la normas oficiales. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de especificación.

Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación del método desarrollado.

Así como señala la AEFI (2001), el método debe medir de forma inequívoca, exacta y específica al analito de interés, sin interferencia de excipientes, impurezas, productos de degradación, u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra. En la tabla N° 4, da conocer el porcentaje de

interferencia; medido por la adición del excipiente, que se sometió a una degradación forzada. La AEFI (2001), indica que la lectura del excipiente debe tener una interferencia no mayor al 2.0%. De acuerdo a lo descrito el análisis del excipiente demuestra que no interfiere con el pico del analito, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación en el levofloxacino, así como se demuestra en la tabla N° 5, al realizar el análisis del analito sometido a estrés para que generen los compuestos potencialmente interferentes y así también se realizó para las muestras, sometido al estrés para que se degrade. Por lo tanto, mediante el estudio de la selectividad o especificidad, se demostró que la señal medida con el método analítico procede únicamente de los analitos en estudio, sin interferencias del excipiente, productos de degradación e impurezas; según USP 32 (2009), manifiesta que la selectividad o especificidad es una condición esencial para conseguir una adecuada capacidad para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito para su cuantificación.

En la tabla N° 6, se muestra los resultados en porcentaje de analito hallado en el análisis de contenido de las muestras realizado por un mismo analista para evaluar la repetibilidad dando como resultado de coeficiente de variación 0.57% para el primer analista y siendo para el segundo analista con un coeficiente de variación 0.67%, donde indica que la repetibilidad de las inyecciones deben tener una coeficiente de variación <1.5%, referente a las áreas y tiempo de retención tal como fueron propuesto por Castro, 1999 y Lau, 2004. En la tabla N° 7 se observa que los parámetros señalados para la precisión intermedia se encuentran dentro del criterio de aceptación como también el resultado de cuantificación del analito, efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes; como por ejemplo: diferente analista,

diferentes instrumentos y diferentes días para el estudio de la precisión del método. Siendo 104,35% el porcentaje del promedio global para la cuantificación del analito. Cumpliendo así con los criterios de aceptación que señala AEFI (2001), realizado por otro analista en donde indica que la precisión intermedia de las inyecciones deben tener un coeficiente de variación $< 2\%$ referente a las áreas y tiempo de retención. Por lo tanto, el método es preciso, porque obtiene resultados repetitivos y además reproducibles. Para el estudio de la precisión intermedia se evaluaron los efectos causados al variar una serie de factores.

Factores típicos que se estudiaron fueron el día y los analistas. Obteniéndose los siguiente, un resultado de $CV = 0.70\%$, en la tabla N° 7, valor que se encuentra dentro de los límites especificados que suele ser $CV < 2\%$, además se comprobó que no existen diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los resultados obtenidos para ambos analistas y cumple el test Fischer donde $F_{exp} < F_{tabla}$ siendo $F_{tabla} = 5.050$; $F_{exp} = 0.748$, por lo que cumple el parámetro en donde se concluye que no hay diferencia significativa en las varianzas entre analistas donde se observa en el anexo N°5. Con esto se comprobó el estudio de precisión del método, el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas en la técnica analítica variabilidad o el más o menos del método en este caso la repetibilidad, lo cual se efectuó, aplicada por (Aguilar, 1992)/(Castro y col, 2003).

Según Aguilar (2002), explica respecto al parámetro de precisión, cuyo objetivo principal es dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio cuando se hace análisis repetidos en una muestra homogénea. Obteniéndose los siguientes resultados en la tabla N°7.

De este modo, podemos constatar que el método fue repetible y reproducible, es decir, fue suficientemente preciso, por lo que no repercutieron apreciablemente los errores aleatorios en la determinación.

Según la ICH (1996) y Salazar (1999) explican que la variabilidad del método puede deberse a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados como al analista, el equipo instrumental, los reactivos, el tiempo, etc., es por ello la importancia de la presente investigación.

Según Aguilar (2002), la exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito. La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de la preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. En la tabla N° 8, se expresa el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones donde el resultado que se obtuvo fue satisfactoriamente con un porcentaje de recuperación global = 99.69% para la muestra de levofloxacin, en donde se encuentra dentro de la dicha especificación ya que para este parámetro se estableció un límite aceptación entre 98% - 102%, también así lo determina Castro (1999) y Lau (2004). Que la exactitud del método mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero, asimismo, otro dato a considerar es el coeficiente de variación del porcentaje de recuperación total donde $CV_{global} = 0.67\%$ el cual está dentro de las especificaciones ($CV < 5\%$); también se determina la prueba estadística como demuestra el anexo N°7 en el test de Student cuyos resultados fueron $t_{exp} = 1.398$, siendo el $t_{tabla} = 2.306$ donde está indicado en el anexo N°7. Al ser $t_{exp} < t_{tabla}$ expresa que no existe diferencia significativa entre el promedio de la recuperación y el 100%,

confirmándose que el método es exacto, así como señala Calpena (2001), por lo que la exactitud es correcta según sus respectivas especificaciones. Este resultado conduce a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos, por lo que éste puede considerarse exacto, tal como especifica Castro (1999). En el anexo N°7 se encuentra la interpretación estadística de la exactitud donde se calculó el test de Cochran que es el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor $G_{exp} = 0.955$, siendo el $G_{tabla} (P=0.05, n=3, K=3) = 0.8709$, Donde k = número de grupos y n = número de determinaciones por grupo. Al ser $G_{exp} > G_{tabla}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes. Es decir el factor concentración influye en la variabilidad de los resultados tal como especifica Castro (1999).

Según Aguilar (2002), explica que la linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados registrados en la gráfica N°1 y gráfica N° 2, se obtuvo recta de regresión lineal y la ecuación de la recta de regresión lineal (área vs concentración) donde se expresó para el levofloxacinó la ecuación:

$Y = 26438X + 33.58$ ecuación de la recta para linealidad de sistema

$Y = 27376X + 1.315$ ecuación de la recta para linealidad del método

Según la tabla N° 9 y la tabla N° 10 el coeficiente de correlación lineal (r) fue de: $r = 0.99963$ para la linealidad del sistema y un $r = 0.9951$ para la linealidad del método respectivamente. Según la AEFI (2001), señala que el coeficiente de correlación debe ser $r > 0.999$ de modo que supone una

correlación positiva con una confianza de 99.5 % por lo cual podemos decir que datos obtenidos cumplen con la especificación señalada.

