

VALIDACIÓN RETROSPECTIVA DEL MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ACETAMINOFENO (Industrias Farmacéuticas IFA)¹

VÁSQUEZ RIBERA, LILIAN²; COPARE MORALES, YOVANA³



Lilian Vásquez Ribera

RESUMEN

Se realizó en las instalaciones de Industrias Farmacéuticas (IFA) la validación retrospectiva de un método espectrofotométrico que posibilita cuantificar el paracetamol (acetaminofeno) principio activo como producto terminado en la forma farmacéutica de comprimido. Se determinó mediante cálculos estadísticos, como línea de menor ajuste, ecuación de la recta, significación estadística, límites de confianza, coeficientes de variación, desviación estándar, promedios de mediciones, tablas estadísticas, etc., (cada uno con la cantidad de muestra requerida según exigencia para cada parámetro en estudio) que el método cumple con todos los requisitos de validación propuestos para el control químico de calidad, dicho método resultó ser lineal, preciso, exacto, específico, y sensible, además de ser rápido y sencillo. En la actualidad reviste gran importancia la validación de métodos, procesos, etc, que permitan mayor confiabilidad en los resultados, fundamentalmente cuando se trabaja con productos farmacéuticos, donde es necesario obtener datos y resultados experimentales que demuestren la aptitud para el uso que se destina.

ABSTRACT

A retrospective validation of a spectrophotometric method was conducted on the premises of Pharmaceutical Industries (IFA), which allowed the quantification of the paracetamol (acetaminophen) active ingredient as a finished product in tablet dosage form. It was determined through the use of statistical calculations such as lower line adjustment, equation of the line, statistical significance, confidence limits, coefficients of variation, standard deviation, averages of measurements, statistical tables, etc., (each with the amount of sample required for each parameter under study) that the method meets all validation requirements proposed for the chemical control of quality, this method proved to be linear, precise, accurate, specific, and sensitive as well as being quick and easy. Nowadays validation methods, processes, etc., are very important, because they allow greater reliability in the results, mainly when working with pharmaceutical products, where it is necessary to obtain data and experimental results that demonstrate the fitness for intended use.

PALABRAS CLAVE: Validación retrospectiva. Método analítico. Espectrofotometría. Cuantificación del acetaminofeno.

KEYWORDS: Retrospective validation. Analytical method. Spectrophotometry. Quantification of acetaminophen.

INTRODUCCIÓN

El proceso de control de calidad es una etapa paralela y similar al proceso productivo y en su vertiente analítica incluye: la recogida de muestra según criterios estadísticos (materia prima), la recepción y registro de muestras en el laboratorio, la asignación de ensayos, especificaciones y métodos analíticos (método de producción), la realización de los ensayos, la recogida de datos, el tratamiento estadístico e informático de los mismos y su conversión en información útil (proceso), y la emisión de los boletines o certificados de análisis (producto), como parte del trabajo corporativo de diseminación de conocimientos. En la actualidad se ha generado una gran aceptación e interés por los temas relacionados con seguridad y calidad de los productos farmacéuticos, teniendo presente que estos son productos vitales dentro de la asistencia de la salud. Es por esto que día a día se recurre a la implementación de nuevas tecnologías y fórmulas farmacéuticas con el fin de desarrollar sistemas rigurosos de calidad que proporcionen y aseguren al consumidor un producto de alta calidad que cumpla con las especificaciones.

Adicionalmente la industria farmacéutica debe velar por el total cumplimiento de la normatividad nacional e internacional en casos de exportación de fármacos, teniendo presente que los procedimientos deben estar validados para su implementación y cumplimiento de la legislación, estas normativas se basan principalmente en BPM, FDA y USP.

Para lograr obtener una producción de fármacos que cumpla con los requerimientos del consumidor se deben evaluar muchos aspectos importantes que intervienen en dicha producción como lo son la infraestructura, procedimientos, documentación y procesos como muestreo, fabricación, análisis y evaluación de todos los factores que intervienen en el proceso productivo, asegurando que sean bajo las condiciones que garantizan que los materiales y productos son liberados para su uso, venta o suministro con un alto nivel de calidad que ha sido juzgado como satisfactorio.

La validación de un proceso toma gran relevancia en el mismo, ya que es la demostración escrita y experimental con un alto grado de confianza que permitirá obtener de forma consistente y permanente

¹ Práctica en Empresa para optar al título de Licenciatura en Bioquímica y Farmacia. UCEBOL

² Tesista. Estudiante de la Carrera de Bioquímica y Farmacia. UCEBOL

³ Docente asesor. Carrera de Bioquímica y Farmacia. UCEBOL.

productos que posean las características de calidad predefinidas, además que es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos.

La validación de un método analítico permite conseguir objetivos técnicos y al mismo tiempo exigencias legales en la industria farmacéutica y en la de fabricación de sustancias activas. Disponer de métodos analíticos que garanticen la fiabilidad de los resultados ha sido siempre el deseo de todo analista responsable, y actualmente es una exigencia legal. Tanto desde un punto de vista meramente económico – por el elevado costo que suponen las repeticiones – como desde el punto de vista científico. Este tema propone las directrices generales, aceptadas internacionalmente, para la comprobación de que el método analítico va a ser fiable, y los resultados obtenidos van a producir la evidencia científica necesaria para obtener las conclusiones apropiadas. (WHO, 1999).

