

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico.

Ruth Andrea Cordero Figueroa

Maestría en Gestión de Calidad con Especialización en Inocuidad de Alimentos

Guatemala, julio de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico.

Ruth Andrea Cordero Figueroa

Para optar al grado de Maestra en Artes

Maestría en Gestión de Calidad con Especialización en Inocuidad de Alimentos

Guatemala, julio de 2019

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto	DECANO
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	SECRETARIA
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
BR. Byron Enrique Pérez Díaz	VOCAL IV
BR. Pamela Carolina Ortega Jiménez	VOCAL V

CONSEJO ACADÉMICO
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Pablo Ernesto Oliva Soto, MA.

Tamara Ileana Velásquez Porta, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo MA.

Clara Aurora García González, MA.

Silvia Marisol Archila Jiménez, MSc.

ACTO QUE DEDICO A:

DIOS

Por ser el guardador de mi vida, por ser mi guía y mi fortaleza, por bendecir todos los días de mi vida.

A MIS PADRES

Sarvelio y Ruth por ser los pilares de mi vida, por estar incondicionalmente para mí.

A MIS HERMANOS

Emanuel y Saul por ser los ángeles de mi vida, por ser mis mejores amigos y por todo el apoyo brindado. Emy por el apoyo y cariño.

A MI ABUELITA

Por ser mi ejemplo de fuerza y perseverancia.

A MIS AMIGOS

Raisa, Fernando y Nimsi, por todo el apoyo, la amistad y cada momento compartido. A mis amigos que me apoyaron durante el camino para cumplir este sueño.

LABORATORIO Y DROGUERIA DONOVAN WERKE A.G.S.A.

Por ser parte de mi formación como profesional especialmente Licda. Claudia Sigui y Licda. Silvia Cervantes por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por ser mi alma mater y ser la base de mi formación profesional.

RESUMEN EJECUTIVO

La validación de métodos analíticos dentro de la industria farmacéutica es un aspecto esencial para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, con el objetivo de demostrar que los métodos analíticos son adecuados para su propósito y porque actualmente es un requerimiento regulatorio aplicable a la industria farmacéutica. Para validar un método analítico se requiere un entorno de trabajo que asegure la integridad de los resultados que se obtienen, para ello se debe trabajar conforme a las buenas prácticas de laboratorio.

La guía de validación de procedimientos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tiene como objetivo servir de instrucción al personal colaborador en la validación de métodos analíticos de un laboratorio farmacéutico. Su diseño responde a las necesidades del personal para validar métodos en el marco de las actividades de garantía de calidad.

La metodología utilizada para la elaboración de la guía se basó en la investigación documental de reglamentos y/o normas las cuales establecen los requerimientos para la validación estadística de las metodologías analíticas, así como análisis de datos los cuales por medio de fichas de fórmulas estadísticas permiten determinar los parámetros de validación. Posterior a la revisión documental se aplicó la técnica de observación, con el fin de recopilar la información que posee el laboratorio farmacéutico, y se procedió a elaborar la guía.

La guía elaborada describe el proceso de validación de métodos analíticos y los aspectos estadísticos requeridos por normativa, con un alcance específico al análisis de jarabes mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El contenido de la guía incluye: términos y definiciones, generalidades de la validación de métodos, un ejemplo aplicado y la esquematización de todo el proceso; esto con el fin de facilitar el uso por parte del personal del laboratorio. La implementación de esta guía en el laboratorio permitirá asegurar la confiabilidad de los datos de análisis y estandarizar el procedimiento analítico, logrando alcanzar reproducibilidad y repetibilidad de métodos

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
A. Validación	3
1. Validación de métodos analíticos	3
1.1 Exactitud	4
1.2 Precisión	5
1.3 Especificidad	6
1.4 Límite de detección	6
1.5 Límite de cuantificación	6
1.6 Linealidad e Intervalo.....	6
1.7 Robustez.....	7
1.8 Aptitud del sistema.....	8
2. Datos requeridos para la validación	8
B. Cromatografía	10
1. Cromatografía líquida de alta resolución	10
1.1. Clasificación de la cromatografía líquida	10
C. Formas farmacéuticas líquidas orales.....	15
1. Jarabe.....	15
1.1. Clasificación	16
1.1.1 Jarabes aromáticos o no medicamentosos.....	16
1.1.2. Jarabes medicamentosos	17
1.1.3. Jarabes sin azúcar	17
2. Formulación.....	17
2.1. Preparación de jarabes.....	17
3. Ensayos de jarabes.....	19
3.1. Determinación de densidad	19
3.2. Punto de ebullición	19
3.3. Viscosidad.....	19
3.4. Sacarosa y azúcar invertido.....	19

3.5. Adulterantes	19
3.6. Ensayos generales de las formas líquidas orales	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. OBJETIVOS.....	21
V. METODOLOGÍA	22
VI. RESULTADOS	23
1. Introducción.....	26
2. Alcance	26
3. Términos y definiciones	26
4. Generalidades	27
4.1 Especificidad.....	33
4.2 Linealidad	35
4.2.1 Linealidad del sistema	35
4.2.2 Linealidad del método.....	38
4.3 Exactitud del método.....	41
4.4 Precisión del sistema	43
4.4.1 Repetibilidad del sistema:	43
4.5 Precisión del método.....	44
4.5.1 Repetibilidad del método:.....	44
4.5.2 Precisión Intermedia del método:	46
5. Elaboración del Informe Final de Validación	48
6. Elaboración de protocolos para validación de métodos analíticos fisicoquímicos	52
7. Esquema de procedimiento de validación de un método analítico de jarabes:	56
8. Referencias	57
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. RECOMENDACIONES.....	61
X. REFERENCIAS.....	62
XI. ANEXOS	65

I. INTRODUCCIÓN

La validación de métodos de análisis en la industria farmacéutica es un elemento esencial dentro del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, ya que permite demostrar que el método es idóneo para el uso previsto. La validación proporciona seguridad de la confiabilidad de los métodos, por estudios y pruebas de laboratorio, evidenciando que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

De acuerdo a las normativas nacionales en el reglamento técnico centroamericano RTCA 11.03.39:06, es necesario que todos los métodos analíticos que se emplean en la industria farmacéutica estén validados.

La validación analítica asegura que el método proporciona resultados con consistencia, precisión y exactitud y a partir de ello los resultados sean confiables, se fundamenta en resultados tanto de laboratorio, como en los parámetros de desempeño analítico del método, por medio de datos estadísticos. Se procedió a elaborar una guía para orientar al personal colaborador y tener claridad previo a la validación y cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación, así como los pasos previos que conlleva la realización del análisis.

En la guía se describió y esquematizó el proceso aplicable a la evaluación de parámetros de desempeño de validación de métodos analíticos de jarabes en un laboratorio farmacéutico por cromatografía líquida de alta resolución, así como, la descripción y ejemplificación de los aspectos estadísticos requeridos por normativa. La metodología utilizada fue la investigación documental sobre los parámetros requeridos para la validación estadística de metodologías analíticas basados en reglamentos y normas establecidas. Se realizó un análisis de datos, en el cual se elaboraron fichas de fórmulas estadísticas, en un ejemplo aplicado, para orientar en los cálculos estadísticos de utilidad para validar los resultados de los ensayos analíticos. La información se recopiló por medio de la técnica de observación y revisión documental necesaria para elaborar la guía.

De acuerdo a lo recopilado se llevó a cabo la elaboración de la guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico, la cual consta de una descripción del proceso de validación de

métodos analíticos y los aspectos estadísticos requeridos por normativa, se explica con un ejemplo de validación de un procedimiento de análisis de un jarabe, realizado dentro del laboratorio, con el objetivo de orientar al personal colaborador en el proceso de validación de un método analítico de jarabes y se incluye dentro de la guía un esquema del proceso de validación de métodos analíticos.

II. MARCO TEÓRICO

A. Validación

La definición de validación según la norma ISO 9001:2015 es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (ISO Tools Excellence, 2017).

La validación dentro de la garantía de calidad en la industria farmacéutica es un aspecto fundamental puesto que, como cumplimiento de norma se debe contar con métodos analíticos de análisis químico que deben ser evaluados y sometidos a prueba para garantizar y asegurar que los resultados que producen son válidos y coherentes, dicho en otras palabras, deben ser validados.

El método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así, que el laboratorio domina el método y lo usa correctamente. Por ello es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea, de tal manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable (Instituto de Salud Pública, 2010).

1. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es un proceso que sirve para establecer pruebas documentales que demuestran científicamente que el método analítico cumple con las características de desempeño adecuadas según los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser

confiable para ser utilizado con un propósito definido (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002).

Para la determinación de algún tipo específico de muestra es común encontrar varios métodos analíticos disponibles, de diversos orígenes, para ello existen muchas entidades nacionales e internacionales con publicaciones para cada campo analítico y sus aplicaciones, es el laboratorio, el que debe evaluar y seleccionar el que mejor se adecúe a sus necesidades y recursos (Oficina de Acreditación Guatemalteca, 2007), independiente del método seleccionado, el mismo debe ser validado como parte de su desarrollo y como parte de la implementación del método, el laboratorio debe verificar el desempeño contra lo especificado en la validación (Oficina de Acreditación Guatemalteca, 2007).

Básicamente el objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. La validación o la verificación de un método analítico se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las cuales se obtienen datos sobre linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, etc. El proceso debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo y una vez realizada la validación o verificación estos métodos deben ser autorizados en el laboratorio (Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, 2010). Los parámetros de desempeño analítico se describen de la siguiente manera:

1.1 Exactitud

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. Debe establecerse en todo su intervalo (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración. La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito o porcentaje de recuperación, en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las

reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente este comprendido dentro de un intervalo alrededor de 1.0; o alternativamente, que el valor de la pendiente sea cercano a 1.0 (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). En ambos casos, el intervalo o la definición de cercanía deberían especificarse en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad y del producto. No es aceptable establecer un criterio de aceptación basado en la falta de significancia estadística para la hipótesis nula de que la pendiente es 1.0. La exactitud de los métodos de propiedades físicas se puede evaluar a través del análisis de materiales de referencia estándar o, alternativamente, se puede considerar la aptitud de las metodologías mencionadas anteriormente para cada caso en particular (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

1.2 Precisión

En el contexto de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios. La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). Los documentos de la ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba.

1.3 Especificidad

Según la ICH la especificidad es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, por ejemplo, impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

1.4 Límite de detección

Es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. Usualmente se expresa como concentración de analito, por ejemplo, porcentaje, partes por billón, etc., en la muestra.

1.5 Límite de cuantificación

Según la definición proporcionada por la Farmacopea de los Estados Unidos, el límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, estos pueden ser impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. Se expresa habitualmente como concentración de analito en la muestra (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

1.6 Linealidad e Intervalo

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. La linealidad es la relación lineal entre la

concentración y/o la medida. Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada o el recíproco, aunque otras transformaciones son aceptables, si no es posible lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal, el objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito, incluyendo estos niveles, en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento a validar. El intervalo se expresa usualmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico y por medio de datos estadísticos adecuados. Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar entre los datos estadísticos el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de cuadrados residuales. El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

1.7 Robustez

Es una medida de la capacidad que posee un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. Esta puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

1.8 Aptitud del sistema

Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema, esto para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa, puesto que si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). Las típicas variaciones en un análisis por cromatografía de líquidos son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas, las variaciones de pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. Básicamente las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

2. Datos requeridos para la validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde análisis muy rigurosos hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Ante esta amplia gama de análisis, existen diferentes procedimientos de prueba que requieren diferentes esquemas de validación (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017). Dentro de las pruebas más habituales se encuentran las siguientes:

- Categoría I

Son procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

- Categoría II

Son procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos

procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

- Categoría III

Son procedimientos analíticos para la determinación de caracteres de desempeño, por ejemplo disoluciones, liberación de fármacos, etc (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

- Categoría IV

Pruebas de identificación:

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica, la cual se indica en la tabla, con los datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías.