Según Castro (1999), primero se determina la linealidad del sistema en el cual solo se trabaja con estándares, por lo tanto, lo único que esta variando, es el sistema (HPLC: bomba, el detector, etc) y la linealidad del método el cual se trabaja con estándares y con la matriz del producto y se determina como influye la matriz en el proceso de extracción de la muestra donde en la gráfica N°1 y N°2 queda demostrado que cumple con las especificaciones para la linealidad del sistema y linealidad del método tal como indica AEFI (2001). En la tabla N° 9 y la tabla N° 10 se expresa los valores del test de linealidad se determinó el coeficiente de variación donde el CV es de 1.662 % para la linealidad del sistema y para la linealidad del método fue de CV de 0.55%, demostrando así que son semejantes entre sí para cada analito. La AEFI (2001), señala que el coeficiente de variación de los factores de respuesta debe ser $< 5.0\%$ lo cual indica que en una calibración lineal de los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente, cuando el coeficiente de la variación es superior al 5.0% indica falta de linealidad. Tal como indica por Castro (1999).

La AEFI (2001), señala que la pendiente debe ser significativamente y estadísticamente distinta a cero para un grado de significación $\alpha=0.05$ siendo el $t_{exp} > t_{tabla}$ lo cual indica una regresión lineal y que la recta no es paralela a la abscisa, así mismo los intervalos de confianza no deben incluir al cero. Por ello en los resultados de la tabla N° 9 para la prueba de la linealidad, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, $t_{exp} = 138.293$, siendo un el $t_{tabla} = 2.145$ (valor de t_{tabla} para n-1 grados de libertad en este caso $15-1 = 14$ y una probabilidad de 0.05), por lo que existe evidencia en los datos para rechazar

la H_0 y en donde es posible afirmar, con un 95% de confianza que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero, para la linealidad del sistema. Así mismo se determinó el intervalo de confianza, el cual se demuestra en el anexo N° 10, siendo para el levofloxacin de (26028.026 \pm 26848.079), donde se también se concluye que el intervalo no incluye el cero donde se observa en el anexo N° 10. En la tabla N° 9 se encuentra el dato de la prueba de proporcionalidad donde $t_{exp} < t_{tabla}$ siendo $t_{exp} = 0,886$ y el $t_{tabla} = 2,145$ (valor de t_{tabla} para $n-1$ grados de libertad en este caso $15-1 = 14$ y una probabilidad de 0.05) por lo que se concluye que el intercepto es semejante a Cero, con un 95% de confianza, es decir la recta pasa por el origen de las coordenadas tal como indica Castro (1999). Así mismo se determinó el intervalo de confianza donde (-47.719) \pm 114.881), por tanto se concluye que el intervalo si incluye el cero, el método no presenta sesgo es decir cumple con la condición de proporcionalidad, se observa en el anexo N°10, también así lo determina Castro (1999) y Lau (2004).

Los resultados de la tabla N° 10 para la prueba de la linealidad se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, $t_{exp} = 90.120$, siendo el $t_{tabla} = 2.306$ (valor de t_{tabla} para $n-1$ grados de libertad en este caso $9-1 = 8$ y una probabilidad de 0.05) y al ser $t_{exp} > t_{tabla}$ este valor tan alto indica que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, para la linealidad del método siendo tal como indica Castro (1999) y Lau (2004) porque si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión lineal, y aplicando el test "t" student que se encuentra en la tabla N° 10 donde se obtiene la prueba de proporcionalidad, se obtuvo un t_{exp} de 0,028 para la linealidad del método y siendo menor frente al t_{tabla} que es 2.306 (valor de t_{tabla} para $n-1$ grados de libertad en este

caso $9-1 = 8$ y una probabilidad de 0.05), ($t_{exp} < t_{tabla}$) donde los cálculos se observa en el anexo N°12, por lo que podemos decir que el intercepto es semejante a cero es decir la recta pasa por el origen de las coordenadas tal como indica Castro (1999) y Lau (2004).

Por ello en la gráfica N° 1 y gráfica N° 2, observa una gráfica de regresión lineal (concentración vs área) que evidencia de que la linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal, tal como especifica Aguilar (1992).

En la tabla N° 11, se da conocer los resultados de los criterios de aceptación de robustez del método, dando como resultado el coeficiente de variación del método menor a 1.5%, el cual cumplen para cada factor evaluado y también el coeficiente de variación entre el resultado del estudio de robustez y el resultado de estudio de repetibilidad es < al 2% , el cual sí cumplen para cada factor evaluado, en la cual en este estudio del método se evaluó los factores que pueden afectar al método analítico, dándonos resultados obtenidos a condiciones normales ,y entre condiciones modificados(diferente flujo, diferente temperatura, cambio de columna, cambio de volumen de inyección, cambio de flujo, modificación de proporción de mezcla de la fase móvil donde especifica AEFI (2001).

Según Castro (1999), la robustez del método es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo rutinario

Por lo que queda demostrado la aplicabilidad del método analítico desarrollado para levofloxacino de 500mg/100ml inyectable para infusión.

V. CONCLUSIONES

- 1.-El método analítico por HPLC para la cuantificación de contenido de levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable para infusión; cumple con las especificaciones establecidas por la que queda validada.
- 2.- La especificidad del método analítico de levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable para infusión es exacta (106.79%) y específica al analito de interés sin interferencia (0%) con el excipiente ni con los productos de degradación.
- 3- El método es preciso, porque se obtuvo resultados repetitivos (desviación estándar relativa de 0.67%) y además reproducibles (desviación estándar relativa de 0.70%).
- 4.-El método es exacto debido a que no hay diferencia significativa entre la recuperación media (99,69%) y el 100%.
- 5.- El método es lineal en el intervalo de las concentraciones del analito en muestra de levofloxacino de 500 mg/100 mL inyectable, en el rango determinado de 50% hasta 150% para el sistema ($r = 0.99963$); y el método que es de 80% hasta 120% ($r = 0.99951$).
- 6.- El método analítico empleado determina la robustez a los factores evaluados con una CV < 2% (0.74%).Queda demostrado la aplicabilidad y la adaptabilidad del método analítico demostrado para levofloxacino de 500 mg/100 mL inyectable en el Perú.