OBJETIVOS

Objetivo General

Validar retrospectivamente un método analítico por espectrofotometría que cumpla con los requerimientos y normas de las BPM, FDA y USP para la cuantificación de paracetamol (Acetaminofeno) comprimido, en la Industria Farmacéutica IFA en el periodo de junio del 2009 – agosto 2010.

Objetivos Específicos

- Realizar la validación de un método de análisis retrospectivamente.
- Determinar y demostrar que la metodología propuesta cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad.
- Confirmar y documentar que los resultados obtenidos actualmente son confiables.
- Cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en cuanto a validación de métodos analíticos.
- Proveer una metodología validada que sirva de guía a la industria farmacéutica para la cuantificación de este principio activo, tomando en cuenta que si es utilizada en otros productos debe ser ensayada y validada nuevamente.

MÉTODOS

La recopilación de datos se llevó a cabo a través del Historial de valoraciones por espectrofotometría del Paracetamol de 500 mg correspondientes al periodo de Junio del 2009 hasta el mes de agosto del 2010.

En el desarrollo de la validación: El método analítico por espectrofotometría ultravioleta utilizó un espectrofotómetro SHIMADZU UV-visible 1700.

En la validación del método de análisis: Para calcular los parámetros de validación de un método analítico fue necesario contar mínimo con 3 datos por parámetro y para la linealidad mínimo con cinco datos.

Para una validación se debe considerar lo siguiente cuando sea apropiado: Un Plan Maestro de Validación que incluye los siguientes puntos:

- **Objetivo:** Éste describe si la validación es para un método cualitativo, un método cuantitativo o para una aplicación en investigación.

- **Alcance:** Se define los parámetros necesarios de acuerdo con la categoría y aplicabilidad del método.
- **Responsables:** Se define las personas que llevan a cabo la validación y las que tienen la responsabilidad de la aprobación.
- **Pre-requisitos:** En éstos se expresa las condiciones que deben cumplirse para llevar a cabo el proceso, como son la calibración de equipos de medición, la calificación de las condiciones de trabajo, el entrenamiento y la calificación del personal responsable.
- **Factores Críticos:** Se describe las variables de mayor influencia y que puedan interferir en la calidad del proceso y del resultado.
- De acuerdo con las características del método analítico, el alcance y aplicabilidad del mismo define si es necesario calcular:

- 1.- Linealidad
- 2.- Precisión = Repetibilidad. Reproducibilidad. Precisión intermedia
- 3.- Exactitud
- 4.- Selectividad/especificidad
- 5.- Sensibilidad = Límite de detección

Límite de cuantificación

Para los métodos desarrollados por LABORATORIOS IFA S.A, es necesario calcular todos los parámetros anteriormente indicados.

Requisitos mínimos de un método analítico de acuerdo con el alcance y aplicabilidad general

Cuadro N° 1. Requisitos mínimos del método analítico de acuerdo con el alcance y aplicabilidad general

NOMBRE	PARÁMETRO A CALCULAR
TEST DE PUREZA	• Selectividad (especificidad)
	• Límite de detección o límite de cuantificación
ENSAYOS (VALORACIÓN)	• Selectividad (especificidad)
	• Precisión
	• Repetibilidad
	• Reproducibilidad
	• Precisión intermedia
	• Exactitud
	• Linealidad
	• Sensibilidad y límite de cuantificación

Fuente: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria

Requisitos mínimos de un método analítico de acuerdo con el alcance y aplicabilidad según la categoría establecida en la USP 29.

Cuadro N° 2. Clasificación por categorías

PARÁMETRO	CATEGORÍA				
	I	IIa	IIb	III	IV
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Exactitud	SI	SI	NO	*	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Rango de trabajo	SI	SI	*	*	NO
Linealidad	SI	SI	*	*	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	NO	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del test específico

Fuente: USP29

Cuadro N° 3. Correspondencia por categoría de los métodos de análisis según USP 31.

Categoría I	Métodos analíticos para cuantificación de un mayor componente en ensayo de: 1. Sustancias (ingredientes activos, preservativos, etc.), materia prima 2. Ingredientes activos y preservativos en preparaciones.
Categoría II	Métodos de ensayo para determinar: 1. Impurezas Orgánicas, solventes, compuestos relacionados por producto en materiales. 2. Productos de degradación en productos terminados.
Categoría IIa	Métodos de ensayo cuantitativos
Categoría IIb	Métodos de ensayo para test límite, determinación de impurezas
Categoría III	Métodos característicos de algunas formas farmacéuticas, indicadores de desempeño. Ejemplo los test de Desintegración y disolución
Categoría IV	Métodos de ensayo para identificación

Fuente: USP31

Límites de aceptación

Se calculan los límites de aceptación del método considerando:

Linealidad

Se expresa en Coeficiente de correlación.- El coeficiente de correlación refleja el grado de relación o ligazón entre las variables x (concentración), y (respuesta). El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal de pendiente positiva, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre x e y. En análisis químico se obtienen valores de r elevadas, iguales o superiores a 0.999, si bien en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0.99). Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor tr (n-2 grados de libertad) y se compara con el valor de t de tabla para el nivel de confianza requerido. En este caso si tr (valor del coeficiente de correlación) es mayor que el t de tabla, significa que existe una correlación lineal entre x e y, para el nivel de confianza requerido.