Tabla No. 1 Datos requeridos para la Validación

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de Detección	No	No	Si	*	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

(Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

La validez de un procedimiento analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la conclusión de dichos estudios, constituye un requisito básico para determinar si un procedimiento es adecuado

para sus aplicaciones previstas. Los procedimientos farmacopeicos oficiales también están sujetos a reglamentos que requieren la demostración de aptitud en las condiciones reales de uso. Cualquier propuesta de procedimientos farmacopeicos analíticos nuevos o revisados debe ir acompañada de la documentación adecuada (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

B. Cromatografía

Según la USP 40 las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. El término cromatografía de líquidos, en algunos compendios, es un sinónimo de cromatografía de alta presión y de cromatografía de alta resolución.

1. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución o eficacia se encuentra dentro de la cromatografía de elución, en la cual, un líquido o fase móvil circula en íntimo contacto con un sólido y otro líquido inmiscible o fase estacionaria. Al introducir una mezcla de sustancias o analitos en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases (Universidad Central de Venezuela, 2008). Por lo tanto, después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

1.1. Clasificación de la cromatografía líquida

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma común y habitual de clasificarla es en base a la naturaleza de la fase estacionaria, puesto que esta le impone fundamentalmente el mecanismo de separación (Universidad Central de Venezuela, 2008), se pueden enumerar los siguientes tipos de técnicas:

- ✓ Cromatografía de adsorción (líquido-sólido).
La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción (Universidad Central de Venezuela, 2008).
- ✓ Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente).
La separación se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Universidad Central de Venezuela, 2008).
- ✓ Cromatografía de intercambio iónico.
Se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil (Universidad Central de Venezuela, 2008).
- ✓ Cromatografía de exclusión molecular.
La fase estacionaria, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño (Universidad Central de Venezuela, 2008).

Básicamente el mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando el tipo de interacciones que se producen y cuál de ellas es la predominante, por tal razón, existe otro tipo de división de los dos primeros tipos de cromatografía, dependiendo de la polaridad de la fase estacionaria:

- ✓ Cromatografía de fase normal:
La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones producidas con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (Ciano, amino, etc.) (Universidad Central de Venezuela, 2008).
- ✓ Cromatografía de fase reversa (inversa)
La fase estacionaria tiene una naturaleza (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo) (Universidad Central de Venezuela, 2008).

Los métodos cromatográficos logran la separación de los diferentes componentes en las muestras a través del paso de una muestra por la fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la muestra posee propiedades particulares que permiten la interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y la fase móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular y si el flujo, las características de la fase estacionaria y móvil, así como la longitud de la columna son las adecuadas, se logra la separación completa de todos los componentes de la muestra. Básicamente el objetivo principal de la cromatografía es lograr la separación de todos los componentes en una muestra, por lo que es necesario jugar con una serie de factores cromatográficos, por ello es necesario conocer cómo están relacionados los diferentes factores experimentales con las ecuaciones cromatográficas (Universidad Central de Venezuela, 2008).

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivos de mezcla de eluyentes).

Dispositivos de inyección

Conducciones y conexiones

Detector y registrador

Columna

Inyectores automáticos

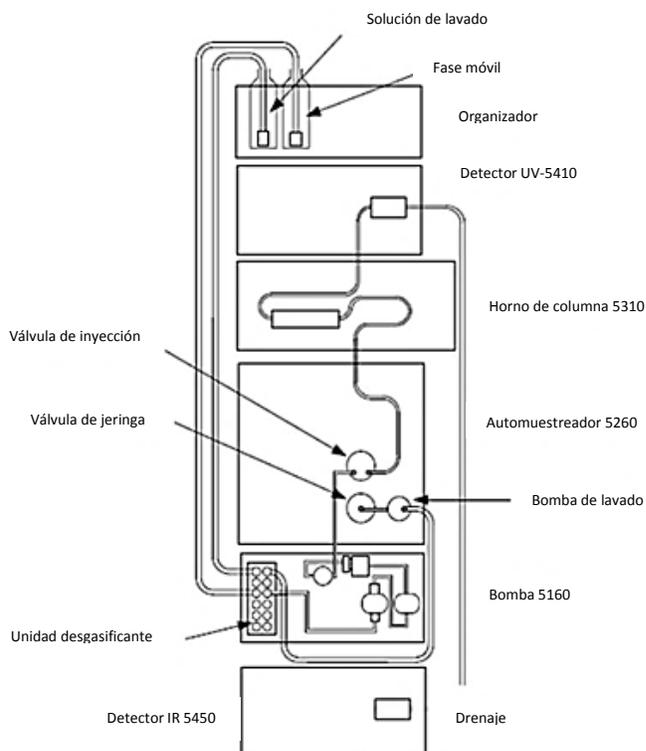
Colectores de fracciones

Hornos

Sistemas de tratamiento de datos

Entre otros.

Figura No. 1 Componentes de un HPLC



(González, 2017)

a) Sistema de suministro de fase móvil

Este sistema se encuentra incluido en cada HPLC, el cual brinda la presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno muy compacto, es el responsable de una importante sobrepresión.

En HPLC, para una fase estacionaria concreta, la naturaleza de la fase móvil es el factor clave en la separación (Universidad Central de Venezuela, 2008). Existen dos modalidades:

Isocrática: en esta modalidad la composición de la fase móvil permanece constante durante la separación.

En gradiente: la composición se va modificando durante la separación, para ello el cromatógrafo debe disponer de un sistema de programación de gradiente, que permite la mezcla reproducible de disolventes en distintas proporciones durante la separación cromatográfica (Universidad Central de Venezuela, 2008).

b) Sistema de inyección de muestra

El volumen de inyección debe ser preciso y hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de fase móvil establecido en la columna y el detector. La cantidad de volumen empleado usualmente es pequeño, unos pocos microlitros, lo que se traduce en muchos casos como el factor limitante del método es la reproducibilidad con que puede introducirse la muestra en la columna (Universidad Central de Venezuela, 2008) esto porque existen cromatógrafos en los que se acostumbra a inyectar las muestras con jeringas en un orificio de elastómero, aspecto que lo hace no muy reproducible y está limitado a presiones menos de 1500 psi. El método que da mejores resultados es el que utiliza asas de muestreo, por lo general, estos ya vienen con los cromatógrafos modernos y traen varias asas intercambiables con capacidades de 5 a 500 μL , por lo que, la inyección con un asa de este tipo es reproducible hasta unos cuantos décimos de porcentaje relativo (Parajón, Parajón , & Peralta, 2008)

c) Columna cromatográfica

Este término incluye columnas de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro interno de la columna afectan la separación, y por lo tanto, las dimensiones típicas de la columna se incluyen en la monografía individual. Muchas veces para alargar la vida de la columna se incorporan precolumnas con el objetivo de retener impurezas de la muestra que podrían perjudicar la columna cromatográfica (Universidad Central de Venezuela, 2008).

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias comúnmente usadas son sílice modificada o las microperlas de polímeros. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

d) Detector

Un detector ideal debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura el cromatograma. En caso se utilice gradiente debe ser insensible a los

cambios de composición de la fase móvil. La celda de flujo del detector debe tener un volumen mínimo para no provocar ensanchamiento de las bandas (Universidad Central de Venezuela, 2008).

C. Formas farmacéuticas líquidas orales

La Real Farmacopea Española define las preparaciones líquidas para uso oral como disoluciones, emulsiones o suspensiones que contienen uno o más principios activos en un vehículo adecuado. Dentro de este grupo de preparaciones, las principales que se elaboran son:

- Solución: es una mezcla, física y químicamente homogénea, puede contener dos o más sustancias en la que el solvente es líquido y el soluto es un sólido o líquido. El producto final es una sola fase y tiene que ser clara y transparente (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).
- Suspensión: es un sistema disperso heterogéneo constituido por partículas de un sólido insoluble o fase dispersa de un tamaño mayor de 0.1 μm en un líquido o medio dispersante. Presenta un aspecto turbio, percibiéndose a simple vista la presencia de partículas del soluto (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).
- Jarabe: es una preparación acuosa de uso oral que se caracteriza por tener un sabor dulce y de consistencia viscosa, puede contener sacarosa a una concentración de al menos 45% (m/m). El sabor dulce se puede obtener utilizando agentes edulcorantes o polioles (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).
- Elíxir: es una solución constituida por agua, alcohol y generalmente azúcar, que en la actualidad está en desuso (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

1. Jarabe

La farmacopea europea define un jarabe como una preparación acuosa que se caracteriza por un sabor dulce y una consistencia viscosa. La farmacopea americana define un jarabe como una solución oral con alta concentración de azúcares y otros azúcares. En otras palabras los jarabes son soluciones concentradas de azúcares, como sacarosa, en agua o en otro líquido acuoso. Si se utiliza agua purificada solamente para

preparar la solución de sacarosa, la preparación se conoce con los nombres de jarabe o jarabe simple. Además de la sacarosa pueden agregarse otros polioles, como la glicerina o el sorbitol, para retardar la cristalización de la sacarosa o aumentar la solubilidad de los componentes agregados (Gennaro, 2003). Usualmente el alcohol se adiciona como conservante y también como solvente de las esencias aromatizantes; la incorporación de agentes antimicrobianos puede aumentar la resistencia al ataque microbiano. Si la preparación acuosa contiene alguna sustancia medicinal agregada, el jarabe se designa con el nombre de jarabe medicado. Los jarabes son muy eficaces para enmascarar el sabor de las drogas amargas o saladas. Los jarabes son útiles para preparar formas farmacéuticas líquidas orales, no sólo a partir de la droga pura sino también de inyectables, cápsulas o comprimidos si no se dispone de la droga pura. Por una parte, si la droga y todos los excipientes de la preparación son hidrosolubles, la preparación de un jarabe dará lugar a una solución. Por otra parte, si la preparación que se utiliza contiene componentes insolubles en agua, la preparación dará lugar a una suspensión (Gennaro, 2003).

1.1. Clasificación

1.1.1 Jarabes aromáticos o no medicamentosos

Estas son soluciones saturadas de un azúcar que pueden contener sustancias aromáticas o de sabor agradable y colorantes. Estas soluciones son el punto de partida de jarabes medicamentosos y se utilizan como vehículos de preparaciones extemporáneas (polvo o granulado para jarabes) o como integrante de otras formas farmacéuticas (corregir sabor con el aromatizante, edulcorante, espesante, aglutinante, etc.) (Gennaro, 2003).

El jarabe simple está compuesto por sacarosa 65% y agua purificada en cantidad suficiente. Un jarabe no necesita conservante antimicrobiano aunque se suelen añadir porque también evitan que el azúcar precipite si está en alta concentración. Los jarabes de zumos son jarabes clásicos utilizados principalmente como vehículos aromatizados o como excipientes o correctores de sabor. El jarabe provee por la cantidad de azúcares, acción conservante, porque al estar en concentraciones a saturación, la actividad del agua es muy baja e impide el crecimiento microbiano (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

1.1.2. Jarabes medicamentosos

Son jarabes aromáticos que contienen uno o más fármacos y que se emplean en terapéutica por la acción característica de estos fármacos. Usualmente estos jarabes tienen incorporados HCl para ionizar los compuestos y la glicerina para ayudar a disolver (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

1.1.3. Jarabes sin azúcar

Se sustituye el azúcar o sacarosa por polioles o edulcorantes artificiales como la sacarina con aspartamo, aspartamo con ciclamato sódico o mezclas de los tres que es una combinación más potente y utilizada. El aspartamo es un péptido de 2 aminoácidos y éstos pueden sufrir hidrólisis. Se utilizan cuando el fármaco es inestable en presencia de sacarosa, pacientes diabéticos y en jarabes destinados a dietas hipocalóricas (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

2. Formulación

- Principio activo
- Vehículos (Agua purificada o destilada (aunque no se suele destilar) excenta de calcio y CO₂).
- Azúcares (sacarosa, glucosa y polioles)
- Conservantes (ácido benzoico, etanol > 18%, parabenos)
- Cosolventes (EtOH, propilenglicol, glicerina)
- Modificadores de la solubilidad (Gluconato de calcio)
- Modificadores del pH
- Saborizantes (jarabe de zumos, vainilla)
- Color (siempre asociar el sabor con el color) (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

2.1. Preparación de jarabes

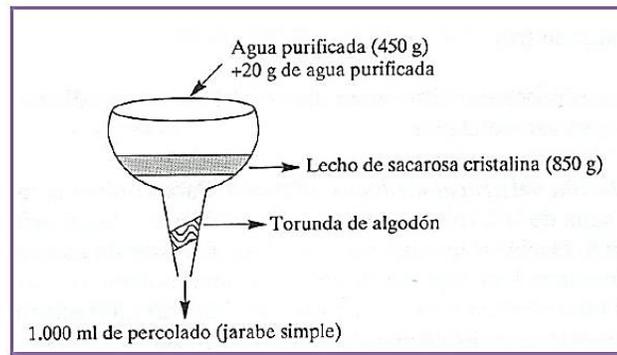
Existen dos posibilidades: método frío y método caliente.

- Método en frío: es un procedimiento más lento y puede cumplirse por prolongado contacto del azúcar con el agua destilada. Se utilizan si se quiere obtener un

jarabe incoloro. Dentro de los métodos para disolver el azúcar están: agitación, percolación, sacarolizador (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

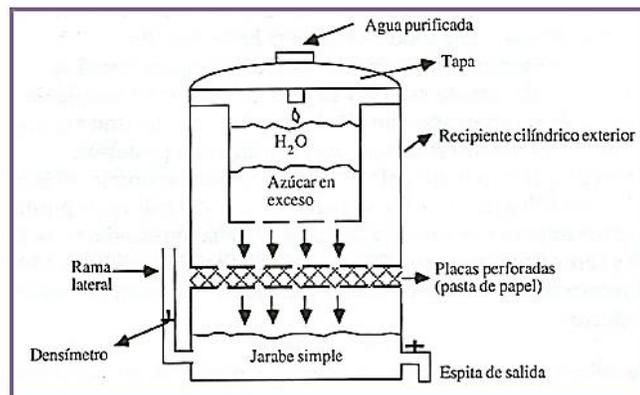
- Agitación: este método evita una viscosidad elevada, consiste en colocar agua en el envase y añadir lentamente el azúcar. Para elaborarlo a escala de laboratorio se utiliza un recipiente de tamaño mayor que el volumen de jarabe a preparar. Para elaborarlo en escala industrial se utilizan grandes tanques de acero inoxidable.
- Percolación: este método utiliza un percolador, el jarabe se obtiene en un tiempo corto y el producto es claro e incoloro.

Figura No. 2 Método de percolación



Vila, J. Tecnología farmacéutica. Vol. II. (1997).

- Sacarolizador: este sistema utilizado a nivel industrial permite obtener jarabe simple en frío sin agitación y de forma continua.
- **Figura No. 2 Método de percolación**



Vila, J. Tecnología farmacéutica. Vol. II. (1997).

- Método en caliente: son los más comunes, en este caso se requiere un control adecuado de la concentración para que se mantenga dentro de los límites exigidos. Facilitan la disolución del azúcar, es un procedimiento más rápido, es especialmente para jarabes cuyos componentes no se degradan ni volatilizan por calor. Dentro de sus desventajas se encuentra que se carameliza el azúcar e inversión de la sacarosa, esto quiere decir que la sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa. Se obtiene un jarabe más dulce y color más oscuro (Calvo, Esquisabel, Hernández, & Igartua, 2015).

3. Ensayos de jarabes

3.1. Determinación de densidad

Los jarabes poseen una densidad elevada. Para la determinación usualmente se utiliza el picnómetro que es un instrumento sencillo utilizado para determinar con precisión la densidad de líquidos. Su característica principal es la de mantener un volumen fijo al colocar diferentes líquidos en su interior. Esto nos sirve para comparar las densidades de dos líquidos pesando el picnómetro con cada líquido por separado y comparando sus masas (Harris, D., 2006).

3.2. Punto de ebullición

La elevación del punto de ebullición depende de la concentración.

3.3. Viscosidad

Es la constante físico-química más sensible para evaluar la concentración de sacarosa.

3.4. Sacarosa y azúcar invertido

Sacarosa: método de Fehling

Azúcar invertido: polarimetría a 20 °C en jarabe diluido (1:10), medir el grado de rotación de la luz polarizada.

3.5. Adulterantes

Sacarina, Almidón, Ácido salicílico, glucosa comercial.

3.6. Ensayos generales de las formas líquidas orales.

Ensayos fisicoquímicos como sabor, olor, color, entre otros.

III. JUSTIFICACIÓN

En un laboratorio farmacéutico la validación de los métodos analíticos es un aspecto importante de la garantía de calidad de los productos, porque asegura que los resultados entregados por los métodos son confiables. De igual manera existen directrices establecidas en el reglamento técnico centroamericano RTCA 11.03.39: 06. que deben ser aplicadas a todos los métodos analíticos no oficiales y oficiales con el objetivo de cumplir las normativas vigentes de buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio. Con la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es respaldar con fundamento estadístico que el método cumple y es adecuado para los fines previstos. La guía abordó la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución cuyo fin es orientar en la práctica al personal colaborador para validar los métodos analíticos.

Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación, es por ello que la guía es de utilidad para que el personal colaborador conozca los pasos previos a la realización del análisis. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así el laboratorio usuario que domina el método y lo usa correctamente.

IV. OBJETIVOS

General

Elaborar una guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico.

Específicos

1. Describir el proceso de validación de métodos analíticos y los aspectos estadísticos requeridos por normativa.
2. Ejemplificar un proceso de validación para orientar al personal colaborador en el proceso de validación de un método analítico de jarabes en un laboratorio farmacéutico.
3. Esquematizar el proceso para la validación de métodos analíticos de jarabes en un laboratorio farmacéutico.

V. METODOLOGÍA

Los pasos propuestos para la elaboración de la guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico fueron:

- 1. Investigación documental:** Es la base para la realización de la guía de validación, porque hace referencia a los parámetros para la validación estadística de metodologías analíticas basados en reglamentos y/o normas establecidas. Se determinó la secuencia de pruebas y análisis que se deben realizar para comprobar que los métodos cumplen con los propósitos para los cuales fueron diseñados.
- 2. Método de análisis de datos:** Se elaboraron fichas de fórmulas estadísticas, en un ejemplo aplicado, los cuales son de utilidad para validar los resultados de los ensayos analíticos.

Se recopiló por medio de la técnica de observación y revisión documental la información necesaria para elaborar la guía.

3. Elaboración de la guía:

Con los datos obtenidos de la investigación documental y el análisis de datos del ejemplo aplicado, se procedió a la elaboración de la guía, la cual está conformada de las siguientes secciones:

- Introducción
- Objetivos
- Alcance
- Términos y definiciones
- Generalidades
- Metodologías farmacopeicas y no farmacopeicas
- Validación de metodologías
- Características de procedimientos analíticos
 - Interpretación y ejemplificación de resultados
- Informe final de validación

VI. RESULTADOS

Dentro de los resultados obtenidos se detalla la guía elaborada:

GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANÁLITICOS DE JARABES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN UN LABORATORIO FARMACÉUTICO.

GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE JARABES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN UN LABORATORIO FARMACÉUTICO



Índice

1. Introducción.....	26
2. Alcance.....	26
3. Términos y definiciones	26
4. Generalidades	27
4.1 Especificidad.....	33
4.2 Linealidad	35
4.2.1 Linealidad del sistema.....	35
4.2.2 Linealidad del método.....	38
4.3 Exactitud del método.....	41
4.4 Precisión del sistema.....	43
4.4.1 Repetibilidad del sistema:	43
4.5 Precisión del método.....	44
4.5.1 Repetibilidad del método:.....	44
4.5.2 Precisión Intermedia del método:.....	46
5. Elaboración del Informe Final de Validación	48
6. Elaboración de protocolos para validación de métodos analíticos fisicoquímicos	52
7. Esquema de procedimiento de validación de un método analítico de jarabes.....	56
8. Referencias.....	57

1. Introducción

El presente documento es una guía para evaluar características a considerar durante la validación de los procedimientos analíticos aplicados a jarabes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La finalidad de la guía es servir de instrucción al personal colaborador en la validación de métodos analíticos aplicados a jarabes por cromatografía líquida de alta resolución. Su diseño responde a necesidades del personal para validar métodos en el marco de las actividades de garantía de calidad.

Los procedimientos ejemplificados en la guía constituyen una síntesis de las actividades de análisis por parte de los analistas en el laboratorio. Actualmente, muchas organizaciones profesionales han elaborado directrices para la validación de métodos, que se han tomado en cuenta para elaborar la presente guía.

2. Alcance

Aplica en la evaluación de parámetros de desempeño de validación de métodos analíticos fisicoquímicos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución.

3. Términos y definiciones

Exactitud: Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el método y el valor verdadero.

Precisión: Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen tres formas de determinación: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Especificidad: Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de

degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra.

Límite de Detección: Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

Límite de Cuantificación: Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de impurezas y productos de degradación.

Linealidad: Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

Intervalo: Amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe.

Robustez: Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer no afectado, por pequeños pero deliberadas variaciones en los parámetros indicados. Provee una indicación de su aptitud durante su uso normal.

4. Generalidades

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es adecuado para el propósito previsto. En una validación el objetivo del procedimiento analítico debe estar claramente entendido, puesto que especificará las características de validación que deben evaluarse. Las características de validación que usualmente deben considerarse son las siguientes:

Exactitud
Precisión
Repetibilidad
Precisión intermedia
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Linealidad e intervalo

La validación de métodos analíticos en garantía de calidad y las buenas prácticas de laboratorio aseguran que los resultados sean veraces y coherentes con el objetivo previsto. Cada método nuevo que se introduzca en un laboratorio debe estar documentado y todo analista que los utilice debe tener una formación adecuada y demostrar su competencia en la práctica.

El procedimiento analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Debería describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esto puede incluir, pero no se limita a: la muestra, el estándar de referencia y las preparaciones de reactivos, el uso del equipo, la generación de la curva de calibración, el uso de fórmulas para el cálculo, etc.

Los procedimientos con referencia de proveedor han de respetarse lo máximo posible, caso contrario, si se realizan cambios importantes, se necesitará una validación completa.

Cabe mencionar que existen excepciones en las cuales la revalidación puede ser necesaria, como por ejemplo:

- Cambio en la síntesis de la sustancia fármaco
- Cambio en la composición del producto terminado
- Cambios en el procedimiento analítico

El grado de revalidación requerido depende de la naturaleza del cambio, ciertas modificaciones pueden requerir nuevamente una validación. Si un método se modifica o se aplica en una situación nueva este se debe revalidar o realizar una verificación, según el alcance de la modificación y el carácter de la nueva situación, por ejemplo, se necesitará verificación si se utiliza una columna cromatográfica de una dimensión diferente, pero si la modificación es pequeña, no se necesitará realizar ninguna medida, por ejemplo, si se sustituye una columna cromatográfica por otra del mismo tipo. A

manera de ejemplo se establecen en la siguiente tabla los cambios, su impacto y el parámetro de desempeño a revalidar.

Tabla No. 1: Aspectos para revalidar:

CAMBIO	IMPACTA	PARAMÉTRO A REVALIDAR
Dispositivo de medición del instrumento de medición	Variación en sistema de medición	Precisión del sistema Adecuabilidad o especificidad
Concentración de la solución de referencia	Exactitud del método	Linealidad del sistema y exactitud del método
Formulación del producto	Exactitud del método	Exactitud y Repetibilidad del método. Linealidad del método. Especificidad.
Equipos	Variación del método	Tolerancia
Proveedor de columnas	Variación del método	Tolerancia

Referencia: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002)

La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, linealidad, etc. El proceso que ha de seguirse debe estar documentado y para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Al estar validados o verificados los métodos, su utilización en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable. Luego de ser aprobados, es fundamental que se respeten estrictamente todos los procedimientos, en caso, se introduzcan variaciones, debe dejarse constancia documentada del hecho, si el cambio o variación es de significancia importante será necesario volver a validar las nuevas condiciones del método.

Una determinación analítica con métodos instrumentales puede dividirse en dos componentes principales:

1. Sistema: incluye el instrumento, estándar y material volumétrico.
2. Método: analistas, muestras y variaciones realizadas al sistema si se utiliza más de un instrumento.

1. Etapas preliminares

Tabla No. 2: Etapas preliminares

Etapa	Actividad
Área de Investigación y Desarrollo	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Identificación de requisitos 2. Elegir el método de análisis el cual dependerá de: disponibilidad de equipos, instalaciones, conocimiento del personal, disposiciones reglamentarias. 3. Desarrollo del método 	<p>Establecer el objetivo final.</p> <p>Búsqueda bibliográfica sobre algún método actual estandarizado o identificación de un método similar, recomendación de proveedores u otra organización competente.</p> <p>Evaluación preliminar del método para establecer si puede cumplir los requisitos.</p>
Área de Validaciones Analíticas	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Validación de estándar 2. Elaboración de placebo 3. Identificación del método a validar 4. Preparar la documentación de la validación (método y protocolo). 5. Redactar las instrucciones para los analistas. 	<p>Trazado de estándar contra estándar USP o material de referencia certificado.</p> <p>Preparación y elaboración de placebo en base a master de producción o formulación desarrollada por investigación y desarrollo.</p> <p>Identificación de los requisitos que conlleva la validación del método revisión de reactivos, estándar, materias primas, productos, disponibilidad de equipos, cristalería, etc. Determinación de la forma de validación del producto o placebo adicionado.</p> <p>Elaboración de protocolo de validación en base a los requisitos del método.</p> <p>Resolución de dudas de trabajo, explicación de objetivos, entre otros.</p>

<p>6. Desarrollo de análisis del método.</p> <p>7. Realizar controles de calidad para vigilar cumplimiento de los criterios de aceptación del método.</p> <p>8. Examinar método y de ser necesario proponer cambios.</p> <p>9. Elaboración de datos y cálculos estadísticos.</p> <p>10. Elaboración de informe de validación</p> <p>11. Autorización de informe de validación.</p>	<p>Evaluación del método para establecer si puede cumplir los requisitos.</p>
--	---

Referencia: Autoría propia

2. Validación de metodologías

Metodologías farmacopeicas

Son metodologías analíticas desarrolladas por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos generalmente son aceptados por el sector técnico correspondientes.

Metodologías no farmacopeicas

Son metodologías analíticas desarrolladas por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.

3. Validación del método

Procedimiento:

1. Según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 la validación de métodos analíticos aplica a todos los métodos analíticos no oficiales y oficiales utilizados para el control de calidad de medicamentos.
2. Para los métodos analíticos oficiales únicamente debe comprobarse la linealidad y precisión del sistema.
3. Los parámetros de desempeño que pueden evaluarse para validar los métodos analíticos no oficiales son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo.

Para la validación de métodos analíticos, se debe proceder de la siguiente forma:

1. Verificar que el método a validar se encuentre debidamente documentado.
2. Elaborar un Protocolo, el cual servirá de guía, para la preparación del placebo, muestras y análisis de las muestra.
3. Determinar la categoría del método analítico a validar según Tabla No.2 y los parámetros de desempeño que por categoría le corresponden.

Tabla No. 2 Parámetros de desempeño a evaluar en la metodología analítica para su validación, según categoría

Categoría de prueba	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
Parámetro de desempeño	Principio(s) activos (s)	Prueba de límite Cuantitativa	Prueba de límite Cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO
* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo					

Referencia: Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06

4. Considerar el detalle de aspectos como:
 - 4.1 Reactivos: Determinar los reactivos a utilizar, con el grado de pureza requerido, instrucciones de uso y vida media de utilización.
 - 4.2 Sistema de análisis adecuado: Debe confirmarse que el procedimiento analítico funcionará correctamente independientemente de las condiciones ambientales. Incluye algunas consideraciones como:

4.2.1. HPLC: Inyectar fase móvil, diluyente, evaluar factor de coleo (factor tailing), resolución requerida, número de platos teóricos.

4.3 Preparación del Estándar: Deben indicarse los detalles específicos para la preparación de todas las soluciones estándares y preparación de muestras poco comunes como por ejemplo impurezas.

4.4 Preparación de placebos:

Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el analito y luego se procede a enriquecer con estándar o muestra del activo. Para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

4. Parámetros para la validación

4.1 Especificidad

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y cuantificación de los analitos, puesto que mide la capacidad del método para identificar y/o cuantificar los analitos presentes en una muestra matriz en las condiciones exigidas por el método. La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método y que éste distingue los efectos de las impurezas que podrían estar presentes en la matriz.

En base a la experiencia en el análisis de la muestra, se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras de producto y cuando proceda sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Para métodos cromatográficos evaluar la respuesta del estándar que debe leerse por lo menos siete veces, la fase móvil una lectura, diluyente una lectura, medio de disolución una lectura y placebos realizar tres lecturas. Si el método es oficial, este parámetro no es requerido.

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de matriz a la misma concentración relativa. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones.

Fórmulas para determinación de porcentajes y especificaciones

Cálculos

Concentración estándar Acetaminofén en mg/mL	=	$\frac{\text{mg pesados estandar Acetaminofén}}{\text{volumen (mL) disolución}} \times \frac{\% \text{ Potencia est. Acetaminofén B.H.}}{100\%}$
--	---	--

g Acetaminofén real adicionada	=	$\frac{\text{(g) adicionados de producto}}{\text{G.E. (g)}} \times \frac{1 \text{ mL}}{\text{mL (dosis)}} \times \frac{\text{mg de Acetaminofén}}{1000 \text{ mg}}$
--------------------------------	---	---

g Acetaminofén recuperado	=	$\frac{\text{Área muestra}}{\text{Área promedio del std}} \times \frac{\text{Concentración estándar mg/mL}}{1000 \text{ mg}} \times \text{vol. (mL) disolución}$
---------------------------	---	--

Porcentaje de recuperación de Acetaminofén	=	$\frac{\text{g de Acetaminofén recuperado}}{\text{g de Acetaminofén adicionados}} \times 100\%$
--	---	---

Valores Estándar	
Peso estándar	45.0 mg
Potencia estándar	99.220 %BH
Lote estándar	XDY-342
Fecha de vencimiento	01/09/2020
Concentración estándar	0.446490 mg/mL

Valores Muestra	
Lote producto	JKL-234
Fecha de vencimiento	01/09/20
mg de Acetaminofén cuanti.	167.8024 mg/5 mL
Gravedad específica	1.1268 mg/mL

No.	Área Estándar
1	3911155
2	3910156
3	3923789
4	3925644
5	3912125
6	3924775
PROM	3917941
DSR	0.191247

Para los cálculos se utilizan las siguientes fórmulas:

Para los estándares evaluar el promedio y la desviación estándar, en base a las siguientes formulas:

Fórmula: Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1} \quad \bar{x}_1 = \frac{\sum \text{suma áreas}}{\text{No. total de áreas}}$$

Fórmula: Desviación Estándar

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

CÁLCULOS DE ESPECIFICIDAD												
Fila No.	Porcentaje Acetaminofén	Área muestras	Peso de Acetaminofén real adicionado (g)	X		Y			Y1		s	s²
				(g) Acetaminofén real Adicionado	(g) Acetaminofén recuperado	XY	X²	Y²	% Recuperación Acetaminofén	Y#		
1	Placebo 1	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.000	0.000000	0.00000000	0.00000000
2	Placebo 2	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.000	0.000000			
3	Placebo 3	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.000	0.000000			
---	Diluyente	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.000	0.000000	0.00000000	0.00000000
---	Fase móvil	0	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.000	0.000000	0.00000000	0.00000000

Para la especificidad calcular el porcentaje de recuperación de placebos, fase móvil y diluyente en base a la siguiente fórmula:

Fórmula: Porcentaje de recuperación

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada mx } 100\%} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{0.00000000 \text{ g}}{0.45 \text{ g}} \times 100\%$$

Criterios de Aceptación:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

La matriz no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

4.2 Linealidad

4.2.1 Linealidad del sistema

Metodología:

1. Preparar por dilución o por pesada y de forma independiente por lo menos 5 niveles de concentración de estándar respecto a la concentración de trabajo o la especificación de la prueba. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.
2. El intervalo debe elegirse con valor medio o central al 100% dentro de las opciones se encuentran 50% - 150% u 80% - 120%.
3. Debe de leerse por lo menos 3 veces cada concentración o nivel para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema.
4. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición.

CÁLCULOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

Fila	%	Peso muestra (mg)	X	Y	XY	X ²	Y ²	F (y/x)	F (y/x)prom	s	s ²
			Concentración (mg/mL)	Área							
1	80	36.0	0.35719	3006438	1073875.602096	0.12758612	9038669447844	8416868.24	8468469.81	46161.59048	2130892435
2			0.35719	3038218	1085227.163856	0.12758612	9230768615524	8505840.00			
3			0.35719	3029953	1082274.971976	0.12758612	9180615182209	8482701.18			
4	90	40.5	0.40184	3474216	1396082.431656	0.16147619	12070176814656	8645747.95	8656864.28	115037.1814	13233553111
5			0.40184	3434862	1380264.362532	0.16147619	11798208261904	8547788.80			
6			0.40184	3526981	1417285.572021	0.16147619	12439594974361	8777056.10			
7	100	45.0	0.44649	3976344	1775397.832560	0.19935332	15811311606336	8905785.12	8917999.66	12974.66641	168341968.5
8			0.44649	3987879	1780548.094710	0.19935332	15903178918641	8931619.97			
9			0.44649	3981170	1777552.593300	0.19935332	15849714568900	8916593.88			
10	110	49.5	0.49114	4372638	2147573.054682	0.24121752	19119963079044	8903055.96	8907407.07	37327.82636	1393366621
11			0.49114	4394083	2158105.530537	0.24121752	19307965410889	8946719.77			
12			0.49114	4357604	2140189.270956	0.24121752	18988712620816	8872445.48			
13	120	54.0	0.53579	4812097	2578263.827436	0.28706878	23156277537409	8981345.23	9004143.43	33675.47215	1134037425
14			0.53579	4845036	2595912.148368	0.28706878	23474373841296	9042822.91			
15			0.53579	4815803	2580249.457764	0.28706878	23191958534809	8988262.15			
Σ			6.69735	59053312	26968801.914450	3.05010580	238561489414638	131964652.7			18060191560
Promedio			0.44649					8790976.848			
s								211711.3343			

Número de datos	15
Coefficiente de determinación (R ²)	0.99772833
Coefficiente de correlación (r)	0.99886352
Pendiente (b1)	10067362.4643
Ordenada al origen (bo)	-558089.2000

TEST DE LINEALIDAD PARA LA PENDIENTE

Sy/x	32582.40029691	
Sb1	133232.66381687	
ttab (0.05,n-2)	2.160	
texp	75.562	
IC(β1)	Límite superior	10355194.135
	Límite inferior	9779530.793

- Para el total de datos graficar la concentración del analito vs. la respuesta. Verificar los datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
- Realizar el análisis de regresión lineal con la totalidad de los datos.
- Calcular la ecuación lineal, el valor de la pendiente, la ordenada en el origen

Fórmula: Ecuación lineal

$$Y = mx + b$$

- El coeficiente de correlación

Fórmula: Coeficiente de correlación

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

$$r = \sqrt{\frac{(15(26968801.914450) - (6.69735)(59053312))^2}{(15(3.05010580) - (6.69735)^2)(15(238561489414638) - (59053312)^2)}}$$

- El coeficiente de determinación

Fórmula: Coeficiente de determinación



$$r^2 = \frac{(15(26968801.914450) - (6.69735)(59053312))^2}{(15(3.05010580) - (6.69735)^2)(15(238561489414638) - (59053312)^2)}$$

10. El intervalo de confianza para la pendiente

Fórmula: Intervalo de confianza para la pendiente

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

$$IC(\beta_1) = 10067362.4643 \pm (2.160)(133232.66381687)$$

11. La t de student experimental para la pendiente.

Fórmula: "t" student experimental para la pendiente (β_1) y para la ordenada al origen (β_0)

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b_1|}{S_{b_1}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{10067362.4643}{133232.66381686}$$

12. En la gráfica incluir la ecuación lineal, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

13. Calcular la prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran. IC (β_1) no debe incluir el cero.

$$G_{\text{exp}} = \frac{\sigma_{\text{mayor}}^2}{\sigma_{\text{promedio}}^2}$$

14. Calcular y graficar los residuos según el programa estadístico de elección.

Criterios:

Criterios de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98.

El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0.98 y 1.00.

El intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el cero.

La t de student experimental debe ser mayor que la tabulada, para el análisis de la pendiente.

La prueba de homogeneidad de Cochran experimental debe ser menor que la tabulada.

El gráfico de residuos debe demostrar que ningún residuo sea mayor que 3s.

4.2.2 Linealidad del método

Metodología

1. Preparar soluciones de muestra o placebo enriquecido a no menos de cinco niveles de concentración. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición, y que fueron verificadas previamente al llevar a cabo la determinación de la linealidad del sistema.
2. Realizar la evaluación en forma independiente por lo menos 3 veces cada nivel o concentración, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método.
3. Para cada evaluación graficar la respuesta de la medición contra la concentración del analito.

CÁLCULOS DEB26.061 LINEALIDAD E INTERVALO DEL MÉTODO														
Fila No.	Porcentaje Acetaminofén	Área muestras	Peso de Acetaminofén real adicionado (g)	X		Y		XY	X ²	Y ²	Y _r		s	s ²
				(g) Acetaminofén real Adicionado	(g) Acetaminofén recuperado	% Recuperación Acetaminofén	Y _r							
1	80%	3320429	1.2874	0.0383059606	0.0378397345	0.00144949	0.00146735	0.00143185	98.783	9758.05912279	0.135	0.018		
2	80%	3318874	1.2874	0.0383059606	0.0378220136	0.00144881	0.00146735	0.00143050	98.737	9748.92161141				
3	80%	3327372	1.2874	0.0383059606	0.0379188571	0.00145252	0.00146735	0.00143784	98.989	9798.90989066				
4	90%	3729933	1.4466	0.0430428791	0.0425064575	0.00182960	0.00185269	0.00180680	98.754	9752.30326917	0.138	0.019		
5	90%	3737606	1.4466	0.0430428791	0.0425938993	0.00183336	0.00185269	0.00181424	98.957	9792.46827500				
6	90%	3739889	1.4466	0.0430428791	0.0426198165	0.00183448	0.00185269	0.00181646	99.017	9804.43477594				
7	100%	4192232	1.6042	0.0477321904	0.0477748344	0.00228040	0.00227836	0.00228243	100.089	10017.87598614	0.209	0.044		
8	100%	4175547	1.6042	0.0477321904	0.0475846915	0.00227132	0.00227836	0.00228430	99.691	9938.29278718				
9	100%	4188490	1.6042	0.0477321904	0.0477321904	0.00227836	0.00227836	0.00227836	100.000	10000.00000000				
10	110%	4581915	1.7657	0.0525375444	0.052156766	0.00274328	0.00276019	0.00272648	99.387	9877.84667290	0.190	0.036		
11	110%	4585892	1.7657	0.0525375444	0.052609987	0.00274566	0.00276019	0.00273121	99.474	9895.00161681				
12	110%	4598685	1.7657	0.0525375444	0.0524067882	0.00275332	0.00276019	0.00274647	99.751	9950.28565821				
13	120%	4982797	1.9258	0.0573012420	0.0567841430	0.00325380	0.00328343	0.00322444	99.098	9820.33000232	0.053	0.003		
14	120%	4976389	1.9258	0.0573012420	0.0567339093	0.00325092	0.00328343	0.00321874	99.010	9802.96270142				
15	120%	4977923	1.9258	0.0573012420	0.0567285988	0.00325062	0.00328343	0.00321813	99.001	9801.12758294				
Σ				0.7167594493	0.7115227094	0.03467596	0.03492607	0.03442826	1488.7375164942	147738.81956368	0.120			
Promedio				0.0477838633	0.0474348473				99.249					

Número de datos	15
Coefficiente de determinación (R ²)	0.99914464
Coefficiente de correlación (r)	0.99957223
Pendiente (b1)	1.00017784
Ordenada al origen (b0)	-0.00035761
S _{v,x}	0.00021110
Desviación estándar (s) % recobro	0.45201370
Coefficiente de variación (CV) % recobro	0.45543324
Coefficiente de variación (CV _{v,x})	0.44178077

TEST DE LINEALIDAD PARA LA PENDIENTE

Sb1	0.00811646
ttab (0.05,n-2)	2.160
texp	123.228
IC(β1)	
Límite superior	1.01771238
Límite inferior	0.98264330

TEST DE LINEALIDAD PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

Sb0	0.00039165
ttab (0.05,n-2)	2.160
texp	0.913
IC(β0)	
Límite superior	0.00048849
Límite inferior	-0.00120372

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE COCHRAN

Gtab (0.05,n=3, k=5)	0.683
Gexp	0.365

4. Realizar el análisis de regresión lineal. Calcular:

5. La ecuación lineal

Fórmula: Ecuación lineal

$$Y = mx + b$$

6. El coeficiente de correlación

Fórmula: Coeficiente de correlación

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

$$r = \sqrt{\frac{(15(0.03467596) - (0.7167594493)(0.7115227094))^2}{(15(0.03492607) - (0.7167594493)^2)(15(0.03442826) - (0.7115227094)^2)}}$$

7. El coeficiente de determinación

Fórmula: Coeficiente de determinación



$$r^2 = \frac{(15(0.03467596) - (0.7167594493)(0.7115227094))^2}{(15(0.03492607) - (0.7167594493)^2)(15(0.03442826) - (0.7115227094)^2)}$$

8. El intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1)

Fórmula: Intervalo de confianza para la pendiente

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

$$IC(\beta_1) = 1.00017784 \pm (2.160)(0.00811646)$$

9. El intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$IC(\beta_0) = -0.00035761 \pm (2.160)(0.00039165)$$

10. "t" de student experimental para la pendiente (β_1) y para la ordenada al origen (β_0)

$$t_{\text{exp}} = \frac{b_1}{S_{b_1}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{1.00017784}{0.00811646}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{b_0}{S_{b_0}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{-0.00035761}{0.00039165}$$

11. El coeficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y} \times 100 \quad CV_{y/x} = \frac{0.00021110}{0.0474348473} \times 100$$

12. Calcular el porcentaje de recobro

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada mx } 100\%} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{0.0378397345 \text{ g}}{0.0383059606 \text{ g}} \times 100\% = 98.783\%$$

13. Calcular el promedio aritmético,
Fórmula: Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1} \quad \bar{x}_1 = \frac{\sum \text{suma áreas}}{\text{No. total de áreas}}$$

14. La desviación estándar
Fórmula: Desviación Estándar

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

15. El coeficiente de variación
Fórmula: Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{y} \times 100 \quad CV = \frac{0.45201370}{99.249} \times 100$$

16. La prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran.

$$G_{\text{exp}} = \frac{\sigma_{\text{mayor}}^2}{\sigma_{\text{promedio}}^2}$$

17. Elaborar la gráfica de residuos estudentizados.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe ser entre 0.98 y 1.00.

El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98.

El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero.

El intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad.

La t de student experimental debe ser mayor que la tabulada, para el análisis de la pendiente.

La t de student experimental debe ser menor que la tabulada, para el análisis de la ordenada al origen.

La prueba de homogeneidad de Cochran experimental debe ser menor que la tabulada.

El gráfico de residuos debe demostrar que ningún residuo es mayor que $3S$.

El intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro debe incluir el 100%. O bien que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo:

o 98 – 102%; si el método es cromatográfico o volumétrico.

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor a:

2% si el método es cromatográfico o volumétrico.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación: es calculado por medio del programa SCJ estadístico.

4.3 Exactitud del método

Metodología

1. Se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: con placebo o con muestra. En ambos casos se preparan soluciones de placebo o muestras a tres niveles de concentración diferentes, el valor sugerido por la ICH son de 80, 100 y 120% de la concentración normal de trabajo del método y preparar muestras por triplicado y de manera independiente. Evaluar las muestras por el método a validar. Actualmente se trabaja a cinco niveles de concentración para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método.
2. Para cada evaluación graficar la respuesta de la medición contra la concentración del analito.

CÁLCULO DE EXACTITUD DEL MÉTODO										
Fila No.	Porcentaje Acetaminofén	Área muestras	Peso teórico de Acetaminofén (g)	X		XY	X ²	Y ²	Y ₁	
				(g) Acetaminofén real Adicionado	(g) Acetaminofén recuperado				% Recuperación Acetaminofén	Y ²
1	80%	3394704	1.2874	0.0383059606	0.0386861752	0.001482	0.001467	0.001497	100.993	10199.499778
2	80%	3390501	1.2874	0.0383059606	0.0386382776	0.001480	0.001467	0.001493	100.868	10174.259310
3	80%	3388577	1.2874	0.0383059606	0.0386163516	0.001479	0.001467	0.001491	100.810	10162.715458
4	90%	3781779	1.4466	0.0430428791	0.0430972965	0.001855	0.001853	0.001857	100.126	10025.301178
5	90%	3777963	1.4466	0.0430428791	0.0430538092	0.001853	0.001853	0.001854	100.025	10005.079347
6	90%	3784663	1.4466	0.0430428791	0.0431301627	0.001856	0.001853	0.001860	100.203	10040.597679
7	100%	4173368	1.6042	0.0477321904	0.0475598596	0.002270	0.002278	0.002262	99.639	9927.922941
8	100%	4180151	1.6042	0.0477321904	0.0476371589	0.002274	0.002278	0.002269	99.801	9960.220992
9	100%	4187538	1.6042	0.0477321904	0.0477213414	0.002278	0.002278	0.002277	99.977	9995.454726
10	110%	4587911	1.7657	0.0525375444	0.0522840073	0.002747	0.002760	0.002734	99.517	9903.716347
11	110%	4579196	1.7657	0.0525375444	0.0521846908	0.002742	0.002760	0.002723	99.328	9866.126729
12	110%	4580745	1.7657	0.0525375444	0.0522023432	0.002743	0.002760	0.002725	99.362	9872.802667
13	120%	4988973	1.9258	0.0573012420	0.0568545250	0.003258	0.003283	0.003232	99.220	9844.688990
14	120%	4995987	1.9258	0.0573012420	0.0569344566	0.003262	0.003283	0.003242	99.360	9872.389756
15	120%	4991180	1.9258	0.0573012420	0.0568796760	0.003259	0.003283	0.003235	99.264	9853.401017
Σ				0.7167594493	0.7154801317	0.0348383061	0.0349260719	0.0347517541	1498.4945224363	149704.1769158390
Promedio				0.0477839633	0.0476986754				99.900	

Número de datos	15
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9999102796
Coefficiente de correlación (r)	0.9999551398
Pendiente (b1)	-0.9606263006
Ordenada al origen (bo)	0.0017961436
S _{yx}	0.0000656403
Desviación estándar (s) % recobro	0.6049217604
Coefficiente de variación (CV) % recobro	0.6054294006
Coefficiente de variación (CV) _{Y/X}	0.1376144781

Calcular:

1. La ecuación lineal resultante de la relación entre las concentraciones estimadas y las resultantes.

Fórmula: Ecuación lineal

$$Y = mx + b$$

2. El porcentaje de recuperación de cada placebo enriquecido o muestra.

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada} \times 100\%} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{0.0386861752 \text{ g}}{0.0383059606 \text{ g}} \times 100\% = 98.783\%$$

3. Desviación estándar

Fórmula: Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{15(149704.1769158390) - (1498.4945224363)^2}{15(15-1)}}$$

4. El coeficiente de variación

Fórmula: Coeficiente de variación

$$CV = \frac{s}{y} \times 100 \quad CV = \frac{0.6048217604}{99.900} \times 100$$

5. Intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro

$$b_1 = \frac{15(0.0348383061) - (0.7167594493)(0.7154801317)}{15(0.0349260719) - (0.7167594493)}$$

6. Elaborar una gráfica que represente las cantidades recuperadas contra las cantidades adicionadas.

Criterio de aceptación:

El intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro debe incluir el 100% o bien que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo:

98 – 102% o 97 – 103% si el método es cromatográfico.

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor a:

2% si el método es cromatográfico.

La pendiente de la ecuación lineal debe encontrarse en el intervalo de 0.9 a 1.1.

4.4 Precisión del sistema**4.4.1 Repetibilidad del sistema:**

PRECISIÓN DEL SISTEMA						
No.	Peso muestra (mg)	X Concentración (mg/mL)	Y Área	Y ²	F (y/x)	F ² (y/x)
1	45.0	0.446490000	4054160	16436213305600	9080068.983	8.24477E+13
2		0.446490000	4006959	16055720427681	8974353.289	8.0539E+13
3		0.446490000	4005655	16045271979025	8971432.731	8.04866E+13
4		0.446490000	4013683	16109651224489	8989412.977	8.08095E+13
5		0.446490000	4048365	16389259173225	9067089.968	8.22121E+13
6		0.446490000	4053105	16427660141025	9077706.108	8.24047E+13
7		0.446490000	4046808	16376654988864	9063602.768	8.21489E+13
8		0.446490000	4047454	16381883882116	9065049.609	8.21751E+13
9		0.446490000	4031419	16252339153561	9029136.151	8.15253E+13
10		0.446490000	4088565	16716363759225	9157125.580	8.38529E+13
	Σ				90474978.163	818601957333596
	Promedio				9047497.816	
	s				57532.574	
	%CV				0.636	

1. Preparar 10 muestras de estándar al 100% de la concentración de la muestra.
2. Evaluar por el método analítico.
3. Calcular:
4. El promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Fórmula: Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1} \quad \bar{x}_1 = \frac{\sum \text{suma áreas}}{\text{No. total de áreas}}$$

5. Desviación estándar

Fórmula: Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

6. Coeficiente de variación

Fórmula No.6 Coeficiente de Variación ó desviación estándar relativa.

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100 \quad CV = \frac{57532.574}{9047497816} \times 100$$

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual a:

2% para métodos cromatográficos.

4.5 Precisión del método

4.5.1 Repetibilidad del método:

1. Preparar 10 muestras al 100% de la concentración de la muestra.
2. Evaluar por el método analítico.

CÁLCULOS DE PRECISIÓN DEL MÉTODO									
REPETIBILIDAD									
Fila No.	Porcentaje Acetaminofén	Área muestras	Peso teórico de Acetaminofén (g)	X	Y	Y ²	F (y/x)	F ² (y/x)	
				(g) Acetaminofén real Adicionado	(g) Acetaminofén recuperado				
1	100%	4198596	1.6042	0.0477321904	0.0478473588	0.00228937	100.241	10048.314270	
2	100%	4152523	1.6042	0.0477321904	0.0473223091	0.00223940	99.141	9828.995300	
3	100%	4178304	1.6042	0.0477321904	0.0476161104	0.00226729	99.757	9951.421088	
4	100%	4195836	1.6042	0.0477321904	0.0478159057	0.00228636	100.175	10035.107840	
5	100%	4160686	1.6042	0.0477321904	0.0474153350	0.00224821	99.336	9867.676820	
6	100%	4187272	1.6042	0.0477321904	0.0477183101	0.00227704	99.971	9994.184907	
7	100%	4185024	1.6042	0.0477321904	0.0476926918	0.00227459	99.917	9983.456731	
8	100%	4176206	1.6042	0.0477321904	0.0475922015	0.00226502	99.707	9941.430030	
9	100%	4164119	1.6042	0.0477321904	0.0474544576	0.00225193	99.418	9883.967263	
10	100%	4167234	1.6042	0.0477321904	0.0474899563	0.00225530	99.493	9898.760344	
Σ					0.475964636235	0.022654508586	997.1564931515	99433.3145928740	
Promedio					0.047596463623		99.716		
s					0.00017483		0.366		
%CV					0.367		0.367		

1. Calcular el promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Fórmula: Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1} \quad \bar{x}_1 = \frac{\sum \text{suma áreas}}{\text{No. total de áreas}}$$

Fórmula: Desviación Estándar

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

Fórmula No.6 Coeficiente de Variación ó desviación estándar relativa.

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100 \quad CV = \frac{0.366}{99.716} \times 100 = 0.367$$

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual a:

2% para métodos cromatográficos ó volumétricos

4.5.2 Precisión Intermedia del método: Metodología

Utilizar muestras de placebo enriquecido o de muestra, a 3 diferentes concentraciones previamente definidas, con 2 analistas diferentes y dos días diferentes.

PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO												
Fila No.	Porcentaje Acetaminofén	Área muestras	Peso teórico de Acetaminofén (g)	X		Y		XY	X ²	Y ²	Y ₁	
				(g) Acetaminofén real Adicionado	(g) Acetaminofén recuperado	% Recuperación Acetaminofén	Y ₂					
1	80%	3367036	1.2874	0.0383059606	0.0383708696	0.001470	0.001467	0.001472	100.169	10033.918480		
2	80%	3365736	1.2874	0.0383059606	0.0383560547	0.001469	0.001467	0.001471	100.131	10026.171859		
3	80%	3372275	1.2874	0.0383059606	0.0384305734	0.001472	0.001467	0.001477	100.325	10065.167683		
4	80%	3368504	1.2874	0.0383059606	0.0383875990	0.001470	0.001467	0.001474	100.213	10042.669799		
5	80%	3393586	1.2874	0.0383059606	0.0386734344	0.001481	0.001467	0.001496	100.959	10192.782749		
6	80%	3366783	1.2874	0.0383059606	0.0383679864	0.001470	0.001467	0.001472	100.162	10032.410634		
7	100%	4197437	1.6042	0.0477321904	0.0478341508	0.002283	0.002278	0.002288	100.214	10042.767469		
8	100%	4151594	1.6042	0.0477321904	0.0473117222	0.002258	0.002278	0.002238	99.119	9824.597918		
9	100%	4147601	1.6042	0.0477321904	0.0472662178	0.002256	0.002278	0.002234	99.024	9805.708424		
10	100%	4143262	1.6042	0.0477321904	0.0472167704	0.002254	0.002278	0.002229	98.920	9785.202733		
11	100%	4172476	1.6042	0.0477321904	0.0475496943	0.002270	0.002278	0.002261	99.618	9923.679481		
12	100%	4183075	1.6042	0.0477321904	0.0476704809	0.002275	0.002278	0.002272	99.871	9974.160140		
13	120%	4967406	1.9258	0.0573012420	0.0566087466	0.003244	0.003283	0.003205	98.791	9759.757087		
14	120%	4930872	1.9258	0.0573012420	0.0561924038	0.003220	0.003283	0.003158	98.065	9616.723963		
15	120%	4948433	1.9258	0.0573012420	0.0563925296	0.003231	0.003283	0.003180	98.414	9685.344712		
16	120%	4964104	1.9258	0.0573012420	0.0565711169	0.003242	0.003283	0.003200	98.726	9746.786130		
17	120%	4965720	1.9258	0.0573012420	0.0565895329	0.003243	0.003283	0.003202	98.758	9753.133044		
18	120%	4987942	1.9258	0.0573012420	0.0568427757	0.003257	0.003283	0.003231	99.200	9840.620487		
Σ				0.8600363578	0.8546326594	0.0419657219	0.0421748457	0.0415612577	1790.6791464573	178151.6028117670		
Promedio				0.0477797977	0.0474795922				99.482			

Número de datos	18
Coficiente de determinación (R ²)	0.9993488484
Coficiente de correlación (r)	0.9996743702
Pendiente (b1)	0.9529450468
Ordenada al origen (bo)	0.0019480707
S _{mix}	0.0002000790
Desviación estándar (s) % recobro	0.8024675301
Coficiente de variación (CV) % recobro	0.8066344867
Coficiente de variación (CV) _{y/x}	0.4213999618

1. Calcular el promedio aritmético.

Fórmula: Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1} \quad \bar{x}_1 = \frac{\sum \text{suma áreas}}{\text{No. total de áreas}}$$

2. Desviación estándar

Fórmula: Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \quad S = \sqrt{\frac{15(178151.6028117670) - (1790.6791464573)^2}{15(15-1)}}$$

3. Coeficiente de variación

Fórmula: Coeficiente de Variación ó desviación estándar relativa.

$$CV = \frac{s}{y} \times 100 \qquad CV = \frac{0.8024575301}{99.482} \times 100$$

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación debe ser menor o igual a:

2% para métodos cromatográficos.

5. Elaboración del Informe Final de Validación

Este procedimiento inicia cuando el Analista de validaciones ha finalizado el análisis del método validado y entrega los resultados:

Documentación entregada al Ministerio de salud

1. Encabezado del informe final:

- a. **TÍTULO:** Deberá de referirse al principio activo (s), método, producto y presentación o forma farmacéutica validado.
- b. **DEPARTAMENTO:** Identifica el departamento al cual aplica dicho informe final.
- c. **No. DE INFORME FINAL:** Es el número correlativo del informe final por departamento y área.

Ejemplo:



En el caso de que no exista división y subdivisión, deberá de llenarse con 0 en cada uno de estos campos.

- d. **PROTOCOLO:** Refiere el protocolo de validación utilizado como referencia para el análisis de la validación respectiva.
- e. **ESCRITO POR:** Corresponde el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que realizó la escritura del documento.
- f. **REVISADO POR:** Indica el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que revisa el Informe final.
- g. **AUTORIZADO POR:** Indica el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que autoriza el Informe final.

Las personas que escriben, documentan, revisan y autorizan no pueden ser la misma persona. La única persona que está autorizada para firmar en la casilla de autorizado es el Gerente de Garantía de Calidad.

2. CUERPO DEL INFORME FINAL:

- a. **MÉTODO:** Refiere la técnica de análisis validada en dicho informe.
- b. **DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:** En esta sección se detalla el procedimiento analítico tal como lo especifica la técnica de análisis validada.
- c. **CLASIFICACIÓN DEL MÉTODO:** Indicar en la casilla correspondiente si se trata de un método oficial o no oficial.
- d. **TIPO DE ENSAYO FISICOQUÍMICO:** Indicar en la casilla correspondiente el tipo de ensayo fisicoquímico.
- e. **DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO EVALUADOS:** En esta sección se detalla:
 - Se enumeran los parámetros de desempeño evaluados según la técnica de análisis validada.
 - Se detalla el procedimiento que describe el método analítico respecto a la preparación de la muestra especificando la forma de adición y cantidad de placebo y activo adicionado.
 - Se especifica la cantidad y las concentraciones de trabajo de las muestras preparadas para cada uno de los parámetros de desempeño antes mencionados.

3. EVALUACIÓN Y CÁLCULOS ESTADÍSTICOS PARA LA VERIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO:

Esta sección se divide en:

- a. **Parámetro de desempeño:** En esta sección se especifica el número de muestras y las concentraciones evaluadas a partir de la metodología analítica. Simultáneamente se especifica los cálculos estadísticos utilizados para verificar que el método analítico cumple con el parámetro desempeño evaluado.
- b. **Criterio de aceptación:** En este se detalla el límite en el cual el parámetro evaluado cumple, en cada uno se especifica la referencia bibliográfica del mismo.

4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS INSTRUMENTALES:

En esta sección, se presentan en tablas los resultados instrumentales obtenidos en cada parámetro (áreas), así como las gráficas correspondientes a dichos resultados.

5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN:

Esta sección se divide en:

TABLA DE RESULTADOS: Los resultados son reportados en una tabla en la cual se describe lo siguiente:

PARÁMETRO EVALUADO: Se refiere al parámetro estadístico evaluado en la validación del método analítico.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Detalla el límite en el cual el parámetro evaluado cumple.

RESULTADOS OBTENIDOS: Es el resumen de los resultados obtenidos a partir de los cálculos estadísticos realizados en base a los datos iniciales resultado de la evaluación de la metodología analítica.

REFERENCIA: Es la referencia bibliográfica de donde se tomaron los criterios de aceptación evaluados para cada parámetro de desempeño.

CONCLUSIONES: En esta sección se especifica si el método analítico valorado cumple con cada uno de los parámetros de desempeño evaluados. Este aspecto es requisito para entregar dentro de la documentación y no puede ser obviado.

ANEXOS: En esta sección se colocan:

- Cálculos para la evaluación de la metodología analítica validada.
- Formulario, en el se incluyen los parámetros estadísticos utilizados para evaluar los cálculos resultantes de la evaluación de la metodología analítica.
- Constancia de los datos encontrados a partir de la evaluación de la metodología analítica descrita en el protocolo de validación y a la vez los cálculos estadísticos realizados para el análisis de los parámetros de desempeño. Simultáneamente se tabulan los resultados estadísticos finales para cada parámetro de desempeño.
- Tabla de resultados.
- Evidencia de los resultados instrumentales en el caso que aplique, en este caso es necesario incluir resultados de placebo, muestra, estándar, fase móvil, diluyente.

DOCUMENTACIÓN UTILIZADA PARA USO INTERNO

ESPECIFICACIONES DE ANÁLISIS DE PRODUCTO: En esta sección se especifica la composición del producto validado.

ESTÁNDAR UTILIZADO: En esta sección se deben detallar los siguientes aspectos:

- Nombre del estándar utilizado.
- Pureza
- Lote
- Fecha de vencimiento

- Número de certificado de validación (en el caso se haya utilizado un estándar de Referencia interna)

ESPECIFICACIONES EQUIPO UTILIZADO: En esta sección se especifica lo siguiente:

- Equipo
- Código interno
- Fecha próximo mantenimiento
- Código de columna, tipo de columna, flujo, volumen de inyección, fase móvil, diluyente y tiempo de retención.

GLOSARIO: En esta sección se enlistan las definiciones de las palabras técnicas utilizadas en el informe final de validación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: En esta sección se indican la bibliografía referida en el informe final de validación.

RESÚMEN INFORME FINAL: En esta se incluye:

TÍTULO: Deberá de referirse al principio activo (s), método, producto y presentación o forma farmacéutica validado.

PRODUCTO: En esta sección se especifica el nombre del producto validado.

MÉTODO: En esta sección se especifica el principio activo (s), método analítico, producto y presentación o forma farmacéutica validada incluyendo el código de técnica validado.

ESPECIFICACIONES DE ANÁLISIS DE PRODUCTO: En esta sección se especifica la composición del producto validado, número de lote, fecha de vencimiento y si es con placebo adicionado se especifica el número de lote de la materia prima utilizada, fecha de vencimiento y pureza de la materia prima.

ESTÁNDAR UTILIZADO: En esta sección se especifica: Nombre, tipo, pureza, lote, fecha de vencimiento y certificado del estándar utilizado en la validación.

EQUIPO UTILIZADO: En esta sección se especifica: el equipo, código, fecha de último mantenimiento, fecha del próximo mantenimiento, (detector, código de columna, tipo de columna, flujo, volumen de inyección, fase móvil, diluyente y tiempo de retención)

ANÁLISIS DEL PRODUCTO: En esta sección se especifican los datos referentes a la preparación y evaluación del método analítico validado, tales como: nombre de quien analizó, fecha de validación, temperatura, humedad relativa, cuaderno/tomo, página del cuaderno y firma del analista.

PREPARACIÓN DEL PLACEBO: En esta sección se especifican los datos referentes a la preparación del placebo tales como: nombre de quien preparó el placebo, fecha de

preparación, temperatura, humedad relativa, cuaderno/tomo, página del cuaderno y firma del analista.

INFORMACIÓN DE COMPONENTES DEL PLACEBO: En esta sección se adjuntan tablas en donde se especifica el código de la materia prima, lote, nombre de la materia prima, peso teórico y peso real para la preparación de la matriz del producto validado, definido en el protocolo respectivo.

6. Elaboración de protocolos para validación de métodos analíticos fisicoquímicos

PROCEDIMIENTO:

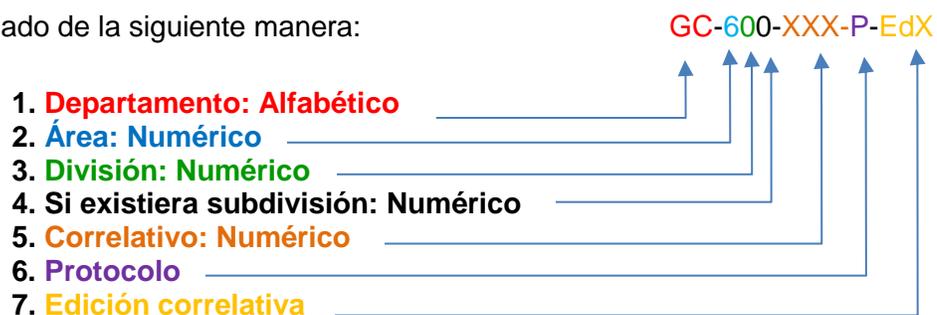
Una vez el método analítico a validar ha sido revisado y autorizado, el Jefe de Aseguramiento de Calidad o el Asistente de Validaciones es el encargado de realizar el protocolo tal y como se define a continuación.

PARTES DE UN PROTOCOLO:

1. ENCABEZADO DEL PROTOCOLO:

- TÍTULO:** Refiere el método y el producto al cual pertenece el protocolo.
- DEPARTAMENTO:** Identifica el departamento que genera el protocolo según la codificación indicada en el manual de operaciones Elaboración, Codificación y Distribución de manuales de operación.
- CÓDIGO DE PROTOCOLO:** Incluye el número correlativo del protocolo por departamento y área, dicho número deberá ser asignado por el Jefe de Aseguramiento de Calidad y/o Asistente de Validaciones.

Está dado de la siguiente manera:



En el caso que no exista división y subdivisión, deberá de llenarse con 0 en cada uno de estos campos.

Cada vez que se genere una modificación al protocolo se asignará una nueva edición.

El código del protocolo se colocará en el margen inferior, en posición cercana al número de hojas.

- d. **FECHA DE EMISIÓN:** Corresponde a la fecha en la cual el protocolo se elabora e inicia su proceso de revisión.
- e. **FECHA DE REVISIÓN:** Indica la fecha en la cual el protocolo deberá de ser revisado para su re-validación, la cual deberá ser cada 5 años a partir de la fecha de emisión. En el caso que se realice algún cambio significativo en el método de análisis la fecha de revisión dejará de ser efectiva y se realizará la re-validación de manera anticipada.
- f. **REEMPLAZA PROTOCOLO No.:** Indica el código de protocolo y la edición que está sustituyendo. Ejemplo: (GC-600-000-P-Ed1)
- g. **VIGENTE DESDE:** Indica la fecha en la cual el informe de validación cumple y lo autoriza la Gerencia; por lo que el Asistente de Validaciones es el encargado de colocar la fecha en esta casilla, utilizando un fechador manual con tinta color azul.
- h. **ÁREAS DE APLICACIÓN:** Indican las áreas a las cuales el protocolo será aplicado.
- i. **ESCRITO POR:** Indica el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que realizó la escritura del documento, escribiendo, en la esquina superior derecha del espacio designado, la fecha en que se firmó el documento.
- j. **REVISADO POR:** Indica el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que revisa el Protocolo, escribiendo, en la esquina superior derecha del espacio designado, la fecha en que se firmó el documento.
- k. **AUTORIZADO POR:** Indica el nombre, firma y puesto dentro de la organización de la persona que autoriza el protocolo, escribiendo, en la esquina superior derecha del espacio asignado, la fecha en que se firmó el documento.

Las personas que escriben, revisan y autorizan no pueden ser la misma persona.

La única persona que está autorizada para firmar en la casilla de autorizado es el Gerente de Garantía de Calidad.

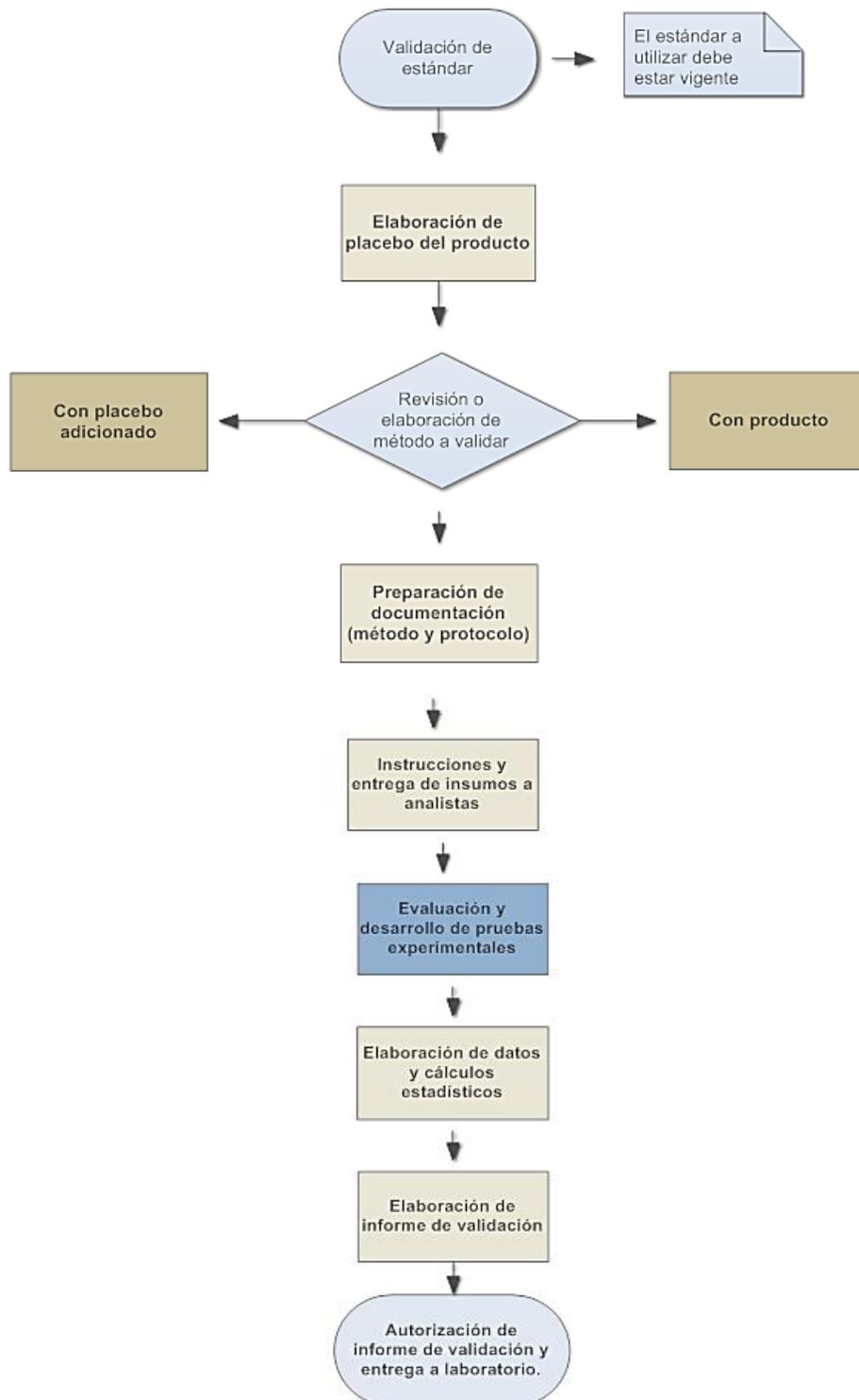
2. CUERPO DEL PROTOCOLO:

- a. **OBJETIVO:** Enfoca el alcance que se tendrá con el protocolo.
- b. **RESPONSABILIDAD:** Nombra a las personas que serán responsables de velar por el cumplimiento de dicho protocolo.
- c. **RECURSOS A UTILIZAR:** Detalla los equipos, estándares de referencia y muestras si aplica.
- d. **DOCUMENTOS DE REFERENCIA:** Detalla las técnicas analíticas y manuales de operación que apliquen al protocolo.
- e. **DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:** Refiere el método de análisis que se validará mediante dicho protocolo.
- f. **DIAGRAMA DE FLUJO:** Diagrama de la secuencia de los pasos a seguir para el desarrollo del protocolo.
- g. **PARÁMETROS A EVALUAR:** Indica los parámetros de desempeño analítico que se evaluarán.
- h. **PROCEDIMIENTO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:**
 - **Observaciones:** En esta sección se hace mención de las precauciones u observaciones que deben tenerse, durante el procedimiento de validación.
 - **Preparación del placebo:** En esta sección se describe de forma detallada el procedimiento a seguir para la preparación del placebo.
 - **Preparación del placebo adicionado (si aplica):** En esta sección se describe el procedimiento de preparación del placebo con la adición del analito de interés a las diferentes concentraciones de trabajo.
 - **Preparación de la solución madre (si aplica):** En esta sección se describe el procedimiento de preparación de una solución que contiene el analito de interés, de tal modo que las muestras analíticas preparadas a partir de la adición de diferentes volúmenes de ésta, obtengan como resultado, los porcentajes de concentración requerida para su validación.
 - **Preparación de la muestra analítica:** En esta sección se especifica la preparación de la muestra, considerando el procedimiento indicado en el método analítico.
 - **Preparación del estándar (si aplica):** En esta sección se especifica la preparación del estándar, considerando el procedimiento indicado en el método analítico.

- **Determinación de los parámetros de desempeño analítico:** En esta sección se especifican las características de desempeño analítico que se evaluarán en el protocolo y sus respectivos criterios de aceptación.

- i. **PROGRAMACIÓN:** En esta sección se hará referencia del orden cronológico de las actividades, especificando el tiempo estimado para la realización de la programación.
- j. **CONTROL DE CAMBIOS:** Proceder según se indica en el manual de operaciones Control de cambios.
- k. **NO CONFORMIDADES:** Proceder según se indica en el manual de no conformidades.
- l. **MANTENIMIENTO DEL ESTADO VALIDADO:** En esta sección se hará referencia de la frecuencia de re-validación y de las acciones a seguir para mantener como validado el método en evaluación.
- m. **GLOSARIO:** En esta sección se enlistan las definiciones de las palabras técnicas utilizadas en el protocolo de validación.
- n. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** En esta sección se indican la bibliografía referida en el protocolo de validación.
- o. **ANEXOS:** En esta sección se colocan tablas, planos, fotografías, diagramas, etc., que son referidos en el protocolo de validación.

7. Esquema de procedimiento de validación de un método analítico de jarabes:



8. Referencias

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35. (01 de mayo de 2017). Vol. 1. Estados Unidos de América: The United States Pharmacoeial Convention.

GUIDELINE, I. H. (11 de 2005). Recuperado el 26 de 07 de 2017, de https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

GUIDELINE, I. H. (08 de 2009). Recuperado el 07 de 2017, de https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf

INVIMA. (10 de 04 de 2015). Recuperado el 24 de 07 de 2017, de <https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/s-medicamentos-y-productos/Memorias%20virtuales%20de%20nuestros%20objetivo/VALIDACION%20DE%20TECNICAS%20ANALITICAS.pdf>

Oficina de Acreditación Guatemalteca. (2007). *Política de Selección y Validación de métodos de ensayo*. Guatemala: OGA.

Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York: Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito.

Reglamento Técnico Centroamericano. (2006). *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06*. COMIECO.

World Health Organization. (2002). Recuperado el 23 de 07 de 2017, de http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El concepto de validación es la confirmación a través de la recopilación y análisis de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto. La validación de un procedimiento analítico permite establecer por medio de estudios y análisis de laboratorio una base de datos que demuestran que un método analítico tiene y cumple con las características de desempeño que son adecuadas para cumplir con los requerimientos y especificaciones de las aplicaciones analíticas ensayadas, así mismo, implica la demostración de la determinación de fuentes de error sistemático y variabilidad al azar de un procedimiento, no solo en el aspecto de calibración sino en el análisis de muestras reales (Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35, 2017).

La estandarización de un método analítico se completa con la validación del mismo. Al validar se demuestra experimental y formalmente que el proceso de medición química o una parte del proceso funciona como se espera y se mantiene a lo largo del tiempo. Con la validación se recopila evidencia documentada, la cual provee un alto grado de aseguramiento de que un determinado método producirá consistentemente datos que cumplirán sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

Los resultados del presente trabajo se obtuvieron luego de realizar un diagnóstico de revisión de documentos dentro de la empresa, en el cual se constató que era necesario realizar una guía para orientar al personal colaborador en la evaluación de las características y parámetros a considerar durante la validación de los procedimientos analíticos, aplicados a jarabes por cromatografía líquida de alta resolución.

Se elaboró una guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución la cual está constituida por una portada, índice, introducción, alcance, definiciones y en el desarrollo consta de una sección introductoria a las generalidades de validaciones analíticas.

La segunda sección está conformada por los parámetros de validación, la cual presenta los datos estadísticos obtenidos de un análisis de rutina aplicado dentro del laboratorio, para realizar el análisis estadístico respectivo de los datos, con ello se pretende explicar el cálculo de los datos estadísticos necesarios para dar soporte a los resultados obtenidos de los ensayos de laboratorio, para ello se utilizaron fichas de fórmulas estadísticas las

cuales se obtuvieron de manuales y guías elaboradas en consenso por organismos internacionales.

En la tercera sección se detallan los procedimientos para la elaboración del protocolo de validación, el cual es fundamental para realizar el procedimiento de validación analítica, porque junto con el método de validación, son las partes fundamentales, ya que indican los pasos que los analistas deben seguir para realizar la validación del método. En el protocolo se definen las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar según los requerimientos del método.

Así mismo, se encuentra la parte de elaboración del informe final de la validación, el cual indica las partes que conforman el informe de validación luego de obtenidos los resultados del análisis, en él se detalla el método utilizado, los parámetros evaluados, los resultados y las conclusiones.

El fin de la guía es su implementación dentro del laboratorio farmacéutico y que sea un documento de la empresa que sirva para orientar al personal en la validación de métodos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se elaboró una guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico.
2. Se describió en la guía el proceso de validación de métodos analíticos y los aspectos estadísticos requeridos por normativa RTCA 11.03.39:06.
3. Se ejemplificó en la guía un proceso de validación de un método analítico de jarabes para orientar al personal colaborador sobre los aspectos requeridos para validar.
4. Se esquematizó el procedimiento para la validación de métodos analíticos de jarabes en un laboratorio farmacéutico con el objetivo de facilitar la comprensión del proceso.

IX. RECOMENDACIONES

1. Implementar el uso de la guía de validación dentro del personal colaborador, así como una capacitación para dar a conocer la información que se incluye en la guía.
2. Elaborar una guía de validación que incluya otras formas farmacéuticas elaboradas dentro del laboratorio farmacéutico.
3. Elaborar una guía para el desarrollo de métodos analíticos para productos nuevos.

X. REFERENCIAS

- Arriola, L. (2012). *Validación de métodos analíticos fisicoquímicos y microbiológicos*. Recuperado Julio 27, 2017 de https://medicamentos.mspas.gob.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validación_de_Métodos_Analíticos_con_formulas.pdf
- Baez, M. (2014). *Validación de métodos de ensayo*. Recuperado Julio 26, 2017 de http://www.ispch.cl/sites/default/files/Presesntacion_Taller_Validacion_Analitica14_10_2014%20Marco%20Carmona.pdf
- Calvo, B., Esquisabel, A., Hernández, R., & Igartua, M. (2015). *Jarabes y disoluciones orales*. México: OCW.
- COFEPRIS. (2016). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Recuperado Julio 25, 2017 de <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 39 NF 34. (2016). Vol. 1. Estados Unidos de América: The United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35. (2017). Vol. 1. Estados Unidos de América: The United States Pharmacopeial Convention.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2016). Recuperado Mayo 5, 2017 de <http://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/361.pdf>
- Gennaro, A. (2003). *Remington Farmacia*. Buenos aires: Medica panamericana.
- González, A. (2017). *Manual de HPLC*. Guatemala: Laboratorio y Droguería Donovan Werke A.G.S.A.
- Guideline, I. H. (2005). Recuperado Julio 26, 2017, de https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- Guideline, I. H. (2009). Recuperado Julio 26, 2017, de https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf

- Instituto de Salud Pública. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición*. Santiago: Instituto de Salud Pública.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). *Guía de inspección de buenas prácticas de manufactura (GMP) para la industria de productos farmacéuticos*. Chile: Instituto de Salud Pública de Chile.
- INVIMA. (2015). *Validación de técnicas analíticas*. Recuperado Julio 24, 2017, de <https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/s-medicamentos-y-productos/Memorias%20virtuales%20de%20nuestros%20objetivo/VALIDACION%20DE%20TECNICAS%20ANALITICAS.pdf>
- ISO Tools Excellence. (2017). *ISO 9001:2015. Sistemas de Gestión de la Calidad*. México.
- Magnusson, B. Omemark, U. (2014). *Eurachem guía: La adecuación al uso de los métodos analíticos*. España: Eurachem.
- Norma técnica NTC-ISO/IEC Colombiana 17025. ICONTEC. (2005). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Recuperado Julio 28, 2017 de https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC_17025-2005.pdf
- Oficina de Acreditación Guatemalteca. (2007). *Política de Selección y Validación de métodos de ensayo*. Guatemala: OGA.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York: Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito.
- Organismo Argentino de Acreditación. (2013). *Guía para la Validación de Métodos de Ensayo*. Argentina: Organismo Argentino de Acreditación.
- Organización Panamericana de la Salud. (2002). *Buenas Prácticas para Laboratorios Farmacéuticos. Informe 36 Anexo 3*. Ginebra: Organización Panamericana de la Salud.
- Pamplona, U. (2007). *Determinación por cromatografía Líquida (HPLC) el contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales*. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas Vol. 5(2), 42-48. Recuperado Julio 27, 2017 de <http://www.redalyc.org/pdf/903/90350204.pdf>
- Pappa, H. (2013). *Validación y Verificación de Procedimientos Analíticos: Nuevos enfoques*. México: U.S.P. Pharmacopeial Convention.

- Parajón, E., Parajón , C., & Peralta, J. (2008). *Validación de la metodología analítica en la cuantificación de Acetaminofén en solución oral por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)*. Nicaragua : Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Reglamento técnico Centroamericano. (2006). *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06*. COMIECO.
- Universidad Central de Venezuela. (2008). Recuperado Agosto 08, 2017 de <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>
- World Health Organization. (2002). Recuperado Julio 23, 2017 de http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf

XI. ANEXOS

1. Fichas de fórmulas estadísticas:

Fórmula No. 1 Ecuación lineal

$$Y = mx + b$$

Fórmula No.2 Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b1}$$

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

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

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Fórmula No.3 Porcentaje de recuperación

$$\text{Porcentaje de recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Fórmula No. 4 Promedio aritmético

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum x_1}{n_1}$$

Fórmula No.5 Desviación Estándar

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

Fórmula No.6 Coeficiente de Variación ó desviación estándar relativa.

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

Fórmula No.7 Intervalo de confianza para la media poblacional (Intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro)

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Fórmula No.8 Desviación estándar de la ordenada al origen

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\left(\bar{x}\right)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Fórmula No.9 Coeficiente de determinación

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

Fórmula No.10 Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_0}$$

Fórmula No. 11 Coeficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y} \times 100$$

Fórmula No. 12 Coeficiente de correlación

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

Fórmula No. 13 "t" student experimental para la pendiente (β_1) y para la ordenada al origen (β_0)

$$t_{\text{exp}} = \frac{b_1}{S_{b_1}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{b_0}{S_{b_0}}$$

Fórmula No.14 Varianza

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

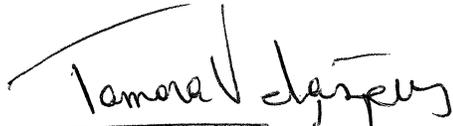
Fórmula No. 15 Prueba de homogeneidad de Cochran

$$G_{\text{exp}} = \frac{\sigma_{\text{mayor}}^2}{\sigma_{\text{promedio}}^2}$$



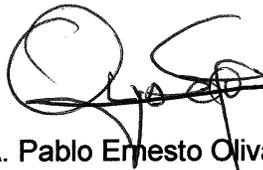
Ruth Andrea Cordero Figueroa

AUTORA



MSc. Tamara Ileana Velásquez Porta

DIRECTORA



MA. Pablo Ernesto Oliva Soto

DECANO