VII. RECOMENDACIONES

1. La validación del presente método analítico sólo es aplicable a levofloxacin 500 mg/100 mL para la forma farmacéutica de inyectable para infusión.
2. Para el desarrollo y validación es indispensable contar con un personal altamente capacitado, instrumentos muy bien calibrados, ambientes adecuados y bibliografías actuales con el fin de garantizar la fiabilidad de los resultados.
3. Realizar más trabajos de validación de métodos analíticos de las diferentes formas farmacéuticas para ofrecer medicamentos de alta calidad.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), 2001. Validación de métodos analíticos. Tomo A. Barcelona España.
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), 2001. Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de la Correcta Fabricación y Control de Calidad. Tomo B. Sección Cataluña España.
3. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), 2001. Guía de protocolos de validación de procesos no estériles, Comisión de Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad. Tomo C. Sección Centro, España.
4. Agilent Technologies, 2009. Grupo tecnológico. Lima.
5. Aguilar, G., Alcántara, A., Chárvel, A., García, J., Garzón, A. y Guerrero, M. (2002). Validación de métodos analíticos. México: C.E.S.A.
6. Balbín, D. 2008. Plan maestro de validación. Induquímica – Lima, Perú.
7. Barbara, C. y Col. 2009. Evaluación de la Pureza enantiomérica de Levofloxacin y su cuantificación en Formas Farmacéuticas por Electroforesis Capilar Zonal modificada con Sulfobutil- eter- ciclodextrina como Selector Quiral. Argentina.
8. Calpena, A., Escribano, E. y Fernández, C (2001). Validación de los métodos analíticos. España.
9. Castro, M., Gascón, S., Pujol, M; Sans, J. y Vicente, L. 1999. Validación de Métodos Analíticos. Catalana: AEFI; 48-100.
10. Chaloner y Larsson. 1998. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Paris.
11. Dalmau, R., Suñé J., Cemeli, J. 1999. Control de calidad en la industria farmacéutica: Concepto de validación. Industria Farmacéutica. España; 3ra edición.
12. DIGEMID (1999). Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos. Ministerio de Salud. Lima.

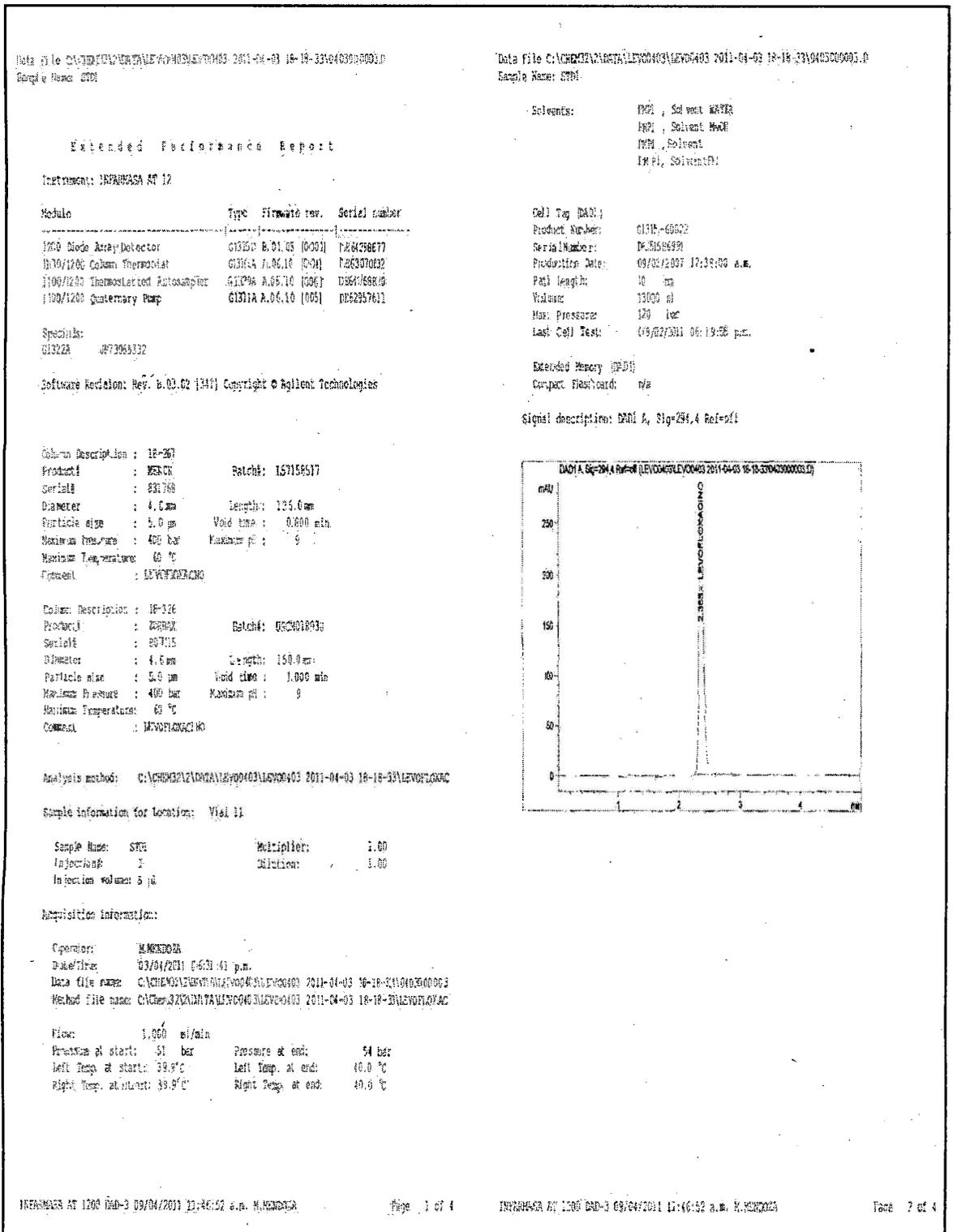
13. Enciso, R. 2009. Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflen jarabe. Tesis de la UNSCH. Lima.
14. FDA. 2002. "Current Good Manufacturing Practice" Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
15. Flores, J. 2002. Farmacología humana. 3ª edición. Editorial MASSON S.A. Barcelona, España.
16. García, E. 2001. Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona-España.
17. Kibbe, A. 2000. Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association Washington, DC Third Edition.
18. ICH, 1996. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures ICH-Q2B. Geneva
19. ISO 9001 - Norma de Calidad. (2006). Fecha de Revisión: Octubre 2007. Disponible en URL: http://www.buscarportal.com/articulos/iso_9001_gestion_calidad.html. Enero 2006.
20. Latfar International Consulting, 2009. Curso taller: validación de métodos analíticos y su procesamiento estadístico. USA.
21. Laboratorio corporación infarmasa, 2011. Listado de equipos del área de control de la calidad. Lima.
22. Lau, E. 2004. Revista "Validación de técnicas analíticas". Medifarma. 9na edición – Lima.
23. Montgomery, D. 1996. Control estadístico de la calidad. Ed. Iberoamericana S.A. México
24. Nash, P. 1979. Control de calidad, conceptos de validación, calificación y calibración de equipos. Barcelona: Romargraf. S.A.
25. Quattrochi, O. 1992. "Introducción a la HPLC" 1º Edición, Editorial Artes Graficas Farro S.A. Buenos Aires.
26. OMS (1996). Informe 23 de la Organización Mundial de la Salud, Buenas Prácticas de Manufactura vigentes, Marzo. Ginebra.
27. Palomino, E. 2008. Validación de procesos de manufactura y métodos de análisis de productos farmacéuticos. Lima, Perú.