Precisión

De un método analítico se calcula matemáticamente en términos de la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). El valor aceptable de precisión de un método depende de la concentración del analito y del número de réplicas del análisis. Para el presente procedimiento, se consideran las recomendaciones de aceptación de la monografía, "Validación de Métodos Analíticos", de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, los cuales se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro N° 4. Criterio de aceptación para precisión

Intervalo de aceptación (%)	Número de réplicas (n) y CV máximo aceptable con α 0.05 e intervalo de confianza del 95%				
	CV (%) MÁXIMO ACEPTABLE				
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
95-105	1,9	2,7	3,3	3,8	4,2
90-110	3,9	5,5	7,8	7,8	8,7
85-115	5,8	8,2	11,6	11,6	12,9
99,0-101,0	0,39	0,55	0,67	0,78	0,87
98,5-101,5	0,58	0,82	1,00	1,16	1,30
98,0-102,0	0,77	1,09	1,33	1,54	1,72

Fuente: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria

Repetibilidad

Para la validación de los métodos en LABORATORIOS IFA S.A., el ensayo de repetibilidad, con un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal o un mínimo de tres

muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9

muestras), se considera aceptado con coeficientes de variación máximo del 3%, es posible

que por los requerimientos del cliente el coeficiente de variación (CV) sea menor, para ningún caso será mayor.

Reproducibilidad o Precisión Intermedia

Para la validación de los métodos en LABORATORIOS IFA S.A., el ensayo de precisión intermedia o reproducibilidad, se considera aceptado con coeficientes de variación máximo del 5% e inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, es posible que por los requerimientos del cliente el coeficiente de variación (CV) sea menor, para ningún caso será mayor.

El diseño matricial mínimo será:

Cuadro N° 5. Diseño matricial mínimo

Analista 1	Día 1	Día 2
Analista 2	Día 1	Día 2

Fuente: Elaboración Propia

Exactitud

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o por la diferencia entre el valor hallado y el valor de referencia o agregado.

El rango para determinar el ensayo debe cubrir el especificado en el producto, por ejemplo la especificación dice del 90 al 110% los tres niveles de concentración serían 85, 100 y 115%

LABORATORIOS IFA S.A utiliza el método de adición de sustancia de referencia para la obtención de datos; el test de t de Student para determinar si el valor medio encontrado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para el grado de probabilidad determinado.

Para una sola concentración (aplicado al trabajo en curso) se compara el t experimental (texp) con el t tabulado (ttabla). Los valores de t experimental (texp) se comparan con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad, y la exactitud se evalúa para el promedio de recuperación de todas las concentraciones. Si t experimental (texp) < t tabulado (ttabla), no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

Sensibilidad

Los parámetros a definir para poder evaluar la sensibilidad de un método analítico son los Límite de Detección y Límite de Cuantificación. El límite de cuantificación es entre tres y diez veces el límite de detección según cada caso.

Especificidad/Selectividad

El método se considera selectivo cuando al analizar el placebo no hay respuesta y al analizar al placebo adicionado del analito y las muestras solas, se puede diferenciar claramente la respuesta del analito. Por ejemplo en el barrido en espectrofotómetro los picos y valles.

Descripción del método analítico

El tamaño de la muestra utilizada y el método de muestreo, se realizó al azar de lotes correspondientes al año 2009 y al año 2010 hasta el mes de julio, con la cantidad de muestras de acuerdo a las exigencias requeridas para cada parámetro a evaluar.

Para linealidad

Se tomaron 6 muestras a diferentes concentraciones cada una por triplicado, a partir del paracetamol (acetaminofeno) materia prima, con diluciones y contenidos de muestra correspondientes a (2.28/500), (4.56/250), (5.70/200), (11.40/100), (15.21/75) y (22.81/50) µg/ml y se tomo las absorbancias obtenidas de cada una. Posteriormente se construyó la curva de absorbancia contra concentración y se efectuó un análisis de regresión (línea de menor ajuste, ecuación de la recta), calculando el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), las pendientes, interceptos, significación estadística del coeficiente de correlación (r), significación estadística del coeficiente de regresión (b) y límites de confianza.

Para precisión

Se tomaron 5 muestras analizadas a una misma concentración cada una por triplicado. Se efectuaron límites de confianza y coeficientes de variación. Se realizaron pruebas t de Student para n-1 grados de libertad, con dos intervalos de confianza (al 5% y al 1%). Este parámetro incluye la repetibilidad y reproducibilidad.

Para repetibilidad

Se empleó la misma técnica espectrofotométrica. Se tomaron 10 muestras analizadas a una misma concentración cada una por triplicado. Medidas en condiciones repetitivas, es decir, mismas condiciones, sobre las mismas muestras, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, el mismo día y con los mismos aparatos y reactivos. Se realizaron cálculos de coeficientes de variación (CV).

Para precisión intermedia

Se repitió la misma técnica señalada anteriormente, con 5 muestras analizadas a una misma concentración cada una por triplicado. Medidas en condiciones reproducibles, es decir, sobre las mismas muestras pero en condiciones diferentes, por dos analistas (1 y 2) y dos días diferentes. Se realizaron cálculos de coeficientes de variación (CV).