28. Prado, M. 2008. Desarrollo y validación de la Técnica Analítica por Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de contenido de Ciprofloxacino 3mg/1ml y dexametasona 1mg/1ml, en Suspensión Oftálmica. Tesis de pregrado. UNSCH. Lima.
29. Rodríguez, R (2004). Validación de Procesos. Taller de Validación OMS. Guatemala.
30. USP 32, 2009. The United States Pharmacopeial and The Nacional Formulary.
31. Salazar, R. 1999. Introducción al estudio de la validación: concepto y generalidades. Validación Industrial. Barcelona: Romargraf. S.A.
32. The Merck Index, 1993. Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Tenth Edition. USA.
33. Pak. J. Pharm. Sci., 2007, Vol. 20(2). Disponible en URL: <http://www.pharmainfo.net/drug-development-articles/optimization-levofloxacin-analysis-rp-hplc-using-multivariate-calibration->
34. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. Disponible en URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708509003537>

IX. ANEXOS

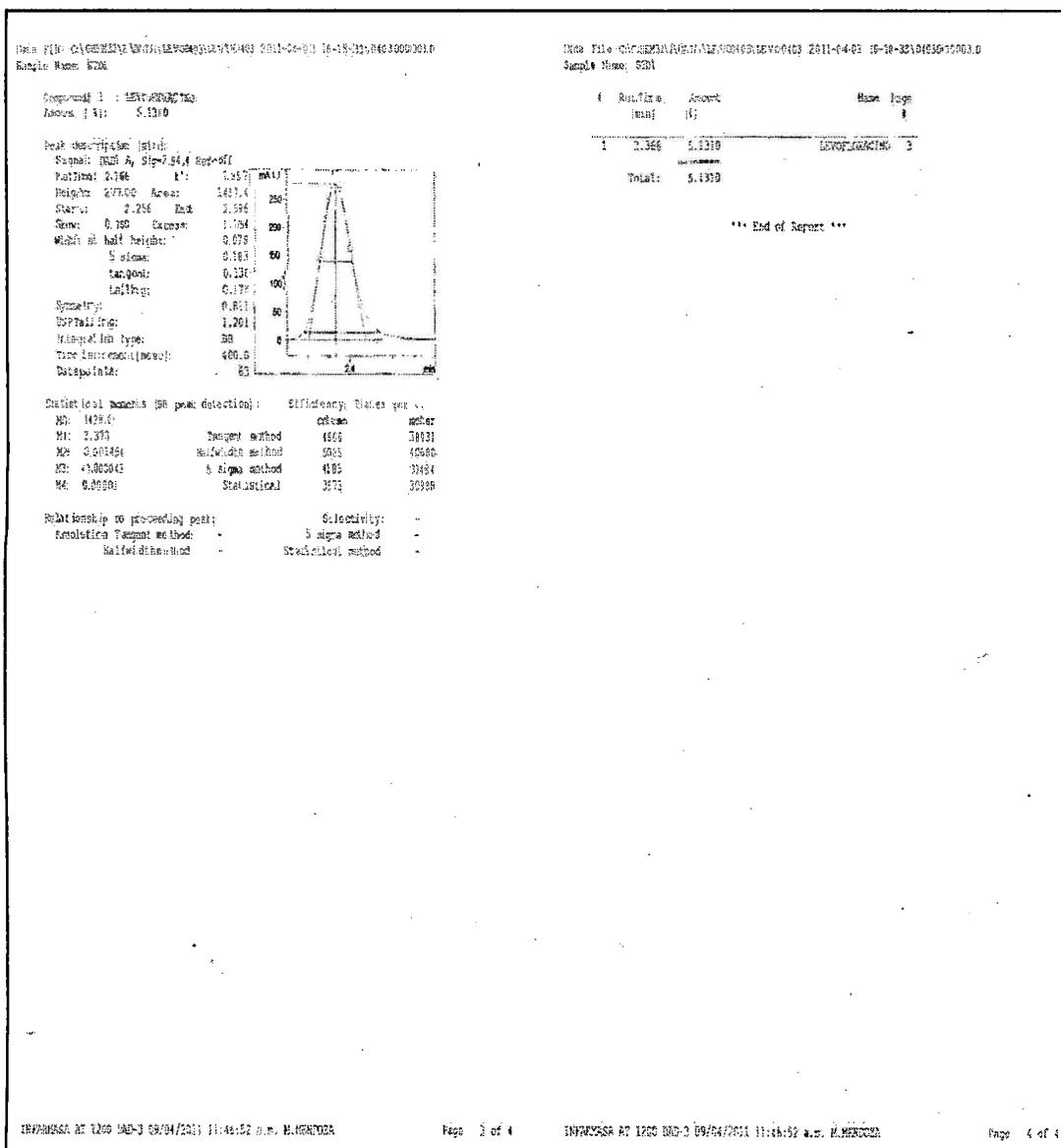
ANEXO N° 1

FIGURA N°3: Cromatograma de levofloxacino a condiciones normales.
Corporación Infarmasa - 2011.