Para exactitud

Se utilizó el dato de valor verdadero (estándares de referencia). Se partió de 5 muestras analizadas a una misma concentración cada una por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación (R) y coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD). Los valores de t experimental (texp) se comparan con los tabulados (ttabla) para el intervalo de confianza requerido al (5% y 1%) con n-1 grados de libertad.

Para sensibilidad

Se utilizó 3 muestras del Blanco (buffer pH 5.8), cada una por triplicado. Los parámetros a definir para evaluar la sensibilidad del método fueron límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Las variables en estudio fueron valor estimado de la respuesta del blanco (Ybl), desviación estimada de la respuesta del blanco (Sbl) y pendiente de la curva de calibración (b). El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso.

Para especificidad/selectividad

Se compararon barridos a una misma concentración por triplicado de la sustancia de interés (paracetamol), como producto terminado contra Estándares primarios USP y Estándares secundarios M.P. (materia prima).

Interpretación estadística de los parámetros de validación

Linealidad

1.- Coeficiente de correlación (r).

El coeficiente de correlación refleja el grado de relación o ligazón entre las variables x (concentración), y (respuesta). El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal de pendiente positiva, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre x e y. En análisis químico se obtienen valores de r elevadas, iguales o superiores a 0,999, si bien en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,99).

2.- Curva de calibración que relaciona respuesta

Área, alturas, absorbancia, etc., con concentración o cantidad de analito. La cual posteriormente se gráfica para su documentación e interpretación estadística. La recta de calibración es del tipo:

$$y = a + bx$$

3.- Ecuación de la recta

Donde:

x = corresponde a la concentración

y = corresponde a la respuesta

b = el valor de la pendiente o variación de respuesta por unidad de concentración.

a = el termino independiente o intercepto sobre el eje Y.

r = coeficiente de correlación.

r^2 = coeficiente de determinación o error.

Interpretación estadística de la regresión lineal: La representación gráfica suele ser suficiente. Sin embargo conviene efectuar una interpretación estadística de la regresión lineal.

4.- Significación estadística del coeficiente de correlación (r).

El mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor (tr) n-2 grados de libertad y se compara con el valor de t tabulado (ttabla) para el nivel de confianza requerido. En este caso si el valor calculado del coeficiente de correlación (tr) es mayor que el t tabulado (ttabla), significa que existe una correlación lineal entre x e y, para el nivel de confianza requerido.

5.- Significación estadística de la varianza de la pendiente (b).

La pendiente b se llama también coeficiente de regresión, y se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad, el cual a mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). La varianza de la pendiente Sb2 se utiliza como expresión matemática de la linealidad, a menor varianza mejor linealidad, para expresar la linealidad también se utiliza la desviación estándar de la pendiente Sb y el coeficiente de variación (%CV).

A su vez los Límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión: $b \pm t Sb$

Donde:

- b = valor de la pendiente
- t = valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad para el grado de confianza escogido.
- Sb = desviación estándar de la pendiente.

Precisión

Los criterios de aceptación pueden ser variables, por ej.: la USP indica una desviación estándar relativa (RSD) del sistema de no más de 2%, o según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria existen tablas que relacionan la desviación estándar relativa (RSD) máxima aceptable para un método analítico, en función de los límites de aceptación y del número de réplicas.

1.- Límites de confianza

En muchos casos debe indicarse el intervalo de confianza de la medida, es decir el rango en el cual se encuentra presente el analito, preferentemente, cuando el número de muestras es pequeño (menor de 20), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución de Student según la fórmula:

$$X - \frac{tv, \alpha \times S}{\sqrt{n}} < \mu < X + \frac{tv, \alpha \times S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

- X = promedio de las mediciones.
- tv, α = es el valor de Student, tabulado para n mediciones con v= n-1 grados de libertad y para el nivel α de confianza empleado, generalmente 95%.
- S = desviación estándar de las mediciones.
- n = número de mediciones.

Repetibilidad y Precisión Intermedia

Para estos 2 parámetros de precisión sus cálculos corresponden a coeficientes de variación (CV). Los criterios de aceptación pueden ser variables, según bibliografía, para repetibilidad CV Max. 3% y para reproducibilidad CV Max. 5%.

Exactitud

1.- Metodología adaptada según USP (en cuanto a lectura longitud de onda 243nm y medio de disolución utilizado Buffer pH 5.8).

2.- Recuperación

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. Si bien el valor verdadero de concentración no se conoce sino que solo puede estimarse, es posible tomar una muestra por un procedimiento más exacto, y utilizarla como referencia.

Recuperación:

$$\text{Recuperación: } R = \frac{\bar{X} * 100}{X}$$

Donde:

- X = valor verdadero.
- X = promedio de las mediciones.

3.- Para una sola concentración (2 formulas opcionales)

Para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente, para esto se efectúa un test estadístico, como lo es el test de Student, para un nivel de confianza determinado. El test de Student emplea, al menos, 3 concentraciones del analito, preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema, en general se utilizan concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120% del valor esperado.

En este caso, el valor de t experimental (texp) se calcula como:

$$\text{A) } t_{\text{exp}} = \frac{[X - \bar{X}]\sqrt{n}}{S} \quad \text{B) } t_{\text{exp}} = \frac{(100 - R)}{\text{RSD} \times \sqrt{n}}$$

Donde: A)

- $\bar{X}$ = valor verdadero.
- X = promedio de las mediciones.
- n = número de mediciones.
- S = desviación estándar relativa de las mediciones.