ANEXO N° 2

FIGURA N°4: Cromatograma de la aptitud del sistema para levofloxacinó a condiciones normales. Corporación Infarmasa - 2011.



ANEXO N° 3

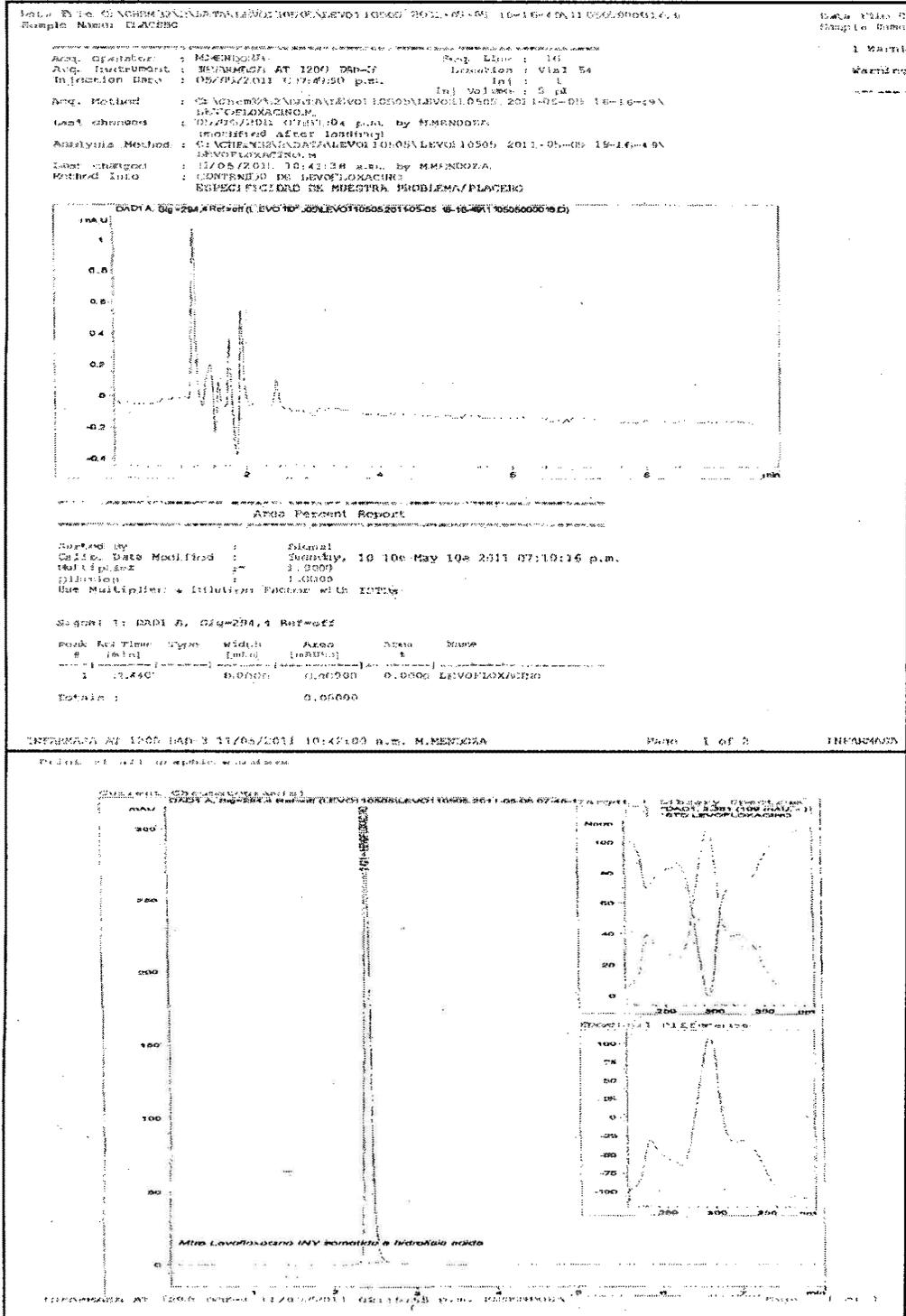
TABLA N°12: Equipos utilizados para el análisis de la validación del método analítico para levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable. Corporación Infarmasa - 2011.

Nombre	Modelo	Marca	Código	Último mantenimiento
Agitador múltiple	-----	Variomag	EC-123	2011-11
Cromatógrafo líquido HPLC	1200 DAD	Agilent	CRL-09	2012-02
Cromatógrafo líquido HPLC	1200 VW	Agilent	CRL-07	2012-02
Balanza analítica	XS105DU	Mettler Toledo	BA-24	2011-11
Columna RP-18	Cartucho	Merck	18-247	-----
Columna RP-18	Zorbax	Agilent	VAL-10	-----
Balanza Analítica	CP225P	Sartorius	BA-23	2011-11
Ultrasonido	150 D	IKA	EC-152	-----
Baño María	1136-1D	VWR	EC-118	2011-12

FUENTE: Listado de equipos del área de Control de Calidad - laboratorio Corporación Infarmasa.

ANEXO N°4

FIGURA N°5: Cromatograma de identificación, para evaluar la selectividad y especificidad para levofloxacino 500 mg/100 mL a condiciones normales que presenta un tiempo de retención de 2.366 minutos y del excipiente. Corporación Infamasa - 2011.



ANEXO N°5

TABLA N°13: Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para el levofloxacin 500 mg/100 mL. Corporación Infarmasa - 2011.