Donde: B)

- R = recuperación porcentual.
- n = número de mediciones.
- CV = coeficiente de variación. (CV = RSD = %)

En ambas fórmulas

Los valores de t experimental (texp) se comparan con los tabulados (ttabla) para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad, y la exactitud se evalúa para el promedio de recuperación de las concentraciones. Si t experimental (texp) < t tabulado (ttabla), no existe diferencia significativa y la exactitud es apropiada.

Valores tabulados (t de tabla)

Para 5% y 1% de significación, con n – 1 grados de libertad.

Sensibilidad

- Se determina a partir de la pendiente de la curva de calibración (concentración v/s respuesta) en el rango apropiado.
- Se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Ybl
- Se determina la desviación estándar correspondiente a la concentración, se calcula la recta correspondiente a concentración v/s y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado correspondiente a la desviación estándar del blanco: Sbl

1.- Límite de detección (LD)

Corresponde a la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.). Se calcula como:

$$\text{Limite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

Donde:

- Y_{bl} = valor estimado de la respuesta del blanco.
- S_{bl} = desviación estándar estimada del blanco.
- b = pendiente de la curva de calibración.

2.- Límite de cuantificación (LD)

Corresponde a la menor concentración de analito de una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas y se expresa también en unidades de concentración. Se calcula según:

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

Donde:

- Y_{bl} = valor estimado de la respuesta del blanco.
- S_{bl} = desviación estándar estimada del blanco.
- b = pendiente de la curva de calibración.
- Los límites de detección y cuantificación se estiman a partir de la curva de regresión o calibración, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Información general del producto

Producto = Paracetamol 500 mg
Método = Espectrofotometría (adaptada según USP 31)
Rango = 90-110%
Peso estándar materia prima (mg/25 ml) = 32,00
Medio = buffer pH 5,8
Humedad del estándar materia prima = 0,32
Long onda = 243 nm
Peso seco estándar materia prima = 31,68
Lote M.P. = 902050
Concentración real (mg/ml) = 1140,48

Parámetros para la validación de un método analítico

Linealidad

1.- Tipos de variables

Variable Dependiente (Y) = Absorbancias (Lecturas Espectrofotómetro)

Variable Independiente (X) = Diluciones

Cuadro N° 6. Tipos de variables

	Variable X	Variable Y	X ²	Y ²	XY
	2,28	0,16	5,20	0,03	0,36
	4,56	0,31	20,81	0,10	1,42
	5,70	0,39	32,52	0,15	2,21
	11,40	0,77	130,07	0,60	8,83
	15,21	1,01	231,23	1,02	15,36
	22,81	1,54	520,28	2,36	35,01
Suma (S)	61,97	4,18	940,11	4,25	63,20
Media (X)	10,33	0,70			
Desv. Estándar (S)	7,75	0,52			
Coef. de Var. (CV)	1,33	1,35			
No. muestras (n)	6				
Grados de lib. (Ω)	4				

Fuente: Elaboración propia

2.- Línea de menor ajuste

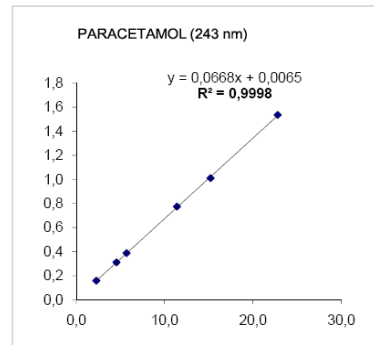


Figura N° 1. Línea de menor ajuste

Fuente: Elaboración Propia

3.- Ecuación de la recta

$$Y_e = a + bX$$

$$Y_e = 0,006 + 0,066X$$

$$a \text{ (intercepto)} = 0,006$$

$$b \text{ (coeficiente de regresión)} = 0,066$$

$$r \text{ (coeficiente de correlación)} = 0,316$$

$$r^2 \text{ (coef. de determinación o error)} = 0,1$$

$$X = \frac{(Y - 0,0065)}{0,0671}$$

$$R = 0,999$$

4.- Significancia estadística del coeficiente de correlación (r)

Valor tabulado del estadístico "t" de Student = 0,917

Para n-2 grados de libertad (6-2 = 4)

Para ∞ (nivel de significación) = 1%

Como r_c (0,999) es mayor que r_t (0,917), entonces el resultado es ALTAMENTE

SIGNIFICATIVO (**)

Por lo tanto, $r_c = 0,999^{**}$, indica la alta correlación que existe entre las variables en estudio

5.- Significancia estadística del coeficiente de regresión (b)

$$a) \text{ Límites de confianza} = b \pm t S_b$$

$$S_b = \frac{S^2_{xy}}{\sqrt{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

$$S^2_{xy} = \frac{\sum X_i^2 - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i}{n - 2}$$

Cálculos

$$S^2 = 233,98$$

$$S_b = 0,88$$

Donde:

b = valor de la pendiente (coeficiente de regresión) = 0,066

t = valor tabulado de "t" de Student para n-2 grados de libertad (n-2 = 4) y ∞ (nivel de significación) = 5% 2,78

t = valor tabulado de "t" de Student para $n-2$ grados de libertad ($n-2 = 4$) y ∞ (nivel de significación) = 1% 4,60

S_b = desviación estándar de la pendiente = 0,88

Donde los Límites de confianza = $b \pm t S_b$

Para $\infty = 5\%$

$0,066 - (2,78 \cdot 0,88) > \mu > 0,066 + (2,78 \cdot 0,88) = -2,3885 > \mu > 2,5205$

Para $\infty = 1\%$

$0,066 - (4,60 \cdot 0,88) > \mu > 0,066 + (4,60 \cdot 0,88) = -3,9954 > \mu > 4,1274$

En ambos casos el valor de la desviación estándar de la pendiente (S_b) se encuentra dentro de los Límites de confianza

Al analizar los resultados obtenidos en la linealidad se pudo constatar que los valores de coeficientes de correlación (r) para el método evaluado, se acercó bastante a la unidad, además de obtener coeficientes de determinación o error (r^2), coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), pendientes e interceptos, significación estadística del coeficiente de correlación (r), significación estadística del coeficiente de regresión (b) y límites de confianza, dentro de los límites exigidos. Todo lo anterior nos permite afirmar que existe una buena correlación entre la concentración y la respuesta obtenida (valores de absorbancia), lo cual demuestra linealidad en el rango de concentraciones estudiadas.

Precisión

5 Muestras (lotes) con 3 réplicas (R) cada una. Misma concentración

Cuadro N° 7. Precisión

	R1	R2	R3	PROM.
LOTE 1	98,50	98,50	98,49	98,50
LOTE 2	99,38	99,37	98,92	99,22
LOTE 3	98,94	99,03	98,93	98,97
LOTE 4	99,09	98,97	98,43	98,83
LOTE 5	97,65	97,48	97,77	97,63
	PROM. %			98,63
	DESVEST. %			0,62

Fuente: Elaboración Propia

1.- Límites de confianza

$X - (t \cdot S / (n^{0,5})) > \mu > X + (t \cdot S / (n^{0,5}))$

Donde:

X = Promedio de las mediciones = 98,63

t = valor tabulado de "t" de Student para $n-1$ grados de libertad ($n-1 = 14$) y ∞ (nivel de significación) = 5% 2,15

t = valor tabulado de "t" de Student para $n-1$ grados de libertad ($n-1 = 14$) y ∞ (nivel de significación) = 1% 3,00

S = desviación estándar de las mediciones = 0,62

n = número de mediciones = 15

Para $\infty = 5\%$

$98,63 - (2,15 \cdot 0,62 / (15^{0,5})) > \mu > 98,63 + (2,15 \cdot 0,62 / (15^{0,5})) = 98,2882 > \mu > 98,9718$

Para $\infty = 1\%$

$98,63 - (3,00 \cdot 0,62 / (15^{0,5})) > \mu > 98,63 + (3,00 \cdot 0,62 / (15^{0,5})) = 98,1531 > \mu > 99,1069$

En ambos casos el valor de X se encuentra dentro de los Límites de confianza

2.- Coeficiente de Variación (CV)

$$CV = RSD = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Donde:

RSD = desviación estándar relativa

S = desviación estándar de las mediciones = 0,62

X = Promedio de las mediciones = 98,63

$CV = RSD = \% 0,62$

Repetibilidad

10 Muestras (lotes) analizados a una misma concentración con 3 réplicas (R) cada una. Misma condiciones.

Cuadro N° 8. Repetibilidad

	R1	R2	R3	PROM.
LOTE 1	98,50	98,50	98,49	98,50
LOTE 2	99,38	99,37	98,92	99,22
LOTE 3	98,94	99,03	98,93	98,97
LOTE 4	99,09	98,97	98,43	98,83
LOTE 5	97,65	97,48	97,77	97,63
LOTE 6	98,51	98,17	98,52	98,40
LOTE 7	98,58	98,58	98,69	98,62
LOTE 8	96,87	96,99	96,70	96,85
LOTE 9	99,09	99,00	98,16	98,75
LOTE 10	100,81	100,37	100,76	100,65
	PROM. %			98,64
	DESVEST. %			0,99
	C.V. %			1,00

Fuente: Elaboración Propia

Para Repetibilidad: $CV = \text{Max. } 3\%$

Analista 1

$CV = RSD = \% 1,00$

Precisión Intermedia

5 Muestras (lotes) analizados a una misma concentración, con 3 réplicas (R) cada una. Diferentes condiciones.

Cuadro N° 9. Precisión Intermedia – Analista 1

ANALISTA 1 = DÍA 1				
	R1	R2	R3	PROM.
LOTE 1	98,50	98,50	98,49	98,50
LOTE 2	99,38	99,37	98,92	99,22
LOTE 3	98,94	99,03	98,93	98,97
LOTE 4	99,09	98,97	98,43	98,83
LOTE 5	97,65	97,48	97,77	97,63
ANALISTA 1 = DÍA 2				
LOTE 1	97,41	97,83	97,7	97,64
LOTE 2	99,08	99,28	99,15	99,17
LOTE 3	98,45	98,03	98,60	98,35
LOTE 4	99,15	98,82	98,29	98,75
LOTE 5	96,63	96,81	96,79	96,74
	PROM. %			98,38
	DESVEST. %			0,80
	C.V. %			0,82