ANALISTA:1		LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL inyectable (90,0% -110,0%)	
1		104.94	
2		105.94	
3		104.70	
4		104.78	
5		104.75	
6		104.08	
PROMEDIO(%)		104.87	
DS(%)		0.60	
DRS(%)		0.57	
Limite de confianza individual (%)		103.32	106.41
Limite de confianza promedio (%)		104.23	105.50
VARIANZA :S²		0.363	
ANALISTA: 2		LEVOFLOXACINO DE 500 mg/100 mL inyectable (90,0% - 110,0%)	
1		103.35	
2		103.45	
3		104.24	
4		102.97	
5		104.14	
6		104.85	
PROMEDIO(%)		103.83	
DS(%)		0.70	
DRS(%)		0.67	
Limite de confianza individual (%)		102.04	105.62
Limite de confianza promedio (%)		103.10	104.56
VARIANZA :S²		0.485	
F tabla (UP 0.05, gi: 5)		5.050	
F exp		0.748	

Test Fisher: F exp < F table Fexp = 0.75 Ftabla = 5,05

$$F_{exp} = \frac{\text{Varianza } 1^{\text{er}} \text{ Analista}}{\text{Varianza } 2^{\text{do}} \text{ Analista}}$$

F exp < F tabla: No hay diferencia significativa en las varianzas entre analistas.

ANEXO N°6

TABLA N°14: Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones del levofloxacin. Corporación Infarmasa - 2011.

NOMBRE	mg agregados	AREAS			PROMEDIO	%C.V.	mg encontrados	% Recuperación
M1-80%	21.29	1138.37842	1138.29480	1138.54541	1138.40621	0.01121	21.04	98.81
M2-80%	21.26	1144.82544	1144.05896	1143.51184	1144.13208	0.05767	21.14	99.44
M3-80%	21.21	1158.84399	1159.84888	1157.91138	1158.86808	0.08361	21.41	100.96
M1-100%	26.53	1432.89380	1431.38232	1439.66992	1434.64868	0.30765	26.51	99.93
M2-100%	26.58	1439.36426	1443.45947	1439.83337	1440.88570	0.15555	26.63	100.17
M3-100%	26.55	1438.83472	1437.23132	1439.25867	1438.44157	0.07434	26.58	100.11
M1-120%	31.85	1711.60852	1708.38965	1706.95447	1708.98421	0.13946	31.58	99.15
M2-120%	31.15	1667.68188	1674.17444	1670.99768	1670.95133	0.19429	30.88	99.12
M3-120%	31.82	1711.81628	1716.17322	1711.66565	1713.21838	0.14943	31.66	99.49
							PROMEDIO	99.69
							%DSR	0.67

80%	100%	120%			%RECUPERACIÓN 9MUESTRAS
98.81	99.93	99.15			
99.44	100.17	99.12			
100.96	100.11	99.49			
99.74	100.07	99.25	%PROMEDIO	99.69	
1.11	0.13	0.20	%DS	0.67	
1.11	0.13	0.21	%CV	0.67	
1.2261	0.0165	0.0418	S ²		
		1.2844	ΣS ²		

ANEXO N°7

Interpretación estadística de la exactitud para levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable. Corporación Infarmasa - 2011.

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	
Test de Student	T exp < T tabla	T exp	T tabla
		1.398	2.306
		CUMPLE	
Test de Cochran	G exp < G tabla	G exp	G tabla
		0.955	0.8709
		NO CUMPLE	

TEST DE STUDENT

T experimental	T tabla (n-1)	Conclusión
1.388	2.306	Cumple

CONCLUSIÓN: Estadísticamente NO existe diferencia significativa entre promedio de la recuperación y el 100%.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|D - R|}{CV} * \sqrt{n}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - 99,69|}{0,67} * \sqrt{9} = 1,388$$

$$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$$

TEST DE COCHRAN

G experimental	G tabla	Conclusión
0.955	0.8709	FALSO

CONCLUSIÓN: El factor de concentración influye en la variabilidad de los resultados

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máxima}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

$$G_{\text{exp}} = \frac{1,2261}{1,2844} = 0,955$$

ANEXO N°8

TABLA N°15: Linealidad de sistema, concentración versus área de los estándares del levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable. Corporación Infarmasa - 2011.

STANDARES	X mg/ml	Y Area	desvest (Y)	f.rpta (f)	X*Y	X ²	Y ²
50%-1	0.0256	705.15112	1.60962	27549.15487	18.04912	0.000655 2	497238.10674
50%-2	0.0256	710.12506	0.97839	27764.41730	18.16273	0.000654 2	504277.60084
50%-3	0.0257	717.75564	0.08591	27946.75164	18.43410	0.000659 6	515173.15397
75%-1	0.0384	1067.51803	1.90286	27790.20456	41.00707	0.001475 6	1139594.7372 6
75%-2	0.0384	1062.58476	4.06989	27682.64542	40.78679	0.001473 4	1129086.3721 8
75%-3	0.0384	1014.13509	2.86488	26440.37104	38.89771	0.001471 1	1028469.9807 7
100%-1	0.0512	1382.76359	1.20505	27026.49516	70.74669	0.002617 7	1912035.1458 3
100%-2	0.0513	1398.58618	1.49006	27279.14563	71.70471	0.002628 6	1956043.3028 9
100%-3	0.0512	1378.69747	4.01571	26931.78013	70.57858	0.002620 6	1900806.7045 9
125%-1	0.0640	1715.35925	4.30460	26786.36365	109.84908	0.004100 9	2942457.3680 0
125%-2	0.0640	1736.38021	9.38741	27143.25489	111.07792	0.004092 3	3015016.2221 0
125%-3	0.0640	1731.06262	3.54584	27051.96700	110.77116	0.004094 8	2996577.8059 0
150%-1	0.0768	2060.11556	1.13485	26831.87342	158.17293	0.005895 0	4244076.1205 5
150%-2	0.0767	2075.47852	3.91300	27042.16567	159.29239	0.005890 5	4307611.0731 4
150%-3	0.0768	2050.61247	1.13182	26711.45867	157.42351	0.005893 5	4205011.4884 5
%DS	0.0187	495.21013	2.28756	451.98342	51.84972	0.001937 8	1387350.0426 5
%DSR(CV)	36.5737 9	35.70141	82.40494	1.66179	65.08580	65.72779	64.44104
Σ	0.7679 3	20806.32556	41.63990	407978.0490 5	1194.9544 9	0.044222 9	32293475.183
Σ ²	0.5897 2	432903183.30 9					