Fuente: Elaboración Propia

Cuadro N° 10. Precisión Intermedia – Analista 2

ANALISTA 2 = DIA 1				
	R1	R2	R3	PROM.
LOTE 1	99,79	99,4	99,92	99,70
LOTE 2	99,06	98,66	98,88	98,87
LOTE 3	97,73	97,33	97,61	97,56
LOTE 4	98,27	98,39	98,36	98,34
LOTE 5	99,62	99,65	99,40	99,56
ANALISTA 2 = DIA 2				
LOTE 1	98,61	99,23	98,59	98,81
LOTE 2	98,78	98,87	99,59	99,08
LOTE 3	98,11	97,92	98,15	98,06
LOTE 4	99,09	99,12	99,04	99,08
LOTE 5	99,86	99,37	99,76	99,66
PROM. %				98,87
DESVEST. %				0,71
C.V. %				0,72

Fuente: Elaboración Propia

Para Precisión Intermedia: CV = Max. 5%

Analista 1

CV = RSD = % 0,82

Analista 2

CV = RSD = % 0,72

La precisión, evaluada como repetibilidad y precisión intermedia, mostró resultados satisfactorios, pues los coeficientes de variación (CV) determinados cumplieron con el criterio de aceptación también se aplicó la prueba de t de Student para límites de confianza. El cumplimiento de ambos estudios permite afirmar que el método es preciso.

Exactitud

1.- Metodología adaptada según USP 31

En la que indica la lectura a una longitud de onda Max. 243 nm.

Producto : Paracetamol 500 mg

Muestras : 5 lotes

Réplicas : 3 (R)

Peso muestra (mg) : 150

Volumen total (ml) : 100

Dilución : 100

Peso total (mg) 10 comp. : 5942

a (intercepto) : 0,006

b (coef. regresión) : 0,066

RANGO : 90-110%

Valoraciones

5 Muestras (lotes) con 3 réplicas (R) cada una.

Analizados a una misma concentración.

Cuadro N° 11. Valoraciones

	R1	R2	R3	PROM.
LOTE 1	98,50	98,50	98,49	98,50
LOTE 2	99,38	99,37	98,92	99,22
LOTE 3	98,94	99,03	98,93	98,97
LOTE 4	99,09	98,97	98,43	98,83
LOTE 5	97,65	97,48	97,77	97,63
PROM. %				98,63
DESVEST. %				0,62
CV %				0,62

Fuente: Elaboración Propia

Valor verdadero (Estándar de Referencia)

2 Estándares: primario y secundario con 3 réplicas (R) cada uno.

Analizados a una misma concentración.

Cuadro N° 12. Valor verdadero (Estándar de Referencia)

ESTANDARES DE REFERENCIA	R1	R2	R3	PROM.
E.P.	99,98	99,88	99,86	99,91
E.S.	98,91	99,08	99,45	99,15
PROM. %				99,53

Fuente: Elaboración Propia

2.- Recuperación (R) %

Cálculos:

$$R = \frac{\bar{X} - X}{X} * 100 = 100,91$$

Donde:

$\bar{X}$ = valor verdadero = 99,53

X = promedio de las mediciones = 98,63

R = porcentaje de recuperación = 100,91

3.- Para una sola concentración (dos formulas a elección)

Cálculos:

$$t_{exp} = \frac{(X - \bar{X}) \sqrt{n}}{S} = -0,38$$

$$t_{exp} = \frac{(100 - R)}{RSD * \sqrt{n}} = -0,38$$

Donde:

X = Promedio de las mediciones = 98,63

$\bar{X}$ = Valor verdadero = 99,53

n = número de mediciones = 15

S = desviación estándar = 0,62

Donde:

R = recuperación porcentual = 100,91

n = número de mediciones = 15

CV = coeficiente de variación = 0,62

CV = RSD = %

$t_{exp} = -0,38$

$t_{exp} = -0,38$

Valores tabulados (t de tabla)

$t_{tabla} = (\alpha = 5\% \text{ y } \Omega n-1) = 2,15$

$t_{tabla} = (\alpha = 1\% \text{ y } \Omega n-1) = 3,00$

Como t experimental (t_{exp}) es menor que t tabulado (t_{tabla}), en ambas fórmulas, entonces el método tiene la exactitud requerida.

Otro aspecto importante que se tuvo en cuenta en el proceso de validación fue la exactitud, la cual se expresa por el porcentaje de recuperación (R), el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) y comparación de t experimental (t_{exp}) con t tabulado (t_{tabla}). Como se puede evidenciar en los resultados, el método propuesto es exacto, ya que el t experimental comparado con el de tabla es menor en ambas formulas, es decir, se encuentra dentro del intervalo establecido, lo que confirma la exactitud del método.

Sensibilidad: Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)

Blanco (Medio: Buffer pH 5,8)

3 Muestras con 3 réplicas (R) cada una

Cuadro N° 13. Sensibilidad LD y LC

	R1	R2	R3	PROM.
MUESTRA 1	0,043	0,044	0,046	0,044
MUESTRA 2	0,047	0,046	0,046	0,046
MUESTRA 3	0,048	0,048	0,049	0,048
	PROM. %			0,046
	DESVEST. %			0,002

Fuente: Elaboración Propia

1.- Límite de detección (LD)

Cálculos:

$$\frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} = 0,79$$

Donde:

Y_{bl} = valor estimado de la respuesta del blanco = 0,046

S_{bl} = desviación estándar estimada del blanco = 0,002

b = pendiente de la curva de calibración = 0,066

2.- Límite de cuantificación (LC)

Cálculos:

$$\frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} = 1,00$$

Donde:

Y_{bl} = valor estimado de la respuesta del blanco = 0,046

S_{bl} = desviación estándar estimada del blanco = 0,002

b = pendiente de la curva de calibración = 0,066

En cuanto a la sensibilidad del método los límites de detección y cuantificación estimados a partir de la curva de calibración o regresión (pendiente b), desviación estándar estimada del blanco (S_{bl}) y valor estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}), demostraron ser mínimos lo cual indica una buena sensibilidad al método, ya que estos son estimados a partir de concentraciones mínimas de analito.

Especificidad/Selectividad

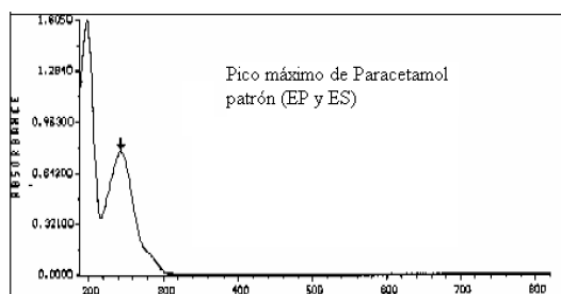


Figura N° 2. Máximo de absorbancia 243nm en buffer pH 5.8

(E.P.: Estándar Primario y E.S.: Estándar Secundario)

Fuente: SHIMADZU UV- visible 1700

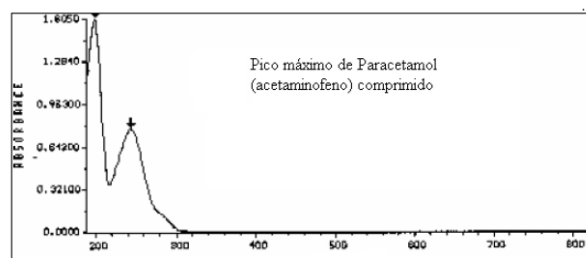


Figura N° 3. Máximo de absorbancia 243nm en buffer pH 5.8

Paracetamol como producto terminado

Fuente: SHIMADZU UV- visible 1700

Como criterio para especificidad/selectividad se estableció que en las tres mediciones los picos deberían ser de 243nm o aproximadamente (según indica USP 31 para lectura del paracetamol). En las cuales las lecturas indicaron como pico significativo a 243nm analizadas a igual concentración de analito. Los resultados del ensayo de especificidad demostraron la no existencia de sustancias que puedan interferir en el procedimiento.

Todo el estudio desarrollado permite afirmar que el método espectrofotométrico propuesto para la cuantificación de paracetamol (acetaminofeno), es fiable, pues demuestra mantener los criterios fundamentales de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, especificidad/selectividad y sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación).

CONCLUSIONES

Se realizó la validación retrospectiva del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de paracetamol comprimido.

Se determinó y demostró en el estudio desarrollado que el método espectrofotométrico propuesto para la cuantificación del principio activo paracetamol (acetaminofeno) como producto terminado, es fiable, pues demuestra mantener los criterios fundamentales de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, especificidad (selectividad) y sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación).

Dicho estudio documentado, afirma que los resultados obtenidos actualmente son confiables. Por tanto el estudio cumple con las normas y requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en cuanto a validación de métodos analíticos.

Se proporcionó una metodología validada que se utiliza como guía en la Industria Farmacéutica IFA para la cuantificación de este principio activo y considerando que si se

emplea en otros productos deberá ser ensayada y validada nuevamente.

RECOMENDACIONES

Proveer una metodología validada que sirva como guía a la industria farmacéutica es de gran relevancia, ya que es la demostración escrita y experimental con un alto grado de confianza que en un transcurso específico arrojará de forma consistente y permanente productos que poseerán las características de calidad predefinidas, además que es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos.

La industria farmacéutica deberá velar por el total cumplimiento de la normatividad nacional e internacional en la producción de fármacos, teniendo presente que los procedimientos deben estar validados para su implementación y cumplimiento de la legislación, estas normativas se basan principalmente en BPM, FDA y USP.

Realizar una evaluación periódica de métodos analíticos que permitan garantizar la calidad de los fármacos. Todo esto para lograr obtener una producción de fármacos que cumpla con los requerimientos del consumidor.

BIBLIOGRAFIA (RESUMEN)

APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA VISIBLE Y ULTRAVIOLETA.

[Fuente]: www.es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometría.

APUNTES SOBRE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. 1999. Validación Industrial.

Barcelona, España. p. 415-421.

CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.

[Fuente]: www.hiq.aga.com.co/International/Web/LG/CO/likelgspgco.nsf/docbyalias/nav_analytical.

Compite Med

CASO N° 3

Se ha fotografiado la actividad hematófaga de un mosquito frecuente en el área sudamericana, especialmente en ciertas áreas subtropicales de Bolivia. Se ha especulado que es insecto vector de una de las principales enfermedades parasitarias de la sangre existentes en el país, como dengue, malaria, leishmaniasis, fiebre amarilla, etc. Por sus características morfológicas se le ha identificado como:



¿SU DIAGNÓSTICO?

- Culex sp.
- Anófeles sp.
- Lutzomyia
- Aedes Aegypti

Respuesta: Página 62