ECUACION DE LA RECTA

Pendiente = 26438,0

Intercepto = 33,58

$$y = 26438.05 x + 33,581$$

ANEXO N°9

Interpretación estadística de la regresión lineal para levofloxacin 500 mg/100 mL. Corporación Infarmasa - 2011

n	15
a	33.58086
b	26438.05254
r	0.99963
r ²	0.99927
t _{regresion}	138.29347
S ² _{XY}	179.38493
S ² _b	36547.32548
S _b	191.17355
S _{XY}	13.39347
S ² _a	1436.84288
S _a	37.90571

S _{bl}	0.72220
Y _{bl}	33.58086

DONDE:

- n: Numero de muestras
- S²_{X,Y}: Varianza del ERROR EXPERIMENTAL (al cuadrado)
- S²_b: Desviacion estandar de la pendiente (al cuadrado)
- S_{X,Y}: Varianza del ERROR EXPERIMENTAL
- S_a: Desviacion estandar del intercepto
- S²_a: Desviacion estandar del intercepto (al cuadrado)
- S_{bl}: Termino dependiente a (concentracion vs desvest)
- Y_{bl}: Termino dependiente a (concentracion vs respuesta)
- S_b: Desviacion estandar de la pendiente
- n-1: grado de libertad

- r: Coeficiente de correlación.
- r²: Coeficiente de determinación
- a: Intercepto de la recta
- b: pendiente de la recta
- p: probabilidad de error

$$t = \frac{|r| \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Ho: r = 0 H1: r ≠ 0

Decisión: el t experimental = 138,293 es mayor que el t crítico 2.145(para n-1 grados de libertad, en este caso 15-1= 14 y una probabilidad de 0.05) o de tablas por lo que existe evidencia en los datos para rechazar la Ho.

Conclusión: Es posible afirmar, con un 95% de confianza que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero.

ANEXO N°10

Test de linealidad de la pendiente y Test de proporcionalidad. Corporación Infarmasa - 2011.

t tabla(n-1)	2.145
t exp (b)	138.293
t exp (a)	0.886

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

$$t_{exp} > t_{tablas} \quad t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada,
Si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

$$t_{exp} < t_{tablas} \quad t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

Ho: $a = 0$; H1: $a \neq 0$

Decisión: No existe evidencia en los datos para rechazar la Ho.

Conclusión: El intercepto es semejante a Cero, con un 95% de confianza, es decir la recta pasa por el origen de las coordenadas

LÍMITES DE CONFIANZA

Prueba de linealidad :		El intervalo NO debe incluir al cero
$b \pm t \times S_b$		
IC =	26028.026	26848.079

El valor 2.145 es el valor de t para $15-1=14$ grados de libertad y $P=0,05$ (con una confianza del 95 %).

Prueba de proporcionalidad:		El intervalo SI debe incluir al cero
$a \pm t \times S_a$		
IC =	-47.719	114.881

Con estos límites incluyen el cero(0), el método analítico no presenta sesgo, es decir, cumple con la condición de proporcionalidad. El valor 2,145 es el valor de t para $15-1=14$ grado de libertad y $p=0,05$ con una confianza del 95%.

ANEXO N°11

TABLA N°16: Linealidad del método, concentración versus área de los estándares del levofloxacino 500 mg/100 mL inyectable. Corporación Infarmasa - 2011.

STANDARES	X mg/ml	Y Area	desvest (Y)	f.rpta (f)	X*Y	X ²	Y ²	Varianza S ²
80%-1	0.0411	1116.15910	3.59981	27184.92979	45.82727	0.0016858	1245811.12907	18885.674
80%-2	0.0411	1121.40930	0.42960	27287.14474	46.08613	0.0016889	1257558.81813	
80%-3	0.0410	1126.79943	0.40633	27456.99224	46.24239	0.0016842	1269676.95545	
100%-1	0.0512	1409.00842	4.11816	27513.50642	72.15746	0.0026226	1985304.73702	2423.053
100%-2	0.0513	1416.62236	4.41217	27610.14690	72.68411	0.0026325	2006818.90141	
100%-3	0.0513	1413.38074	2.09113	27578.09384	72.43594	0.0026266	1997645.10678	
120%-1	0.0615	1680.00203	0.67396	27325.61676	103.28795	0.0037799	2822406.83200	5667.592
120%-2	0.0601	1638.45670	0.88947	27248.74602	98.51978	0.0036156	2684540.36870	
120%-3	0.0614	1682.94555	2.31288	27399.30161	103.37146	0.0037728	2832305.73548	
%DS	0.01	236.82	1.62	149.75	24.16	0.00	660509.59	8720.308
%DSR(CV)	16.92	16.91	76.78	0.55	32.91	33.00	32.84	96.97737
Σ	0.46	12604.78	18.93	246604.48	660.61	0.02	18102068.58	26976.319
Σ ²	0.21	158880570.44						

ECUACION DE LA RECTA

Pendiente = 2737,17

Intercepto = 1,3157

$$y = 27376,17 x + 1,3157$$

ANEXO N°12

Linealidad del método, interpretación estadística de la regresión lineal para levofloxacin 500 mg/100 mL. Corporación Infarmasa - 2011.

n	9
a	1.31574
b	27376.17470
r	0.99951
r ²	0.99902
t _{regresion}	90.12029
S ² _{xy}	55.18946
S ² _b	92278.46796
S _b	303.77371
S _{xy}	7.42896
S ² _a	2169.53543
S _a	46.57827

$$t = \frac{|r| \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad H_0: r = 0 \quad H_1: r \neq 0$$

Decisión: el t experimental = 90,12029 es mayor que el t crítico 2.306 (para n-1 grados de libertad, en este caso 9-1= 8 y una probabilidad de 0.05) o de tablas por lo que existe evidencia en los datos para rechazar la H₀.

Conclusión: Es posible afirmar, con un 95% de confianza que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero.

ANEXO N°13

Linealidad del método, test de linealidad de la pendiente b y Test de proporcionalidad. Corporación Infarmasa - 2011.

t tabla (n-1)	2.306
t exp (b)	90.120
t exp (a)	0.028

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada,
Si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

$$t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Ho: $a = 0$; H1: $a \neq 0$

Decisión: No existe evidencia en los datos para rechazar la Ho.

Conclusión: El intercepto es semejante a Cero, con un 95% de confianza, es decir la recta pasa por el origen de las coordenadas

ANEXO N° 14

FOTOGRAFÍA N°1: Analito, excipiente y producto terminado de levofloxacin de 500 mg/100 mL inyectable sometidas a luz artificial y a calor a 80°C en el área de validación. Corporación Infarmasa - 2011.



ANEXO N° 15

FOTOGRAFÍA N°2: Preparación de fase móvil y de la muestra de Levofloxacinó de 500 mg/100 mL inyectable para ser evaluado en el HPLC. Corporación Infarmasa – 2011.



ANEXO N° 16

FOTOGRAFÍA N° 3: Lectura de las muestras de Levofloxacin de 500 mg/100 mL inyectable por HPLC para el análisis de contenido en el Laboratorio de Corporación de Infarmasa - 2011.



MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. Lima-2011.	¿Cumplirá las especificación de validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión?	<p>OBJETIVO GENERAL: Validar el método analítico por cromatografía líquida (HPLC) de alta resolución para la determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Evaluar y determinar la especificidad del método analítico de levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. 2.- Comprobar la precisión del método analítico para determinar el contenido de levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. 3.- Evaluar y determinar la exactitud utilizando el método analítico de contenido para levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. 4.- Determinar la linealidad utilizando el método analítico de contenido para levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. 5.- Evaluar la robustez del método analítico de levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión. 	<p>VALIDACIÓN DE ANALÍTICOS</p> <p>La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio que las características de ejecución de un método, cumple con los requerimientos para las aplicaciones habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos (USP 32, 2009). Es la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos</p> <p>El Levofloxacino es un antibiótico del grupo de las quinolonas, más concretamente una fluorquinolona, es un enantiómero activo del ofloxacino con casi el doble de la potencia de la ofloxacina con sustancialmente menos toxicidad.² Al igual que otras quinolonas, actúa al inhibir el enzima ADN girasa, encargado del empaquetamiento del ADN.</p>	<p>La validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para la determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión cumple las especificaciones</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE: Determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión.</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE: Validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</p> <p>RELACIÓN DE VARIABLES: La validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Dependerá de la determinación cuantitativa de Levofloxacino 500 mg/100 mL Inyectable para infusión.</p>	<p>POBLACION: La población a analizar es un producto terminado contenido en su envase definitivo.</p> <p>MUESTRA: 10 viales de Levofloxacino 500 mg/100 mL. Los placebo a utilizar son preparados por el área de producción; analizado por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).</p> <p>METODOLOGÍA: Se desarrollará la validación del método analítico. (Laboratorio Infarmasa, 2011). Diluyente: Ácido clorhídrico 0,05 N (Tomar 4,2 mL de Ácido Clorhídrico concentrado y llevar a una fiola de 1 L que contiene 500 mL de agua, enrasar con agua y homogenizar). Fase Móvil: Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de 348 mL de lauril sulfato de sodio al 0,24 %, 490 mL de Acetonitrilo y 12 mL de Ácido Acético glacial</p> <p>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS : COLUMNA : Octadecilsilano (C18 –150 x 4,0 mm x 5 micrones marca Zorbax) o equivalente.FLUJO: 1,0 mL/min.TEMPERATURA: 40° C.LONGITUD DE ONDA : 294 nm. VOLUMEN DE INYECCIÓN : 5 uL.</p> <p>Preparación del estándar (trabajar por duplicado): Se pesó con precisión alrededor de 53,0 mg de Levofloxacino Hemihidrato. Luego se Transferio a una fiola de 100 mL, añadir 60 mL de Diluyente; sonicar durante 10 minutos, se enraso con diluyente y se homogenizo. Luego se transferio 5,0 mL de esta solución a una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, homogenizar y filtrar. Concentración teórica final: 0,050 mg/mg Levofloxacino.</p> <p>Preparación de la muestra problema (trabajar por duplicado): Tomar una cantidad de muestra equivalente a 25 mg de Levofloxacino (5,0 mL), transferir a una fiola de 50 mL, añadir 30 mL de diluyente; sonicar durante 10 minutos, enrasar con diluyente y homogenizar. Tomar 5,0 mL de la última dilución y llevar a una fiola de 50 ml, enrasar con diluyente. Concentración teórica final: 0,050 mg/mL. Levofloxacino base</p> <p>Secuencia del sistema cromatográfico: Inyectar: Estándar 1: 5 inyecciones Estándar 2: 2 inyecciones Muestras: 2 inyecciones de cada muestra Estándar 2: 1 inyección</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D Nº 214-2011-FCB-D

Bach. Maritza MENDOZA ANCHAYHUA.

En la Ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes doce de Agosto del año Dos mil once en el Auditorio del "Departamento Académico de Ciencias Biológicas", reunidos los miembros del Jurado presididos por el Magister José Manuel Diez Macavilca encargado según memorando con asistencia de los miembros: Magister Enrique Aguilar Felices; Magister Edwin Enciso Roca y Magister Maricela López Sierralta, quien además es asesora y actuará como Secretaria Docente, para recepcionar la Tesis: **"Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100 mL inyectable para infusión"**. Lima-2011. Presentada por la **Bachiller: Maritza Mendoza Anchayhua**, quien pretende optar el Grado de Título Profesional de Químico Farmacéutica.

El Presidente (e) inicia el acto de sustentación, solicitando a la secretaria (e) la revisión del documento y la lectura de la Resolución Decanal Nº 214-2011- FCB-D, para luego indicar a la sustentante inicie la exposición en el correspondiente máximo de cuarenta y cinco minutos. Luego de la exposición, realizada en el tiempo correspondiente se inicia la segunda etapa en la que los miembros del jurado calificador, realizan las observaciones y preguntas que crean conveniente para la evaluación correspondiente como sigue: