



Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel en el periodo comprendido de Mayo a Noviembre 2009.

Presentado por: Adinia Faije López.

Tutor: Lic. Karla Corea Cáceres

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-MANAGUA

AGRADECIMIENTO:

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme prestado la vida dos veces, por haberme dado la fuerza de sobrellevar los obstáculos que se han presentado en mi camino.

A mis padres Adinia López Moraga y Diosnel Faife Hernández por brindarme su apoyo incondicional durante estos 23 años de mi vida, a mis hijas Adinia Darce Faife y Juleisy Darce Faife que son dos seres maravillosos que me impulsan a seguir siempre adelante.

A todos los docentes que Dios sabiamente colocó en mi camino para instruir mi formación profesional.

A mis compañeros de clase porque juntos compartimos vivencias maravillosas a lo largo de estos años de ardua formación.

A mi Tutora Lic. Karla Corea por la paciencia y el apoyo que siempre me brindó durante el desarrollo del trabajo.

A mis colegas Mario Rocha, Fernando Galeano, Carlos Mercado y César Martínez por la ayuda que me proporcionaron para la realización de este trabajo.

A la directora técnica de Laboratorios CEGUEL y asesora Dra. Marta Moreira por depositar toda su confianza en el trabajo que realizado.

A Laboratorios CEGUEL por la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

A todos y cada uno de ellos les doy las gracias porque el creador supremo sabiamente los puso en mi camino.

Gracias a todos.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

DEDICATORIA:

El presente trabajo se lo dedico a mis padres Adinia López Moraga y Diosnel Faife Hernández, quienes a lo largo de mi vida siempre me han dado su apoyo y confianza, la cual me ha servido como fuente de inspiración y superación.

A mis hijas porque me impulsan a seguir siempre adelante sin importar los obstáculos.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

RESUMEN

En el presente trabajo, se ha validado el método de análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la Mupirocina 2% ungüento, el cual, es un nuevo producto formulado por laboratorios CEGUEL S. A. donde se realizó la adecuación y optimización de las condiciones cromatográficas.

El método fue validado siguiendo una metodología de trabajo elaborado previamente en un protocolo de validación, donde se analizaron diferentes parámetros tales como: adecuación del sistema, Especificidad, linealidad, precisión, exactitud y límite de detección y cuantificación.

Definidas las condiciones, se evaluaron los parámetros de idoneidad del sistema observándose que el método cumple con los criterios de aceptación propuestos por la USP, con el cual se comprueba el buen funcionamiento del sistema de bombeo, inyección, horno y detección. Posteriormente, se evaluaron los parámetros de validación mostrando mediante el diseño experimental y los procedimientos estadísticos empleados que el método analítico propuesto es selectivo o específico, ya que no se evidencian que los productos de degradación interfieran en el análisis del principio activo Mupirocina, por tanto, los resultados mostraron que el método es selectivo para los propósitos previstos, seguidamente se evaluaron los parámetros de validación como: Linealidad del sistema y del método para los cuales se obtuvieron valores cercanos a la unidad ≥ 0.999 , Precisión del sistema y del método obteniéndose valores de $\%RSD < 1\%$ es decir presentan muy buena precisión. La exactitud del método se evaluó por medio del porcentaje de recuperación ($\%R$) de Mupirocina, los cuales fueron de $100.18 \% \pm 0.535$, es decir, se confirmó la exactitud del método, luego se determinaron el límite de detección del activo obteniéndose valores de $0.66 \mu\text{g/mL}$ respectivamente y el límite de cuantificación $2.02 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, seguidamente se evaluó la Repetibilidad del método, cumpliendo con los parámetros establecidos en la USP, comprobando de esta manera la validez del método analítico.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

I.1 INTRODUCCIÓN

Como parte de los programas de calidad que se emplean en las industrias farmacéuticas se están implementando nuevas metodologías y/o procesos enmarcados en las mejoras continuas. “El control analítico de un producto farmacéutico es necesario para asegurar su eficacia y seguridad durante todas las etapas de su período de vida útil”. Este control se realiza de acuerdo con especificaciones establecidas y comprobadas durante la elaboración del producto es por esta razón que la validación se hace imprescindible, pues su “objetivo principal es asegurar que una metodología analítica seleccionada dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto”, por lo tanto, es necesario definir debidamente tanto las condiciones en que la metodología ha de emplearse como el objetivo previsto para la misma. Estos principios se aplican a todas las metodologías descritas en la farmacopea y también a aquellas no incluidas pero que se utilizan en la industria farmacéutica.

Con la validación de una metodología analítica se establece por medio de estudios de laboratorio, que las características de desempeño de la metodología cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, asegurándonos que es lineal, exacta y precisa bajo los rangos especificados, y que los resultados son altamente confiables.

La validación y optimización de las condiciones cromatográficas del método analítico por Cromatografía Líquida de alta Presión (HPLC) para la determinación simultánea de Mupirocina 2 % Ungüento, se llevaron a cabo en laboratorios CEGUEL S.A. en el departamento de Control de Calidad y Desarrollo en el período del mes Mayo a Noviembre 2009. Se realizó la evaluación de los parámetros que definen el buen desempeño de este método para asegurar la calidad del producto elaborado y proteger la salud de los consumidores.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

I.2 OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo General

- Validar el método analítico por Cromatografía Líquida de alta Presión (HPLC) para la cuantificación simultánea de Mupirocina 2% ungüento en Laboratorio Ceguel en el Período comprendido de Mayo a Noviembre 2009.

I.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la Idoneidad del Sistema conforme a parámetros establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).
- Evaluar la Especificidad del método utilizado para la Cuantificación simultánea de Mupirocina.
- Evaluar Linealidad, Precisión del Sistema y del método cromatográfico para determinar Coeficiente de Determinación, Factor de Respuesta.
- Evaluar la Exactitud, Repetibilidad del método cromatográfico para determinar porcentaje de recuperación de Mupirocina, la homogeneidad de las medias de cada día con su intervalo de confianza al 97.5 %.
- Determinar Límite de detección, Límite de cuantificación acorde a la Curva de Calibración Normal.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

II. 1 MARCO TEÓRICO

II.1. 1 Validación de métodos analíticos.

La validación es la acción documentada que demuestra que cualquier procedimiento, proceso o actividad conducirá consistentemente a los resultados esperados. Esto incluye la calificación de sistemas y equipamiento, es un tema de considerable interés.¹⁰

Las organizaciones que redactan estándares invierten considerable tiempo en métodos de pruebas colaborativas que ellos preparan validándolos en aplicaciones típicas y determinando sus características de resolución. Sin embargo, frecuentemente surgen preguntas acerca de la convivencia de los métodos y la validez de su uso en situaciones específicas. Algunas de esas preguntas pueden ser debido a la diferencia en entender tanto qué significa el proceso de validación.¹³

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. La Validación es el *“proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones del método y la identificación de los aspectos influyentes que puedan cambiar estas características así como hasta que punto se puede cambiar”*. Es un proceso basado en la confirmación del desempeño o de que el mismo es consistente con los requerimientos de su aplicación. El laboratorio de servicio y su personal tiene una clara responsabilidad, la confianza del cliente, proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema en otras palabras debe demostrarse que los resultados son “adecuados para el propósito” para esto será suficiente que cualquier decisión que se tome basada en el sea confiable.

De manera que, el desempeño del método debe ser valido, y de igual manera, deberá estimarse la incertidumbre del resultado y analizar las muestras adecuadas.¹³

Como parte de los programas de calidad o del plan de calidad o de la política de las empresas, se están desarrollando o implementando nuevas metodologías y/o procesos enmarcado en las

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

mejoras continuas, y para cumplir este fin es que todo nuevo método debe validarse, para demostrar documentadamente su idoneidad.

Si el método no es nuevo y se utiliza rutinariamente, entonces no es necesario el iniciar una validación desde cero, por lo que para estos casos se puede definir una validación retrospectiva basada en datos acumulados de producción, pruebas y de control, donde se pueden combinar nuevos criterios de validación con la experiencia adquirida, o se puede desarrollar análisis estadísticos de los registros arrojados por el método durante el tiempo en que se ha utilizado.

En contraposición a este tipo de validación se encuentra la validación prospectiva que se desarrolla con un producto nuevo o producto hecho bajo un proceso de fabricación revisado, donde las revisiones pueden afectar las características del producto. Por último, se puede realizar la validación concurrente que es utilizada cuando no hay datos disponibles del proceso y se lleva a cabo durante el proceso.¹⁰

En muchos casos un método analítico es desarrollado y validado por un grupo de trabajo, típicamente el Laboratorio de Desarrollo analítico y aplicado a otro grupo, como por ejemplo el Laboratorio de Control de Calidad. Para asegurar que el laboratorio de aplicación sea capaz de entregar resultados confiables, es conveniente realizar una transferencia de validación.

En el caso de métodos cromatográficos, la transferencia de validación consiste en la comparación de resultados de las pruebas de adecuación y de análisis en paralelo de a lo menos dos muestras homogéneas de concentraciones conocidas, dentro de un rango de aceptación del producto o dentro del rango de aplicación de la metodología. Por otra parte, una revalidación se hace necesaria con métodos validados previamente, pero que deben volver a evaluarse por modificaciones, instrumentales, de la matriz que contiene la muestra o de la proporción relativa del analito.

Una vez que es desarrollado un método de análisis por Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe documentar que

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

cualquier procedimiento, proceso o actividad conducirá consistentemente a los resultados esperados.

En lo referente a los productos farmacéuticos codificados en la USP, se consideran validados y el único requerimiento es el cumplimiento del test de adecuación indicado en cada monografía: en general se inyecta una sustancia definida y se verifica que la resolución entre el pico del analito y dicha sustancia sea superior a cierto valor indicado; además se mide y controla la precisión, asimetría del pico y eficiencia y se permite ajustar la fuerza de la fase móvil para cumplir con los requerimientos mínimos.

Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamente discutible. Diferencia entre distintas formas farmacéuticas, tipos y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, elaborado o semielaborado.¹¹

Se debe tener bien en claro que tanto o más importante que las normas en sí, son los principios y valores éticos y morales de cada profesional como también de cada persona que está relacionada directa o indirectamente con los medicamentos para solo así, garantizar y asegurar la buena calidad de éstos.

II.1.2. Proceso de validación

El proceso de validación verifica que la metodología este basada sobre principios técnicos firmes y que han sido reducidos a la práctica para propósito de mediciones prácticas. Tanto la necesidad de validar la metodología como el procedimiento a seguir son materia de juicio profesional. La validación puede ser general o específica.¹⁶

II.1.3. Validación general

La validación de las técnicas de medición depende de la elucidación de los principios científicos sobre los cuales ellos están basados. Tales resultados de validación para la investigación de la

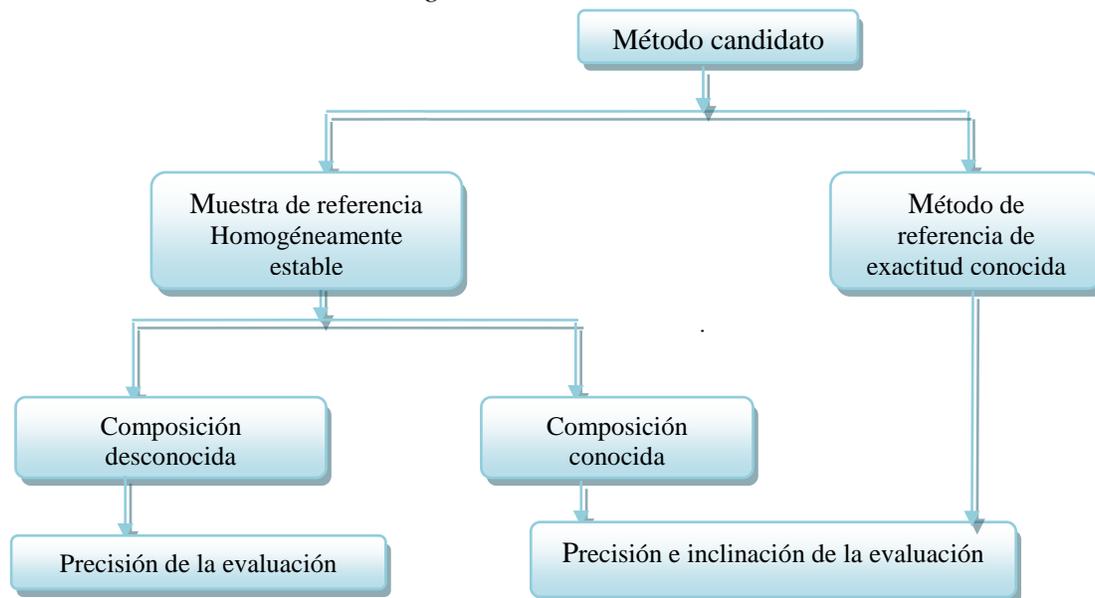
comunidad científica y su solidez es evaluada por revisión. La mejor comprensión de los principios de medición puede extender su alcance y mejorar la calidad de su uso.

Los métodos surgen como resultado de una investigación aplicada, típicamente por individuos que frecuentemente involucran tanto el entendimiento comprensible de las técnicas de medición como el alto grado de ingenuidad e innovación en su aplicación. La comprobación de los métodos en situaciones prácticas típicas juega un papel clave, tanto en el proceso de desarrollo como en el de la validación.¹⁶

Los procedimientos son desarrollados para el uso final de los métodos en situaciones analíticas prácticas. El usuario de laboratorio comúnmente necesita más detalles experimentales que están contenidos en reportes de investigación publicados de un método para utilizarlos en aplicaciones prácticas. Frecuentemente cuando un método gana un uso extensivo el usuario puede decidir que este necesite ser estandarizado.¹⁶

Un proceso de revisión completo incluye pruebas colaborativas (Ver figura No. 1) en los cuales los materiales de prueba estable típicos son analizados para verificar la utilidad del procedimiento y para identificar tanto la debilidad técnica como editoriales.¹⁶

Figura No. 1. Prueba colaborativa.



Fuente: Tomado de *Química analítica*. John Taylor. 55(1983) 600A-608A

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Si la composición de la muestra de referencia es conocida, su precisión y su desviación tanto a nivel intra o ínter laboratorio pueden ser evaluadas. Si un método de exactitud conocida está disponible, el ensayo colaborativo puede consistir de su comparación con el método propuesto en cualquier caso tanto la precisión como la desviación pueden ser evaluadas. Un protocolo es preescrito por Fiat de una organización que requiere un tipo específico de medición. Presumiblemente resulta de una decisión inteligente basado en el proceso de validación de la organización o de otros. Esto puede consistir de un ensayo colaborativo extenso o la publicación de protocolo propuesto para comentario público.

Los protocolos que han sido especificados en un arreglo contractual pueden escoger arbitrariamente o a través de un proceso de selección bien concebido. La verificación de su validez para su uso específico debe ser de primera consideración.¹⁶

II.1.4. Validación para uso específico

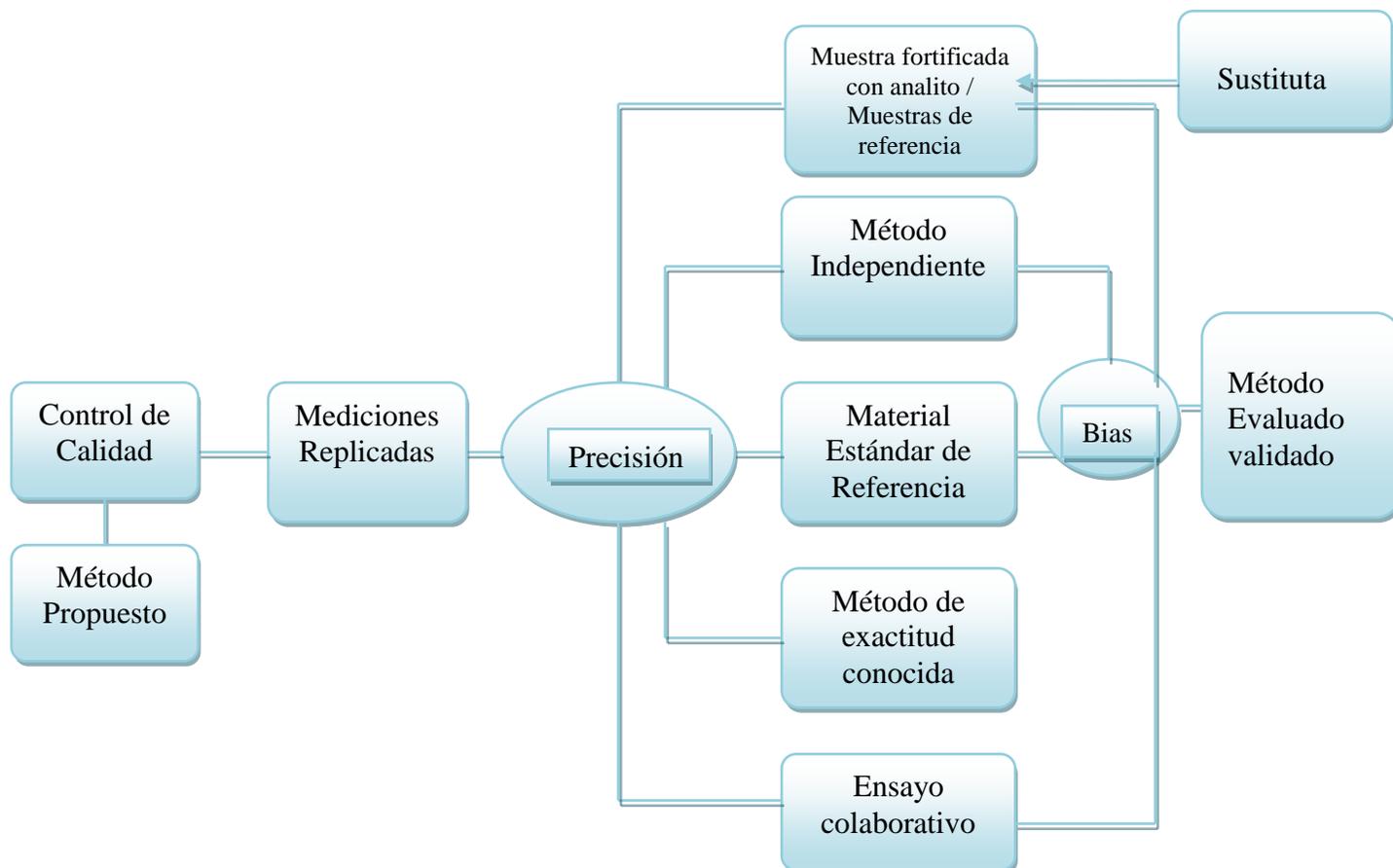
Cuando las muestras de referencia están disponibles y es similar en todos los aspectos a las muestras de prueba el proceso es muy simple: consiste en el análisis de un número significativo de muestras de referencia y comparando los resultados que se esperan o valores certificados. Antes o durante la práctica, el analista debe demostrar la habilidad del estado del control estadístico del sistemas de medición para que los resultados puedan ser realizados sobre otros, representativos a aquellos esperados cuando se utiliza en la metodología de un sistema de medición. Cuando no se dispone de un material de referencia apropiado se pueden usar otras técnicas. Una de ellas consiste de la comparación de los resultados del método propuesto con aquellos de otros métodos conocidos sean aplicables y confiables pero no útil en la situación real debido al costo indisponibilidad del personal o equipo u otras razones.¹⁶

El uso final de la metodología analítica es producir información composicional acerca de las muestras específicas necesarias para la solución de un problema. El proceso de validación clásica se ilustra en la figura siguiente.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

II.1.5. Proceso general para la metodología

Figura No 2. Evaluación / Validación



Fuente: Tomado de *Química analítica*. John Taylor. 55(1983) 600A-608A.

Las muestras llamadas “spiked” (fortificada con el analito) y “surrogates” pueden ser usadas como muestras de referencia. Esta técnica es menos deseable y menos satisfactoria debido a la dificultad en la preparación confiable de las muestras y debido a la artificialidad añadida de materiales tales como “spikes” y “surrogates” que pueden exhibir diferentes efectos de matrices a aquellas de las muestras naturales. La división de las muestras reales de ensayos puede ser utilizada para evaluar la precisión de un método o procedimiento, pero ellas no proporcionan información acerca de la presencia o magnitud de cualquier “bias” (inclinación) de la medición.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Otra técnica es inferir la metodología apropiada de las mediciones sobre análogas, pero diferentes orígenes. Se necesita un análisis crítico del analista para decidir la validez de la interferencia.

En todos los casos las pruebas suficientes se pueden hacer para evaluar la metodología para una variedad de matrices y rangos de composición esperada dentro del proceso de medición, comúnmente debería incluir tres niveles de concentración, es decir, los extremos y el rango medio de composición esperada. Las consideraciones estadísticas sugieren que al menos seis grados de libertad (ordinariamente siete mediciones) deberían estar involucrados en cada punto de medición.¹⁶

II.2. Criterios de eficiencia para la Validación de una metodología analítica.

II.2.1 Precisión

Es una medida de que tan cerca están los resultados entre sí y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea que, describe la magnitud de los errores aleatorios.¹⁴

II.2.2 Exactitud o Bias (sesgo)

La exactitud de un procedimiento analítico expresa lo más cercano a un acuerdo entre el valor que es aceptado no como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado.¹⁴

II.2.3 Límite de detección

Que mide la cantidad mínima que puede diferenciarse de la señal de ruido de fondo. Es la concentración del analito que produce una señal que es tres desviaciones estándar mayor que la del blanco. El límite de detección es una característica de las pruebas de límite, es decir, la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límite solamente fundamenta que la cantidad del analito esta por encima o por debajo de un nivel de seguridad.

El límite de detección puede ser establecido de diferentes maneras dependiendo del tipo de método.¹⁴

$$L.D = 3.29Sb_0 / b_1 \quad Ec. (1)$$

Uno de los puntos característicos de la recta de calibrado es la señal para la concentración cero, que puede tener diferente significado si corresponde a la medida realizada sobre los reactivos sin la muestra (prueba en blanco de los reactivos). O bien, se realiza sobre la muestra sin alguno de los reactivos esenciales (prueba en blanco de la matriz de la muestra). Las explicaciones que puedan darse a la desviación desde cero hacia valores positivos o negativos de la señal para las pruebas en blanco, constituyen un buen índice del grado de conocimiento que el científico posee del procedimiento analítico.¹⁴

Ambas señales de las pruebas en blanco suelen acumularse sobre las de la muestra, aunque de manera diferente a las señales de los patrones, por lo que es más prudente mantener estos valores en la representación de la recta de calibrado, y sustraer al resultado de concentración del correspondiente a la prueba en solvente.

La señal de la prueba en solvente también presenta errores experimentales y, por lo tanto, una dispersión de valores que afectan al límite de detección del procedimiento.

Así como la pendiente de la recta de calibrado es un índice de la sensibilidad del procedimiento analítico, la precisión de esta pendiente y la de la ordenada en el origen establecen el límite de detección, o sea la cantidad mínima de sustancia detectable cuantitativamente. El valor del límite de detección se establece con criterios de probabilidad de cometer error por asignar un valor a la señal de un solvente, o bien por asignar el valor del solvente (no detectable) cuando en realidad la muestra contiene cantidad significativa de sustancia.¹⁴

También aquí la estadística proporciona diversos modelos para establecer estos límites, según el grado de seguridad que se desee alcanzar. En algunas técnicas instrumentales se llama "ruido de fondo" a la dispersión de la señal del solvente, estableciéndose como límite de detección la concentración que da una señal doble o triple respecto a la señal de fondo.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Es incorrecto utilizar expresiones como "no detectable", "ausencia" o "0", como resultado correspondiente a señales iguales a la prueba en solvente, siendo correcto decir que el resultado de una señal no diferenciable de la prueba en el solvente es "inferior al límite de detección", cuyo valor se ha determinado previamente.¹⁴

II.2.4 Límite de cuantificación

Es la más baja concentración del analito que puede ser cuantificada con suficiente precisión y exactitud. También es definido, convencionalmente, como la concentración de analito que corresponde al blanco de la muestra, más 5, 6 ó 10 desvíos estándar de la media (del solvente), también se le conoce como "límite de determinación".

$$L.C = 10Sb_0 / b_1 \quad Ec. (2)$$

II.2.5 Linealidad

Que describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modelo de calibración (una desviación del modelo representa un bias).¹⁴

II.2.6 Rango

Representa el intervalo (niveles inferior y superior del analito) en el cual la relación lineal u otro modelo de calibración utilizado son correctos.

II.2.7 Especificidad

Este parámetro asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra y en caso contrario, garantiza la remoción de las mismas, otro aspecto importante de la selectividad es si el analito puede existir en la muestra de una forma, tal como enlazado o libre, inorgánico u órgano - metálico, o en diferentes estados de oxidación.¹⁴

II.2.8 Sensibilidad

Es el parámetro que mide la magnitud del cambio en la función de respuesta (o señal) con la concentración y corresponde a la pendiente de la curva de respuesta.¹⁵

II.3. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.⁹

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad.⁹

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.⁹

II. 3.1Tipos de Cromatografía Líquida.

- Cromatografía de Partición.
- Cromatografía de Adsorción
- Cromatografía Iónica
- Cromatografía de Exclusión

II.3.2. Razones por las cuales se utiliza HPLC:

- Gran variedad de configuración operativa.
- Gran cantidad de diferentes sistemas de fase estacionaria.
- Gran número de fases móviles y modificaciones de ella.
- Amplio campo de uso.

II.3.3. Algunas aplicaciones del HPLC:

- Para sustancias solubles en un solvente o una mezcla de solventes.
- Sustancias no solubles.
- Sustancias muy polares y/o iónicas.
- Sustancias de alto peso molecular
- Sustancias termolábiles.

II.3.4. Limitaciones:

- Solubilidad de la sustancia (sustancias poco o no solubles)
- Detectabilidad de la sustancia.

II.3.5. Campos de uso de HPLC:

- Control de pureza y calidad de producto
- Análisis de medicamentos
- Análisis de sustancias en matrices biológicas.
- Análisis de residuos de plaguicidas.
- Análisis de sustancias tóxicas para el medio ambiente.
- Análisis de polímeros sintéticos.
- Separación y limpieza de biopolímeros.
- Aislamientos de productos sensibles (HPLC preparativa).

II.3.6. Diagrama Básico de un Sistema de HPLC

Una instalación HPLC está compuesta de varias unidades especializadas las cuales pueden ser encontradas como entidades separadas o ser integradas dentro de un marco de trabajo común. Un sistema de tuberías de diámetros internos muy pequeños (0.1 mm) asegura la circulación de la fase móvil entre los módulos. Estos tubos de transferencia están hechos de acero inoxidable o de PEEK (Polyether-etherketone), un polímero coloreado y flexible, capaz de resistir los solventes comunes bajo presiones altas (por encima de 350 bares).⁹

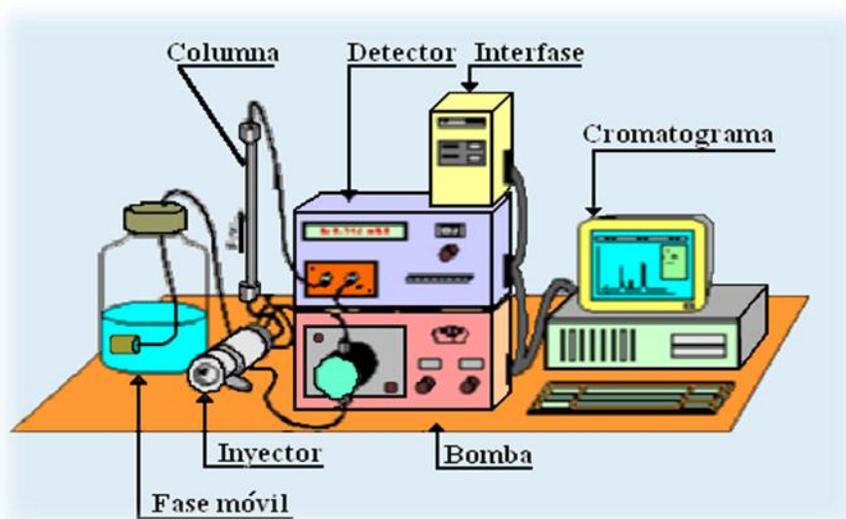
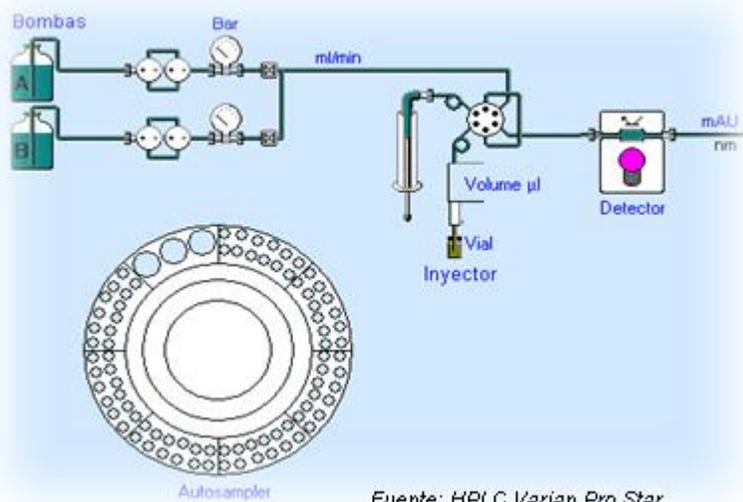


Figura No. 3. Esquema de un instrumento HPLC modular Isocrático.

Un sistema modular permite a los usuarios adaptar la instalación de acuerdo a las aplicaciones que serán llevadas a cabo. El ensamble vertical de los diferentes módulos permite una economía de espacio. Aquí el Cromatógrafo, comprende una columna controlada termostáticamente para mejorar la reproducibilidad de las separaciones.⁹

Flujograma Básico de un sistema de



Fuente: HPLC Varian Pro Star

HPLC

Figura No. 4. Esquema de un instrumento HPLC modular Varian ProStar.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

II.3.7 Elección del Solvente.

Características:

- Disponible comercialmente
- Precio
- Pureza y Estabilidad. En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas.
- Disolver la muestra
- Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV) Filtración y Desgasificación de solventes.⁹

II.3.8. Métodos de Filtración de Solventes en HPLC.

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC:

- Filtración al Vacío
- Filtración en Línea
- Sonificación (someter a baño ultrasónico)⁹

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los Cromatógrafo líquidos en la era de la computadora, hay aún problemas que ésta no puede resolver, ya que hasta los Solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de solvente en el depósito para solvente, la exposición a partículas del

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan filtrar y desgasificar los solventes HPLC antes de usarlos.⁹

En el instante que se abre una nueva botella de solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el depósito solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El Oxígeno Disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El Nitrógeno Disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El Dióxido de Carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.⁹

II.3.9 Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC.

Existen cuatro métodos comunes usados para des gasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- Burbujear Helio
- Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo
- Desgasificación al Vacío en Línea Bombas (Método de desgasificación utilizado).

II.3.10 Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo:⁹

- Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.
- Mantener el flujo libre de pulsaciones.
- Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min).
- Control y reproducibilidad del flujo de solvente.
- Componentes de la bomba resistentes a la corrosión. Las bombas que se usan en HPLC.

Se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en: Mecánicas Recíprocantes

- De desplazamiento continuo o Neumáticas

II.3.11 Programación del Solvente

Existen dos métodos de programación de Solvente en HPLC:

- **Isocrático:**

Es un término que se utiliza para describir el proceso analítico mediante el cual no se cambia la composición de la Fase móvil.

- **Gradiente de Elución:**⁹

Es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil. Pueden efectuarse de dos maneras:

A baja presión

A alta presión

Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible. Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos:

Asegurar alta precisión y exactitud.

Determinar la composición inicial y final del solvente

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir 5 pasos fundamentales:

- * Ajustar el tiempo del gradiente.
- * Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa).
- * Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución.
- * Regresar a las condiciones iniciales de la columna, Sistemas de Inyección de muestra.⁹

● **Sistemas de inyección de muestra**

Estos sistemas han variados durante la historia del sistema de HPLC, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión, las cuales, ya están en desuso, ya que hoy en día se utiliza el sistema de válvulas inyectoras.⁹

II.3.12 Columnas y Fases Estacionaria

● **Columnas:**

La columna cromatográfica es un cilindro metálico el cual contiene un soporte sólido a través del cual migran los analitos y la fase móvil. El material para la fase estacionaria consiste en partículas esféricas.

● **Tipos de Columna:**

Las columnas analíticas son normales de acero o de vidrio con longitudes de 250, 125, 100, 60 milímetros y un diámetro interno de 2, 3, 4 milímetros. Hay que tomar en cuenta el peso molecular del analito para seleccionar el tamaño de poro, fase ligada inicial de la Columna, diámetro de Columna.⁹

● **Fuentes de daño de una columna de HPLC:**

Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fases móviles.

Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras.

Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.

● **Fases estacionarias**

La siguiente tabla muestra las fases estacionarias empleadas comúnmente en cromatografía de líquida de la modalidad invertida.

Tabla No. 1. Fases estacionarias empleadas comúnmente

Tipo de Cadena	-R	Tamaño de Partícula
Larga	-C ₁₈ H ₃₇	5 – 10
Intermedia	-C ₈ H ₁₇	5 - 10

Los soportes de fases enlazadas poseen grupos funcionales incorporados a la cadena hidrocarbonada saturada que se enlazan químicamente a la superficie del soporte, este tipo de cromatografía es la llamada cromatografía de fase inversa (invertida o reversa) que involucra una fase estacionaria relativamente poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidas a los grupos silanos del soporte y se utilizan por lo general con fases móviles muy polares, esta modalidad cromatografía es la de mayor interés e impacto en la actualidad.

La cromatografía de fase inversa, la retención de un analito dado y la composición de fase móvil constante puede variar por el cambio de la polaridad de la fase estacionaria químicamente enlazada. La única manera de que el factor de capacidad del analito de iguales valores para diferentes columnas es variando la polaridad de la fase móvil.⁹

En fase inversa, los solutos son aludidos en orden de polaridad, siendo eludido primero los componentes más polares. Se pueden variar el tiempo de retención cambiando la polaridad de la fase estacionaria o más fácilmente cambiando la polaridad de la fase móvil.

La polaridad de la fase estacionaria esta en dependencia del grupo no polarizado, por ejemplo C-8 > C-18 y del porcentaje del carbono presente.

La retención de un soluto dado con composición de fase móvil constante aumenta con la longitud de la cadena alquímica químicamente agregada.

En cromatografía líquida de fase reversa la hidrofobicidad de la fase estacionaria y la del soluto es la propiedad más importante. La prueba de retención del soluto depende de la hidrofobicidad de la fase estacionaria en eluyentes semejantes. Los componentes de la fase móvil por lo tanto pueden ser cambiados para diferentes tipos de fases estacionarias con el fin de obtener el máximo desarrollo.⁹

II.3.13 Detector

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del eluente, así como también de las características de la señal de transferida.⁹

II.3.14 Tipos de detectores en HPLC:

Detectores que se basan en una propiedad de la fase móvil. Ejemplo:

- Detector de Índice de Refracción
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta. Los detectores más utilizados en HPLC son:

Detector UV.⁹

Hay básicamente tres tipos:

- Detector de Longitud de Onda Fija.
- Detector de Longitud de Onda Variable.
- Detector de Arreglo de Diodos.

Detector de Índice de Refracción.

Existen muchos diseños de estos detectores, pero solamente existen ahora dos tipos:

- Tipo Deflexión
- Tipo Fresnel.

Detector de Fluorescencia.

Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.⁹

- Detector de Fluorescencia Inducida por Laser. Según la Fuente de Excitación y según el sistema óptico

Detectores Electroquímicos.

Pueden ser clasificados en tres tipos:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

- Detector Amperométrico
- Detector Conductimétrico
- Detector Potencio métrico

Se deben tener algunas precauciones con los detectores electroquímicos para asegurarse análisis reproducibles:

Chequear que estén conectados adecuadamente a tierra la bomba, el detector y registrador (integrador).⁹

- Usar bombas reciprocantes de doble pistón
- Mantener en todo momento el flujo de la fase móvil en el detector.
- Operar con el voltaje adecuado
- Monitorear la altura de los picos para observar cambios en la eficiencia que nos indique la necesidad de reacondicionar los electrodos.
- Tener electrodos de referencias extras en solución 3M de NaOH y reemplazar el electrodo de referencia en la celda 1 ó 2 veces a la semana.
- Desconectar el detector electroquímico cuando este limpiando las columnas.
- Utilizar agua, buffers y solventes orgánicos de alta pureza.⁹

II.3.15 Derivatización.

Existen dos tendencias:

- Pre-Columna.
- Post-Columna Análisis Cualitativo y Cuantitativo.

II.3.16 Problemas más comunes encontrados en HPLC

Presión Alta

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC o Guarda Columna por partículas.

Solución: Invierta la Columna y Enjuagar con solvente, teniendo la columna desconectada del

detector. Si esto no funciona reemplace el fritado a la entrada de la columna. Si la presión sigue alta reemplace la columna.

Solución a largo plazo: Asegúrese que todas las fases móviles se filtren apropiadamente antes que entren a la bomba de HPLC. También filtre todas las muestras antes de inyectarlas.⁹

Pérdida de la Resolución

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC ó del Guarda Columna por partículas.

Solución: vea la sección de Presión Alta

Solución a largo plazo: Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.⁹

Picos Hendidos

Posible causa: Obstrucción de la Columna de HPLC o del Guarda Columna por partículas.

Solución: Marcha atrás columna roja con presión baja está al lado de abre. Si es necesario reemplace el filtro de la entrada a la columna.

Solución a largo plazo: Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.⁹

Variación en los Tiempos de Retención

Posible causa: Aire atrapado en la bomba debido a gases disueltos en fase móvil.

Solución: Asegúrese que la fase móvil este apropiadamente y adecuadamente desgasificada.⁹

Variaciones de la Línea Base

Posible causa: Burbujas del aire atrapados en la celda del detector debido a una mala desgasificación de los solventes de la fase móvil.

Solución: Asegúrese que todas las fases móviles estén debidamente desgasificadas y considerar el uso de un restrictor de la presión a toma de corriente del detector.⁹

Línea Base con mucho Ruido

Posible causa: Aire atrapado en celda del detector o en la bomba.

Solución: Enjuagar el sistema y purgar la bomba de HPLC. Use Solventes desgasificados adecuadamente para mantener constante la velocidad de flujo de la fase móvil del sistema.⁹

Picos Falsos (Detectores Electroquímicos y de Fluorescencia)

Posible causa: Oxígeno Disuelto

Solución: Desgasificar adecuadamente las fases móviles para reducir la concentración de oxígeno disuelto.

Solución a largo plazo: Agregar un sistema de filtración al vacío en línea. Periódicamente chequear el nivel de oxígeno disuelto.⁹

Baja ó Ninguna Presión

Posible causa: Trabajar con bombas, sellos ó pistones expuestos por mucho tiempo a partículas en suspensión en la fase móvil.

Solución: Reemplace los sellos o pistones, si es necesario. Recomendaciones para adquirir un sistema de HPLC.⁹

II.4 Mupirocina

La Mupirocina es un antibiótico que no guarda relación estructural con otros antibióticos (su estructura química no presenta el anillo betalactámico) conocidos importantes clínicamente, es producida por fermentación de un microorganismo (*Pseudomonas fluorescens*), es de uso tópico exclusivo debido a que de forma oral es metabolizado casi por completo en estómago y es muy doloroso en administraciones inyectables.

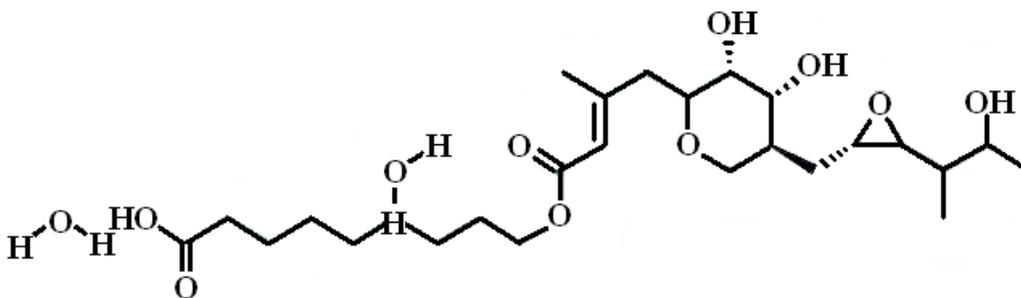


Figura No. 5. Estructura de la Mupirocina.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Fórmula Molecular: $C_{26}H_{44}O_9$

Peso Molecular: 500.62

Pka: 5.48 ± 0.06 .¹⁸

II.4.1. Mecanismo de acción:

Esta actúa inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas al unirse de forma reversible con la isoleucil-tARN sintetasa bacteriana, compitiendo con la isoleucina y evitando su incorporación por el sitio de unión a la enzima; inhibiendo en consecuencia, la síntesis de proteínas y ARN bacteriana ³. Debido a este modo de acción, Mupirocina no muestra resistencia cruzada con ningún otro antibiótico conocido. La actividad anti fúngica de Mupirocina está relacionada con este proceso, siendo transportada activamente a las células de la levadura por un sistema de transporte de aminoácidos de alta afinidad ⁴.

La Mupirocina tiene un amplio rango de actividad frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus Aureus* (incluyendo cepas resistentes a la meticilina y cepas productoras de betalactamasas) *Staphylococcus epidermidis* y *S. saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactie* y *S. viridans*; y Gram negativas aerobias y anaerobias como *Haemophilus influenzae*, *N. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Pasteurella multocid*),². Se ha comprobado la eficacia de Mupirocina en la candidiasis cutánea, que consigue la erradicación de todos los microorganismos de la especie *Cándida* en 2 a 5 días, con cicatrización rápida de las heridas excoriadas exudativas ¹.

La acción inhibitoria de Mupirocina al 2% aplicado por vía tópica resulta en un efecto bactericida, principalmente en el pH de la piel que es levemente ácido. La concentración inhibitoria mínima de la Mupirocina sobre *S. aureus* es de 0.016 ug/ml, es activo contra *S. aureus* resistente a otros antibióticos como penicilina, amino glucósidos, Eritromicina, Cloramfenicol y Tetraciclina ⁸. Existe evidencia de que algunas enzimas presentes en la piel pueden metabolizar a la Mupirocina en ácido Mónico en 3%. Se ha reportado que la Mupirocina permanece activa al menos durante 24 horas después de su aplicación sobre la piel ⁶.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Se ha comprobado que en infecciones bacterianas de la piel, existe una curación del 94 % y una erradicación bacteriológica del 97%. En un estudio in vitro en tejido infectado, se demostró que la Mupirocina elimina las bacterias rápidamente. Una hora después del tratamiento, sobrevivía 29% de *S. aureus* y 46% de *S. epidermidis*; a las 24 horas sólo estuvo presente el 0.35% de las bacterias, de igual manera elimina a la *Cándida albicans* a concentraciones inhibitorias mínimas de 512 ug/ml; en un periodo de 2 a 6 días de tratamiento. Los estudios clínicos consiguen resultados satisfactorios. Este fármaco erradica a las especies de *Cándida* en el período corto, siendo la mayor respuesta a Mupirocina, con rápida resolución de los efectos clínicos y patológicos y reducción de los recuentos bacterianos ⁷.

II.4.2. Interacciones medicamentosas:

El Cloramfenicol interfiere con la acción antibacteriana de la Mupirocina sobre la síntesis de ARN. La importancia clínica de ello no ha sido determinada a la fecha.

II.4.3. Precauciones Generales:

No es apropiado su uso sistémico ni su aplicación en ojos y sobre membranas mucosas, y no puede utilizarse para tratar las Aftas ⁵.

II.4.4. Reacciones adversas:

En menos de 1 a 3% de los casos se ha informado de prurito y eritema leves transitorios, que desaparecen al suspender el medicamento.

III.1 DISEÑO METODOLOGICO

III.1.1 Tipo de estudio: Experimental, descriptivo.

III.1.2 Área de estudio: el estudio se llevó a cabo en el área de control de calidad y desarrollo de Laboratorios Ceguel S.A. ubicado en Granada, km 45 ½ carretera a Granada.

III.1.3 Análisis de datos: este se realizo usando tablas específicamente diseñadas en hojas de cálculo de Excel, Stat Grafic, la información procesada se representara a través de gráficos y tablas.

III.2 MANEJO DE LAS VARIABLES

Tabla n° 2. Manejo de las variables.

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	N° LECTURAS
Idoneidad	Expresa las condiciones del sistema cromatográfico	N° de platos teóricos > 3000 Factor de asimetría < 2 Factor de capacidad > 1 $CV \leq 2\%$	10 lecturas
Linealidad	Es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de análisis que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de un analito en la muestra.	C.V. $\leq 2\%$ $r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$ $t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$ $t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$	5 concentraciones y 3 lecturas por cada una de las concentraciones.
Limite de detección y limite de cuantificación	Es la cantidad más pequeña de analito cuantificable. El límite de detección es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto y debe estar 10 veces por debajo de la concentración de trabajo.	LDD= $3.29 * S_{b0}/b$ LDC= $10 * S_{b0}/b$ S_{b0} = desviación estándar de la respuesta del blanco b= pendiente de la curva de calibración	5 concentraciones y 3 lecturas por cada una de las concentraciones
Exactitud	Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.	El t_{exp} debe ser menor que el t_{tab} para comprobar que el método es exacto.	5 concentraciones y 5 lecturas por cada concentración.
Repetibilidad	Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación a través de un corto intervalo de tiempo. También significa una precisión entre ensayos.	Limite de confianza. Se aplica para 3 concentraciones / 3 replicados o un mínimo de 6 replicados al 100 %	9 lecturas para la Repetibilidad y 5 lecturas de 3 diferente niveles de concentración para la precisión.
Especificad	Es la capacidad para calcular un analito en presencia de otros componentes que se espera que esté presente sin interferir.	Se demuestra que no existen interferencias que afecten los resultados de la valoración o del analito de interés.	3 lecturas del solvente, 3 del placebo, 3 del estándar y 3 de la muestra.
Robustez	Capacidad de un método analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.	$CV \leq 3\%$	3 lecturas por cada ensayo de robustez

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

III. 3 DISEÑO EXPERIMENTAL (Metodología general).

Desarrollo de los parámetros de validación

III.3.1 Idoneidad del Sistema. Procedimiento de trabajo.

Tomar 1 balón volumétrico aforado de 50 mL y pesar exactamente 50 mg de Mupirocina Estándar. Añadir 30 mL con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH4/Metanol 1:1 para disolver, someter al ultrasónico por 5 minutos. Mezclar y aforar con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1. Solución 1.

En 1 balón volumétrico aforado de 50 mL, tomar 5 mL de la solución anterior y aforar con solución diluyente de buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1 y filtrar a través de membrana 0,2 µm de porosidad e inyectar 10 veces en el Cromatógrafo.

Seguidamente calcular los parámetros de idoneidad del sistema los cuales deberán de cumplir con los valores de aceptación sugeridos en la USP.

Tabla n° 3. Criterios de aceptación de idoneidad del sistema

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coefficiente de variación	$CV \leq 2 \%$
Factor de cola	< 2
Número de platos teóricos	> 3000
k'	> 1

III.3.2 Especificidad del método. Procedimiento de trabajo.

Realizar tres inyecciones del solvente utilizado para los análisis y tres inyecciones del placebo utilizado en la formulación del Ungüento Mupirocina, luego realizar tres inyecciones de un estándar de Mupirocina, posteriormente realizar tres inyecciones de la muestra a analizar. En todos los casos observar que no exista ninguna señal cromatográfica que coincida con los tiempos de retención de los principios activos a estudiar es decir que no deben existir interferencias con las señales de nuestro interés.

III.3.3 Influencia del placebo en la curva de calibración normal Procedimiento de trabajo.

Tomar 5 balones volumétricos aforados de 50 mL, limpios y secos, agregarles a cada uno 40, 45, 50, 55, 60 mg de Mupirocina, posteriormente aforar cada uno de los balones con solución diluyente y someterlos a un baño ultrasónico por 5 min. Luego tomar 5 mL de cada una de las soluciones estándar y colocarlos en otros 5 balones volumétricos aforados de 50 mL y aforar con solución diluyente. Posteriormente tomar otros 5 balones volumétricos aforados de 50 mL, limpios y secos, agregarles a cada uno 40, 45, 50, 55, 60 mg de Mupirocina, luego adicionar las cantidades necesarias del placebo descrito en V.5.6 (equivalente al contenido a un tubo de ungüento) posteriormente aforar cada uno de los balones con solución diluyente y someterlos a una baño ultrasónico por 5 min. Luego tomar 5 mL de cada una de las soluciones estándar conteniendo placebo y colocarlos en otros 5 balones volumétricos aforados de 50 mL para posteriormente aforar con solución diluyente, de éstos se toman 20 µL y se inyectan al Cromatógrafo.

Graficar en el mismo plano la curva de calibración normal sin contener placebo y la otra conteniendo placebo, luego comparar los resultados gráficamente, las curvas no deberán cruzarse en ningún punto para que no exista ninguna influencia del placebo en la curva de calibración normal.

III.3.4 Linealidad del sistema y del método cromatográfico

III.3.4.1 Linealidad del sistema. Procedimiento de trabajo.

Tomar 5 balones volumétricos aforados de 50 mL y pesar exactamente 40, 45, 50, 55 y 60 mg de Mupirocina Estándar. Añadir 30 mL con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH 4/ Metanol 1:1 para disolver, someter al ultrasonido por 5 minutos. Mezclar y aforar con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH 4/ Metanol 1:1. Solución 1.

En 5 balones volumétricos aforados de 50 mL, tomar 5 mL de las soluciones anteriores y aforar con solución diluyente de buffer Acetato 0.05 M pH 4/ Metanol 1:1 y filtrar a través de membrana 0,2 µm de porosidad e inyectar al Cromatógrafo.

Realizar 3 inyecciones por cada una de las concentraciones

Tabular los resultados obtenidos.

Procesar los resultados promedios obtenidos haciendo uso del programa **EXCEL** y determinar:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Tabla n° 4. Criterios de aceptación de la linealidad del sistema

PARAMETRO ESTADISTICO	CRITERIO DE ACEPTACION
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2\%$
Coefficiente de correlación	≥ 0.99
Coefficiente de determinación	≥ 0.98
Valor del Intercepto	Aproximadamente cero
Valor de la pendiente	Aproximadamente 1
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero
Valor de la pendiente	Aproximadamente a 1
Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$

III.3.4.2 Linealidad del método. Procedimiento de trabajo.

Tomar 5 beacker de 50 mL, limpios y secos, agregarles a cada uno 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6 g de unguento equivalentes a 8, 9, 10, 11, 12 mg de activo, luego adicionar a cada uno 30 mL de solución diluyente, posteriormente calentar a baño maría hasta fundir la muestra transferir a balones volumétricos aforados de 100 mL y aforar cada uno de los matraces con solución diluyente y someterlos a una baño ultrasónico por 5 min filtrar a través de membrana 0,2 μ m de porosidad.

Realizar 3 inyecciones por cada una de las concentraciones

Tabular los resultados obtenidos. Realizar los gráficos independientes para la linealidad del sistema y del método

Procesar los resultados promedios obtenidos haciendo uso del programa **EXCEL** y determinar:

- Coeficiente de determinación, correlación y variación.
- Intercepto
- Intervalo de confianza para el intercepto
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto
- Valor de la pendiente
- Intervalo de confianza de la pendiente
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente
- Test de Cochran para evaluar las varianzas de las concentraciones.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Tabla n° 5. Criterios de aceptación de la linealidad del método.

PARAMETRO ESTADISTICO	CRITERIO DE ACEPTACION
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2\%$
Coefficiente de correlación	≥ 0.99
Coefficiente de determinación	≥ 0.98
Valor del Intercepto	Aproximadamente cero
Valor de la pendiente	Aproximadamente 1
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero
Valor de la pendiente	Aproximadamente a 1
Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$

III.3.5 Precisión del sistema y del método cromatográfico

III.3.5.1 Precisión del sistema. Procedimiento de trabajo.

Realizar 5 inyecciones de tres niveles de concentración diferentes: uno bajo, un nivel intermedio y un nivel alto, para Mupirocina 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$. Calcular el factor de respuesta y su desviación estándar relativa expresada como porcentaje (%RSD) la cual deberá ser menor del 2 %.

Tabla n° 6. Criterio de aceptación de la precisión del sistema

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2\%$

III.3.5.2 Precisión del método. Procedimiento de trabajo.

Realizar 5 inyecciones de tres niveles de concentración diferentes: uno bajo, un nivel intermedio y un nivel alto, para Mupirocina 80, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$. Calcular el factor de respuesta y su desviación estándar relativa expresada como porcentaje (%RSD) la cual deberá ser menor del 2 %.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Tabla n° 7. Criterio de aceptación de la precisión del método.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2\%$

III.3.6 Exactitud. Procedimiento de trabajo.

Tomar 5 balones volumétricos aforados de 50 mL, limpios y secos, agregarles a cada uno 40, 45, 50, 55, 60 mg de Estándar de Mupirocina, posteriormente aforar cada uno de los balones con solución diluyente y someterlos a un baño ultrasónico por 5 min. Luego tomar 5 mL de cada una de las soluciones estándar y colocarlos en otros 5 balones volumétricos aforados de 50 mL y aforar con solución diluyente tomar 20 μ L e inyectarlos al Cromatógrafo.

Calcular:

Tabla n° 8. Parámetros estadísticos y criterios de aceptación de la Exactitud.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
% Promedio recuperado	97.00% - 103.00%
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$
Test de t	$t_{exp} < t_{tabla}$ (t tab 2.306)

III.3.7 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC). Procedimiento de trabajo.

Elaborar una curva de calibración normal a concentraciones diluidas cercana a la señal del ruido, para Mupirocina (1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 μ g/mL). Calcular el LD y el LC utilizando las ecuaciones 1 y 2.

III.3.8 Repetibilidad del método. Procedimiento de trabajo.

Preparar un nivel de concentración de 100 μ g/mL de Mupirocina, realizar lecturas de nueve replicas diariamente durante cinco días, posteriormente realizar el gráfico de control para las medias, todos los valores deberán estar dentro de la zona de aceptación del límite de tolerancia del gráfico de control (pág. 65 gráfico N° 5)

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

III.3.9 Robustez. Procedimiento de trabajo.

III.3.9.1 Diferentes longitudes de onda.

Preparar tres soluciones estándar al 100 % e inyectarlos a diferentes longitudes de onda:

237 nm, 240 nm, 243 nm.

III.3.9.2 Diferentes temperaturas.

Preparar dos soluciones estándar e inyectarlas a diferentes temperaturas:

35 °C, 40 °C.

Observar los resultados.

III.3.9.3 Fase móvil a diferentes proporciones.

Preparación de fase móvil a diferentes proporciones:

50:50.

70:30.

80:20

Preparar una solución estándar al 100 % y hacer inyección de la muestra con las fases móviles de diferentes proporciones.

El CV para los resultados obtenidos en los cambios de cada condición debe ser ≤ 3.00 %. Ver resultados obtenidos en anexo N° 5.

III.3.10 Selectividad ante producto de degradación

III.3.10.1 Hidrólisis Ácida

Preparación de solución estándar:

En un beaker de 100 mL, pesar exactamente la cantidad de 25 mg de Mupirocina (realizar ajuste si es necesario). Adicionar al beaker 5 mL de ácido clorhídrico 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de hidróxido de sodio 1N, continuar con la preparación de la solución al 100 %.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Preparación de la solución muestra:

Pesar 0.5 g de Ungüento equivalentes a 10mg de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 100 mL Adicionar al beaker 5 mL de ácido clorhídrico 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de hidróxido de sodio 1N, continuar con la preparación de la solución al 100%.

Preparación de la solución placebo:

Pesar 0.49 g de placebo de Ungüento de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL Adicionar al beaker 5 mL de ácido clorhídrico 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de hidróxido de sodio 1N, continuar con la preparación de la solución al 100 %.

III.3.10.2 Hidrólisis Alcalina.**Preparación de solución estándar:**

En un beaker de 100 mL, pesar exactamente la cantidad de 25 mg de Mupirocina. Adicionar al beaker 5 mL de hidróxido de sodio 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1N, continuar con la preparación de la solución al 100 %.

Preparación de la solución muestra:

Pesar 0.5 g de Ungüento equivalentes a 10mg de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 100 mL Adicionar al beaker 5 mL de hidróxido de sodio 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1N, continuar con la preparación de la solución al 100 %.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Preparación de la solución placebo:

Pesar 0.49 g de placebo de Ungüento de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL. Adicionar al beaker 5 mL de hidróxido de sodio 1N, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker y adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1N, continuar con la preparación de la solución al 100 %.

III.3.10.3 Oxidación**Preparación de solución estándar:**

En un beaker de 100 mL, pesar exactamente la cantidad de 25 mg de Mupirocina. Adicionar al beaker 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker, continuar con la preparación de la solución al 100 %

Preparación de la solución muestra:

Pesar 0.5 g de crema equivalentes a 10 mg de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL. Adicionar al beaker 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker, continuar con la preparación de la solución al 100 %

Preparación de la solución placebo:

Pesar 0.49 g de placebo de Ungüento de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL. Adicionar al beaker 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el material volumétrico, continuar con la preparación de la solución al 100 %

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

III.3.10.4 Termólisis

Preparación de la solución Estándar:

En un beaker de 100 mL, pesar exactamente la cantidad de 25 mg de Mupirocina, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker, proceder a la preparación de la solución al 100 %

Preparación de la Muestra:

Pesar 0.5g de crema equivalentes a 10 mg de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el material volumétrico, proceder a la preparación de la solución al 100 %

Preparación de la solución Placebo:

Pesar 0.49 g de placebo de Ungüento de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL, almacenar la muestra en horno a 80°C por 24 horas.

Concluido el tiempo de estrés retirar la muestra del horno, dejar enfriar el beaker, proceder a la preparación de la solución al 100 %

III.3.10.5 Muestras sin someter a estrés.

III.3.10.5.1 Preparar una solución estándar al 100 % como se indica en el apartado III.6.6

III.3.10.7 Preparar una solución muestra al 100 % como se indica en el apartado III.6.7

III.3.10.8 Preparar una solución placebo al 100 % como se indica en el apartado III.6.9

Analizar por duplicado las soluciones de estándar, muestra y placebo sin someter a estrés.

Analizar por duplicado las soluciones de estándar, muestra y placebo sometidas a estrés.

Comparar la señal obtenida para las muestras sometidas a estrés con las muestras sin someter a estrés.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Comparar la señal obtenida para la solución muestra y placebo sin someter a estrés con el estándar que no se sometió a estrés.

III.3.11 Criterio de aceptación

La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25% con respecto a la original.

La muestra sometida a estrés no debe presentar ninguna señal que interfiera con la señal obtenida para el estándar.

La señal obtenida para la muestra sin someter a estrés debe coincidir con la señal obtenida para el estándar.

La señal obtenida para el placebo sin someter a estrés no debe interferir con la señal obtenida para el estándar.¹⁴

III.4 MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS:*Tabla No. 9. Equipos y materiales*

Descripción	Marca	Modelo
Agitador ultrasónico.	Fisher Scientific	FS -30
Balanza analítica.	Mettler Toledo	XS 104
Matraz de 25, 50, 100 y 500 mL	Pirex	Clase A
Beaker.	Pirex	Clase A
Bomba de vacío.	Welch	2534B-01
Calculadora científica.	Casio	-
Columna.	Agilent	Zorbax SB-C8
Cromatógrafo líquido de alta Presión (HPLC). Con Automuestreador.	Varian ProStar.	410
Espátulas	-	-
Filtros para jeringas: Econofilter(0,20umx 25 mm)	Agilent	-
Membranas filtrantes de (0.46umx 47 mm)	Varian	-
Filtro de membrana de Nylon.	Agilent	-
Jeringas descartables.	NIPRO	-
Kit de micro filtración.	SIBATA	-
pH-metro	Termo Scientific	Orion 3 STAR
Pipetas Volumétricas de 5 mL	Pirex	Clase A
Pipetas Serológicas de 1, 5 mL	Pirex	Clase A
Probetas de 100 y 250 mL	Pirex	Clase A
Viales de 2 mL	Varian	Varian
Horno	VWR	1327 F

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

III.5 REACTIVOS:*Tabla No. 10. Reactivos*

Descripción	Calidad
Água destilada	Grado Reactivo
Acetato de Amonio	Grado Reactivo
Acetonitrilo	Grado HPLC
Acido Acético Glacial	Grado Reactivo
Metanol	Grado HPLC

III.6 Metodología de análisis.

Para la implementación de la metodología analítica para la cuantificación de Mupirocina en ungüento al 2 % y el desarrollo del Protocolo de Validación para Metodologías Analíticas por HPLC se realizaron las siguientes actividades:

- Revisión bibliográfica sobre la validación en bibliografía escrita y en internet (libros, farmacopeas, manuales de equipos, revistas, tesis, apuntes de cursos, etc.). También se consultó a profesionales expertos en el tema acerca de dudas puntuales.
- Revisión bibliográfica del principio activo Mupirocina y de los demás componentes de la formulación.
- Manejo del equipo HPLC (bases del funcionamiento del equipo y sus componentes, manejo del software, mantenimiento, tipos de columnas, sus características, cuidados y precauciones, etc).
- Implementación de la metodología analítica para la cuantificación de Mupirocina en ungüento al 2 %.
- Definición de las condiciones generales de trabajo (preparación de la muestra, con que estándar se trabajaría, etc).
- Definición de la técnica específica para la evaluación de cada uno de los parámetros de desempeño, los análisis estadísticos que se aplicarán a los resultados de cada parámetro y los criterios de aceptación para cada uno de éstos.
- Ensayos preliminares de la medición de los parámetros de desempeño.
- Realización de la validación de la metodología de Mupirocina ungüento al 2 %

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

- Tratamiento de datos y desarrollo del Informe de resultados de la Validación.

III.6.1 Condiciones cromatográficos del ensayo de Mupirocina 2 %

- Equipo: Cromatógrafo líquido de alta Presión.
- Columna: Agilent Zorbax SB-C8
- Sistema: Binario, Buffer Acetato de amonio 0.05 M pH 4: Acetonitrilo. (60/40)
- Longitud de onda: 240 nm
- Temperatura: ambiente (30 °C)
- Flujo: 1.5 mL/min
- Volumen de inyección: 20 µL
- Tiempo de Retención: 3.4 min. (Mupirocina) aproximadamente ± 0.2 min
- Tiempo total de corrida: 5.5 min ± 0.2 min

III.6.2 Contenido del ungüento de Mupirocina 2% de Laboratorios Ceguel S.A.

III.6.2.1 Principio activo

Mupirocina

III.6.2.2 Excipientes (Placebo)

Propilparabeno

Metilparabeno

Emulgin HRE 40

Aceite mineral

Vaselina simple

III.6.3 Preparación del buffer Acetato de Amonio 0.05 M pH 4:

Pesar exactamente 1.92 g de Acetato de Amonio y trasladar a un balón aforado de 500 mL, aforar con agua destilada, ajustar a pH 4 con Acido Acético Glacial.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

III.6.4 Fase móvil:

Mezclar 240 mL de Buffer acetato 0.05 M pH 4 y 160 mL Acetonitrilo, relación 60/40. Filtrar y desgasificar.

III.6.5 Preparación de solución diluyente

Pesar exactamente 1.92 g de Acetato de Amonio y trasladar a un balón aforado de 500 mL, aforar con agua destilada, ajustar a pH 4 con Acido Acético Glacial. Mezclar Buffer acetato pH 4 con Metanol en relación 1:1.

III.6.6 Preparación de Estándares para la Curva de Calibración normal

Tomar 5 balones volumétricos aforados de 50 mL y pesar exactamente 40, 45, 50, 55 y 60 mg de Mupirocina Estándar. Añadir 30 mL con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1 para disolver, someter a baño ultrasónico por 5 minutos. Mezclar y aforar con solución diluyente buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1. Solución 1.

En 5 balones volumétricos aforados de 50 mL, tomar 5 mL de las soluciones anteriores y aforar con solución diluyente de buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1 y filtrar a través de membrana 0,2 μm de porosidad e inyectar. *Concentraciones Mupirocina Estándar: 80, 90, 100, 110 y 120 $\mu\text{g/mL}$.*

III.6.7 Preparación de la muestra

Homogenizar la muestra con agitación manual por medio de una espátula y pesar 0.5 g de muestra equivalente a 10 mg de Mupirocina en un beacker de 100 mL, agregar 50 mL de mezcla de buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1. Calentar a baño María hasta fundir la muestra y trasvasarlo a un balón volumétrico aforado de 100 mL agitarlo mecánicamente. Aforar con mezcla de buffer Acetato 0.05 M pH 4/Metanol 1:1 y homogenizar, filtrar a través de membrana 0,2 μm de porosidad e inyectar por triplicado. *Concentración Muestra: 100 $\mu\text{g/mL}$.*

III.6.8 Preparación del placebo.

Pesar 16.6 g de vaselina simple, agregar 2 mL de Aceite mineral se calentó a 70 ° C, después de fundido se le agregó 1 g de Emulgin HRE 40, 0.32 g de Metilparabeno, 0.061 g de Propilparabeno. Dar agitación continua por 10 minutos.

III.6.9 Preparación de la Solución placebo.

Pesar 490 mg de placebo de Ungüento de Mupirocina, colocarlos en un beaker de 50 mL y calentar a baño maría hasta fundir la muestra completamente. Agregar 30 mL de solución diluyente con agitación constante y transferirlo a un balón volumétrico aforado de 100 mL, lavar las paredes del beaker con 10 mL de solución diluyente transfiriendo los lavados al mismo balón, agitar en el ultrasónico por 5 minutos y aforar a volumen con metanol.

IV.1 ANALISIS DE RESULTADOS

IV.1.1 Idoneidad del Sistema

La determinación de la Idoneidad del Sistema es un conjunto de ensayos que se realizan para comprobar que un sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para una metodología analítica determinada. Este estudio se realiza antes de que un sistema analítico se utilice por primera vez, y cuando una columna o material de separación de otro fabricante, sea utilizado por primera vez. Se considera como parte integral del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización.

Con el objetivo de realizar el estudio de la idoneidad del Sistema se elaboró una curva de calibración normal para Mupirocina, el rango de concentración de 80 a 120 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, se prepararon en total 5 niveles de concentración y tres réplicas por cada concentración, los detalles de la curva de calibración normal pueden ser observados en los anexos. Posteriormente se calculó el tiempo de retención (Tr), el factor de asimetría (T) y el número de platos teóricos (N). A continuación se muestran los parámetros obtenidos.

Tabla No. 11. Tabla de los parámetros de idoneidad para Mupirocina

	Tiempo de retención (Tr)	Factor de Asimetría USP* (T)	Factor de Capacidad (K')	Número de platos Teóricos (N)
Promedio	3.4	0.96	1.27	5631.5
Desviación Estándar	0.004	0.012	0.011	38.17
Criterio de Aceptación USP*	-	≤ 2	> 1	> 3000
Cumple Si/No	-	Sí	Sí	Si

Los resultados de los parámetros de idoneidad obtenidos con las condiciones cromatográficas establecidas fueron comparados con los valores de los parámetros de aceptación reportados en la USP. Como se puede observar los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación propuestos en la USP.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

IV.1.2 Especificidad

Para realizar el estudio de la especificidad del método se analizaron los cromatogramas del solvente, los ingredientes de los excipientes (placebo) usados en la formulación del Ungüento Mupirocina 2 % así como el cromatograma del estándar del principio activo del ungüento Mupirocina. Se realizaron tres inyecciones del solvente y del placebo, tres inyecciones del estándar de Mupirocina así como tres inyecciones de la muestra a analizar. Primero se analizó el solvente con el objetivo de observar que no hubieran interferencia con el pico cromatográfico de interés (fig. 6), seguidamente se analizó el cromatograma correspondiente al placebo (fig. 7) con el propósito de demostrar que no existen interferencias debida a los excipientes, posteriormente se analizó el cromatograma del estándar de Mupirocina (fig. 8). Tal como se observa en la figura No. 8, no existe ninguna interferencia, Finalmente se analizó el cromatograma de la muestra conteniendo Mupirocina para observar la resolución de los picos del activo y los excipientes, como se puede observar en la figura No. 9, los picos tienen muy buena resolución, es decir, se encuentran separados los picos, los excipientes o placebo no interfieren con el pico de interés (Mupirocina).

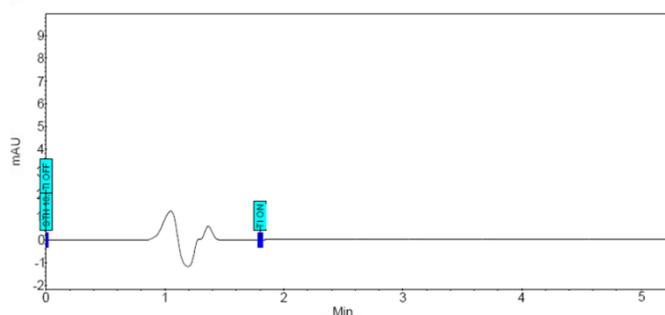


Figura No.6.Cromatograma del solvente

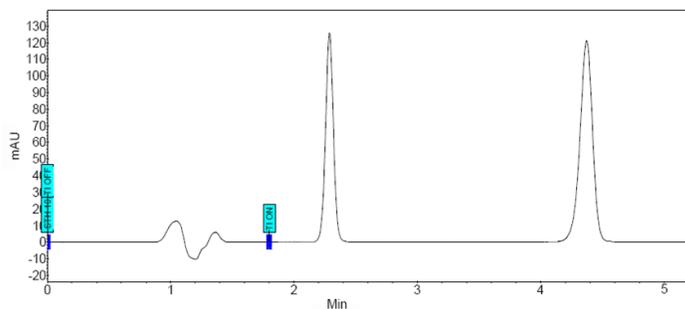


Figura No. 7.Cromatograma del placebo (excipientes)

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

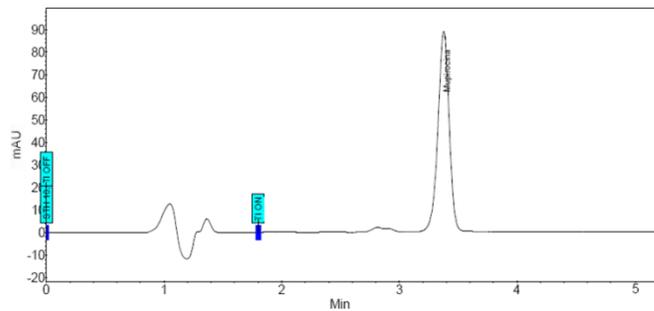


Figura No.8 .Cromatograma del estándar de Mupirocina

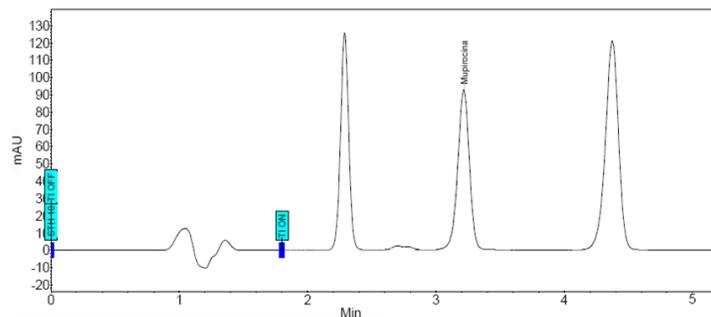


Figura No.9 .Cromatograma de la muestra Mupirocina Ungüento 2 %

El tiempo de retención obtenido del activo de Mupirocina fue de 3.4 min \pm 0.2 minutos tal como se puede observar en la figura No. 9, el tiempo muerto fue de 1.5 min. El tiempo de retención de los excipientes (propilparabeno y metilparabeno) fue 2.3 min y 4.37 min. Se logró observar una diferencia adecuada entre el tiempo de retención del activo y de los excipientes, por lo cual no se observó que ninguna de las señales interfiriera en la determinación o cuantificación de Mupirocina Ungüento, por lo que podemos afirmar que el método es selectivo o específico para la determinación del principio activo.

IV.1.3 Influencia del placebo

Este estudio se realizó con el propósito de comprobar la influencia que ejerce el placebo (interferencia de los excipientes) sobre la curva de calibración normal, ya que en muchos casos se podría generar errores sistemáticos en las determinaciones en caso de que éste provoque alguna influencia o algún efecto en la curva de calibración normal.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Para llevar a cabo dicho estudio se elaboraron dos curvas de calibración normal, una sin tomar en cuenta el placebo y la otra tomando en cuenta el mismo. Los resultados se muestran a continuación en la siguiente tabla.

Tabla No. 12. Datos de las curvas de calibración normal con placebo y sin placebo.

<i>Con placebo</i>		<i>Sin placebo</i>	
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Áreas	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Áreas
80	470.33	80	479.83
90	523.53	90	539.53
100	583.13	100	601.93
110	638.56	110	666.23
120	693.13	120	720.00
r^2	0.9997	r^2	0.9992

A continuación se pueden observar el gráfico elaborado a partir de los datos mostrados en la tabla anterior para el Estándar de Mupirocina con y sin placebo.

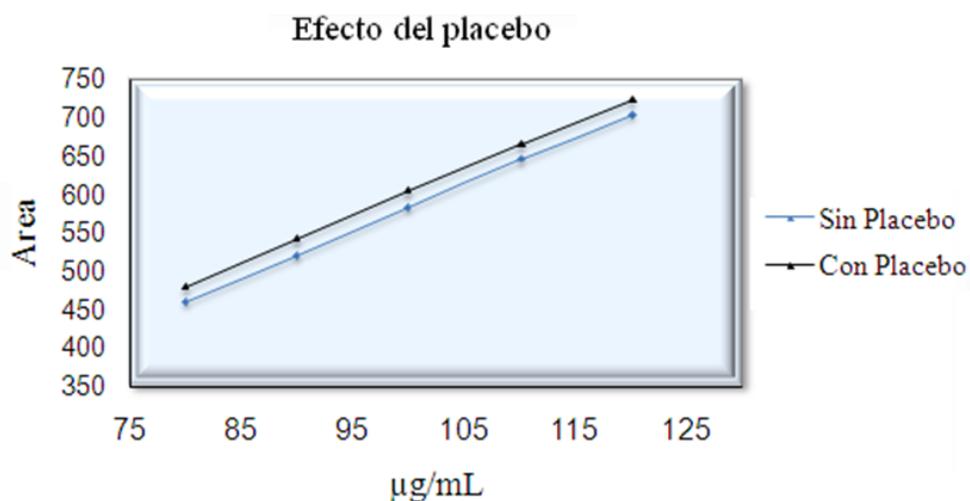


Gráfico No. 1. Gráfico de concentración Vs área para *Mupirocina*

Como se puede observar en el gráfico no existe ningún efecto provocado por los excipientes en la curva de calibración normal (estándar) ya que las rectas obtenidas con y sin placebo son paralelas en ambos casos tanto para Estándar de Mupirocina con Placebo y Estándar de

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Mupirocina sin Placebo. Por tanto la curva de calibración normal podrá ser elaborada tomando en cuenta o no el placebo.

IV.1.4 Linealidad del Sistema y Linealidad del Método

Este estudio se realizó con el objetivo de encontrar el grado de linealidad que existe a lo largo de un buen rango de aplicación, para comprobar la linealidad del sistema se realizó una curva de calibración normal en un intervalo de concentración entre 80 – 120 µg/mL para Mupirocina, los datos se muestran en la tabla No.5.

El valor del coeficiente de determinación (r^2) obtenido para Mupirocina fue: 0.9994 linealidad ideal del sistema lo que indica un valor de coeficiente de determinación igual a 100 % ($r^2 = 1$),

A demás de evaluar la linealidad del Sistema a través de la curva de calibración normal se evaluó la linealidad del Método por medio de una curva de calibración normal dentro del mismo rango de concentraciones de (80-120 µg/mL) para Mupirocina los datos se muestran en la tabla No 5.

Tabla No .13. Datos de las curvas de calibración normal para Mupirocina

Linealidad del Sistema Mupirocina	
Concentración µg/mL	Área
80	479,83
90	539,53
100	601,93
110	666,23
120	720,46

Tabla No .14. Resultados de la linealidad del sistema.

PARAMETRO ESTADISTICO	RESULTADOS
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	0.2233
Coefficiente de correlación	0.9997
Coefficiente de determinación	0.9994
Valor del Intercepto	-6.36
Valor de la pendiente	6.08
Intervalo de confianza para el intercepto	-35.06 a 22.34
Intervalo de confianza de la pendiente	5.79 a 6.36
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	68.07 > 2.16 (t tab)
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto	-0.70 < 2.16 (t tab)
Test de Cochran	0.50 < 0.68 (G tab)

Como el valor de r^2 obtenido experimentalmente es cercano a la unidad se puede decir que existe una excelente linealidad, es decir existe una fuerte correlación entre las áreas obtenidas como función de la concentración inyectada.

Tabla No .15. Datos de las curvas de calibración normal para Mupirocina

Linealidad del Método Mupirocina	
Concentración µg/mL	Área
80	471,18
90	523,93
100	587,48
110	641,66
120	695,46

Tabla No .16. Resultados de la linealidad del método.

PARAMETRO ESTADISTICO	RESULTADOS
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	0.2131
Coefficiente de correlación	0.9996
Coefficiente de determinación	0.9991
Valor del Intercepto	17.65
Valor de la pendiente	5.66
Intervalo de confianza para el intercepto	-13.63 a 48.93
Intervalo de confianza de la pendiente	5.35 a 5.97
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	58.18 > 2.16 (t tab)
Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto	1.79 < 2.16 (t tab)
Test de Cochran	0.53 < 0.68 (G tab)

El valor del coeficiente de determinación (r^2) obtenido para la linealidad del sistema y del método fueron valores cercanos a la unidad 0.9994 y 0.9991 respectivamente ($r^2 = 1$) es decir casi 100 %, entonces podemos afirmar que existe una fuerte correlación entre la variable dependiente (Áreas) y la variable independiente (Concentración) para ambas linealidades, es decir el sistema y el método tiene una excelente linealidad en el rango de aplicación seleccionado para Mupirocina. Ver gráficos N° 2 y 3.

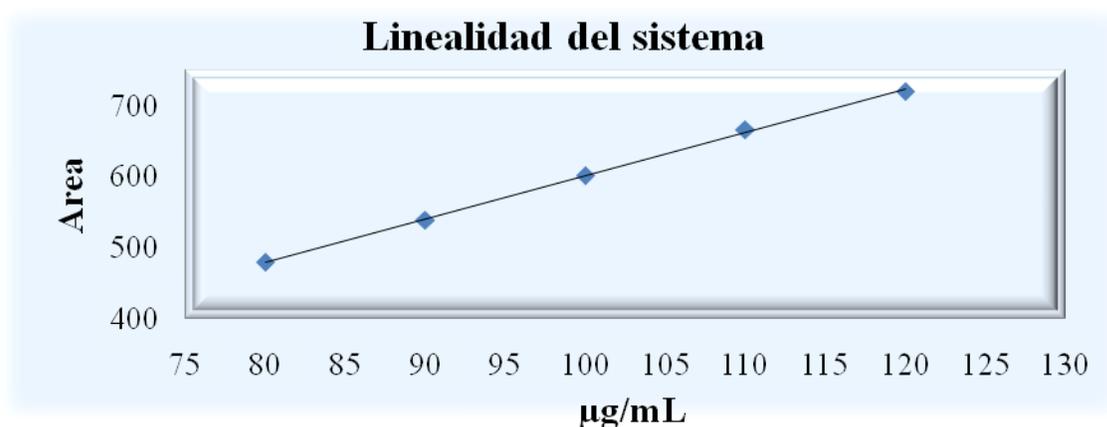


Gráfico No. 2 Linealidad del Sistema para Mupirocina

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

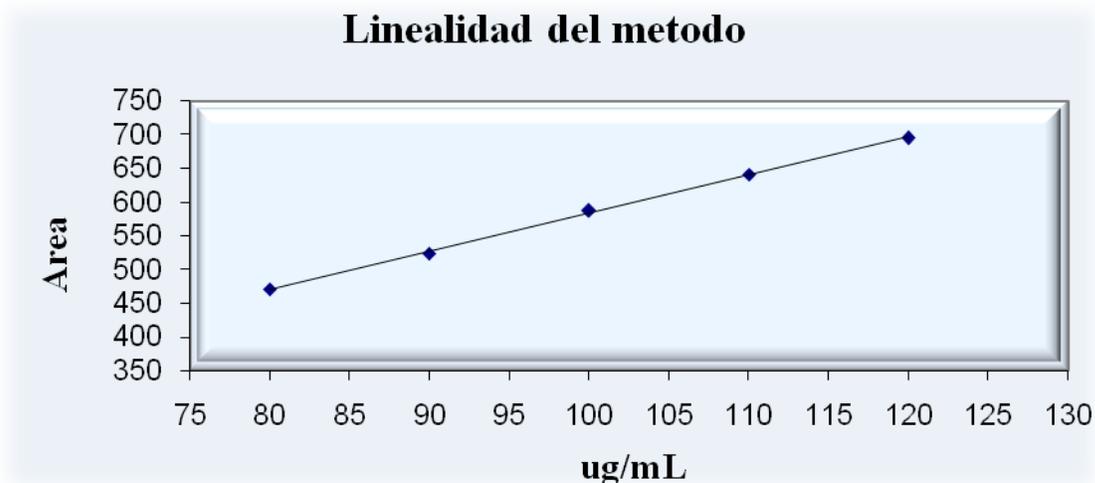


Gráfico No.3 Linealidad del Método para Mupirocina

IV.1.5 Precisión del Sistema y Precisión del Método

La precisión del sistema se llevo a cabo realizando cinco inyecciones de tres estándares a tres niveles de concentraciones diferentes, 80, 100 y 120 $\mu\text{g/mL}$ para Mupirocina, seguidamente se calculó el factor de respuesta ($\text{FR} = \text{Área}/\text{Concentración}$) para cada estándar, posteriormente se calculó el promedio y la desviación estándar correspondiente a cada estándar, para finalmente calcular el %RSD por medio del cual se evalúa la precisión del sistema. Los resultados se muestran a continuación en las siguientes tablas.

Tabla No.17. Resultados del estudio de precisión del Sistema para *Mupirocina*

Réplicas	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	80	100	120
1	461,9	570,4	682,5
2	460,1	574,3	684,8
3	462,5	572,9	683,1
4	464,1	571,9	681,9
5	460,7	573,5	687,9
FR(Y/X)	5,77	5,7	5,69
	5,75	5,74	5,71
	5,78	5,73	5,69
	5,8	5,72	5,68
	5,76	5,74	5,73
<i>Promedio</i>	5,77	5,73	5,7
<i>Desv. Est.</i>	0,02	0,02	0,02
C.V.	0,34	0,26	0,35

De igual manera se realizó el estudio de la precisión del método con la única diferencia que se le agregó a cada estándar una cantidad de muestra previamente tratada para realizar las inyecciones en los niveles de concentración de 80, 100 y 120 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos se pueden observar en las siguientes tablas.

Tabla No. 18. Resultados del estudio de precisión del Método para *Mupirocina*

Réplicas	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	80	100	120
1	482.8	608	721.6
2	485.2	605.4	729.1
3	484.7	602.1	722.7
4	486.4	605.6	723.9
5	486.8	604.9	721.7
FR	6.04	6.08	6.01
	6.07	6.05	6.08
	6.06	6.02	6.02
	6.08	6.06	6.03
	6.09	6.05	6.01
<i>Promedio</i>	6.06	6.05	6.03
<i>Desv. Est.</i>	0.02	0.02	0.03
%RSD	0.33	0.35	0.43

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Como se puede observar se obtuvieron valores de %RSD menores al 1% lo cual indica una excelente precisión. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que tanto el Sistema como el Método de Mupirocina presentan excelente precisión.

IV.1.6 Exactitud del Método

Para llevar a cabo el estudio de la exactitud del método se realizaron lecturas de cinco estándares (cinco niveles de concentración) de concentraciones perfectamente conocidas de Mupirocina, realizándose cinco réplicas para cada una de ellas, posteriormente se determinó el porcentaje de recuperación para evaluar la exactitud del método. Al mismo tiempo se realizó el test de COCHRAN para evaluar si las varianzas del %R de los cinco niveles de concentración son homogéneas es decir para evaluar la precisión del %R. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla No. 19. Resultados de la exactitud del método para Mupirocina

Concentración Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	80	90	100	110	120
Réplicas	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)				
1	80.47	89.62	101.35	110.25	120.09
2	80.3	89.55	100.91	110.63	119.69
3	80.63	89.65	100.98	110.32	119.48
4	80.16	89.53	100.7	110.19	119.84
5	80.19	89.53	100.40	110.33	119.54
Promedio	80.35	89.58	100.87	110.35	119.73
Desv. Estd	0.20	0.06	0.35	0.17	0.25
%R	100.44	99.53	100.87	100.31	99.77
Desv Est %R	0.25	0.06	0.35	0.16	0.21
IC %R	100.44 ± 0.25	99.53 ± 0.06	100.87 ± 0.35	100.31 ± 0.16	99.77 ± 0.21
Varianza %R	0.062	0.004	0.123	0.024	0.043
Suma de Var %R	0.257				
Var máxima	0.062				
G_{cal}	0.24		Como $G_{\text{cal}} < G_{\text{tab}} (\alpha = 0.05, K = 5, n = 5)$, entonces No hay diferencias significativas entre las varianzas del %R de los 5 niveles de concentración		
$G_{\text{tab}} (\alpha = 0.05, K = 5, n = 5)$	0.68				

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Como se puede observar los resultados de %R obtenidos en los cinco niveles de concentración tienen igual precisión, por tanto, el valor de %R a reportar será el promedio. Se puede observar el %R total o promedio con su desviación estándar los cuales son usados para determinar el intervalo de confianza del %R ($\bar{X} \pm S$) y la precisión expresada como %RSD.

Tabla No. 20. Porcentaje de Recuperación (%R) con su intervalo de confianza y precisión para Mupirocina.

%R _{total} (promedio)	Desviación estándar total	IC del %R _{total}	%RSD
100.18	0.535	100.18 ± 0.535	0.534

Como se puede observar el valor del %R se encuentra dentro del criterio de aceptación de la USP el cual propone que éste debe estar dentro del rango de 97 a 103 %. Por lo tanto podemos afirmar que el método presenta buena exactitud para la determinación de Mupirocina.

A continuación se muestra el gráfico elaborado de concentraciones teóricas Vs concentraciones experimentales para Mupirocina.

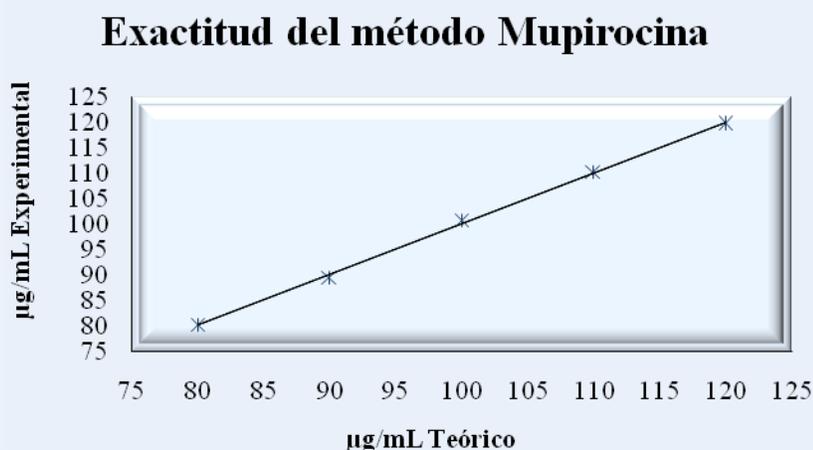


Gráfico No. 4. Gráfico de valuación de la exactitud del Método para **Mupirocina**

Como se puede observar en el gráfico No. 4 para Mupirocina representan una línea recta con coeficiente de determinación de 0.9989, por lo que podemos afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración teóricos y experimentales es decir el método presenta una muy buena exactitud para la determinación de Mupirocina.

IV.1.7 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis como HPLC es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos clásicos. Uno de los principales problemas que se presentan cuando se trabaja a bajos niveles de concentración se da a la hora de informar sobre la presencia o ausencia de un analito determinado por esta razón es muy importante llevar a cabo la determinación tanto del límite de detección como del límite de cuantificación, esto se realizó utilizando la desviación estándar del intercepto y la pendiente de la curva de calibración normal elaborada con estándares de Mupirocina, las concentraciones utilizadas en la curva de calibración normal se encuentra cercana a la señal del blanco.

Los datos se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla No.21. Datos de las curvas de calibración normal para Mupirocina utilizadas para calcular el LD y el LC.

Mupirocina	
Concentración µg/mL	Área
1.0	7.60
2.5	18.6
5.0	35.83
7.5	41.03
8	50.47
b₁	5,57
S_{b0}	1.13

Para el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación se usaron las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.29 \times Sb_0}{b_1} \quad \text{Ec. (1)}^{14}$$

$$LC = \frac{10 \times Sb_0}{b_1} \quad \text{Ec. (2)}^{14}$$

Donde S_{b0} es la Desviación estándar del intercepto de la curva de calibración normal y b_1 es la pendiente de la curva de calibración normal.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, como se puede observar los valores encontrados son muy pequeños (tabla N° 22), lo que indica que el límite de detección y cuantificación están alejados de la concentración de trabajo. (Ver cromatogramas en anexo N°2).

Tabla No. 22. Resultados del LD y LC para Mupirocina

	Mupirocina
Límite de Detección (L.D.)	0.67 µg/mL
Límite de Cuantificación (L.C.)	2.02 µg/mL

IV.1.8 Repetibilidad del método

Para llevar a cabo el estudio de la Repetibilidad del método se realizaron lecturas de un estándar por cinco días consecutivos, realizándose nueve réplicas para cada una de ellas, posteriormente se realizó el test de Bartlett para evaluar si las varianzas de los cinco días son homogéneas es decir para evaluar la precisión de los días. Al mismo tiempo se aplicó análisis de un Factor (ANOVA) para verificar si existen diferencias significativas entre las medias de cada día. Finalmente se elaboro un Grafico de Control para comprobar si los días son repetibles. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla No. 23. Lecturas de los cinco días consecutivos de Mupirocina, para determinar las varianzas.

Mupirocina					
Replica	Días				
	1	2	3	4	5
1	579,5	584,2	581,6	583,2	580,8
2	580	583,2	584,6	583,7	585,3
3	583,7	584,2	586,2	582,4	586,7
4	581,2	581,8	586,3	581,3	586,1
5	578,6	581,5	585,3	582,6	585,4
6	579,2	582,1	576,3	584,7	583,7
7	583	580,1	585,1	582,2	583,2
8	583,7	579,5	584,8	582,7	582,5
9	582,7	587,1	578,5	585,1	584,6
Desv. Std	2,03	2,34	3,59	1,219	1,88
Media	581,29	582,63	583,19	583,1	584,26
CV	0.35	0.4	0.62	0.21	0.32
Varianzas	4,126	5,46	12,93	1,485	3,543
Grados de libertad	8	8	8	8	8
$M = X^2_{cal}$	2.34	Como $M_{cal} < M_{tab} (\alpha = 0.5, K = 5, n = 8)$, entonces No hay diferencias significativas entre las varianzas de los días consecutivos			
X^2_{tab}	16.919				

Como se puede observar los resultados obtenidos no hay diferencias entre las varianzas de las series de cada día, es decir, las varianzas son homogéneas por lo tanto podemos afirmar que los días consecutivos presentan buena precisión.

Tabla No. 24. Lecturas de los días consecutivos de Mupirocina, para determinar las medias.

Replica	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Σ Entre días
1	579,5	584,2	581,6	583,2	580,8	2909,3
2	580	583,2	584,6	583,7	585,3	2916,8
3	583,7	584,2	586,2	582,4	586,7	2923,2
4	581,2	581,8	586,3	581,3	586,1	2916,7
5	578,6	581,5	585,3	582,6	585,4	2913,4
6	579,2	582,1	576,3	584,7	583,7	2906
7	583	580,1	585,1	582,2	583,2	2913,6
8	583,7	579,5	584,8	582,7	582,5	2913,2
9	582,7	587,1	578,5	585,1	584,6	2918
Σ Dentro días	5231,6	5243,7	5248,7	5247,9	5258,3	26230,2

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Tabla No. 25. Resultados de Análisis de Varianzas de un Factor (ANOVA)

Fuente de variación	SC	GL	MS	Fc	valor crítico F
SS Entre días	41,65	4	10,412	1,89	2,61
SS Dentro días	220,32	40	5,508	Como $F_{cal} < F_{tab} (\alpha = 0.5, K = 5, n = 40)$, entonces No hay diferencias significativas entre las medias de los días consecutivos	
Total	261,97	44,00			

Como se puede observar los resultados obtenidos hay igualdad entre las medias de las series de cada día, es decir, las medias son homogéneas por lo tanto podemos calcular el intervalo de confianza al 97.5 % utilizando la ecuación (3) que se muestra a continuación. Los resultados se pueden observar en la tabla No. 16

$$IC = \bar{X} \pm t_{0.025} S/\sqrt{n} \quad Ec. (3)$$

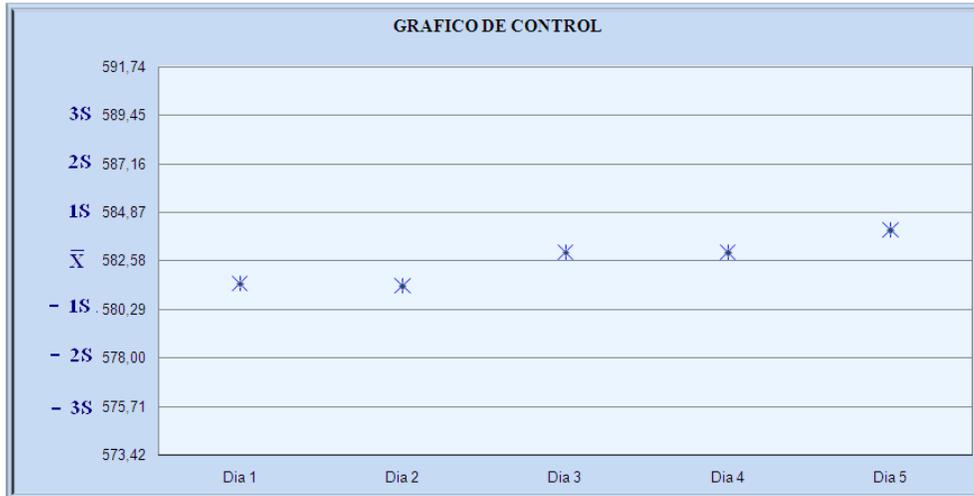
Tabla No. 26. Resultados del intervalo de confianza de cada día.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Media	581,289	582,633	583,189	583,100	584,256
Desv Est	2,031	2,337	3,595	1,219	1,882
n	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000
LCS	582,850	584,429	585,952	584,037	585,702
LCI	579,728	580,837	580,425	582,163	582,809
μ	581,288 ± 1,561	582,63 ± 1,796	583,188±2,76	583,1 ± 0,936	584,255 ± 1,44

Como se puede observar los resultados los parámetros de las medias están correlacionados ya que están dentro de los límites de tolerancia tal y como se muestra en el gráfico No. 5 los días son Repetibles, por lo que podemos afirmar que toda la serie de resultados de cada día tiene la misma precisión o el mismo grado de dispersión, es decir, tiene una excelente Repetibilidad.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Gráfico No. 5. Gráfico de control de calidad de la Repetibilidad durante 5 días consecutivos.



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

V. CONCLUSIONES.

1. Se comprobó la idoneidad del sistema obteniéndose parámetros aceptables que cumplen con los criterios de aceptación que establece la USP, como son factor de capacidad, factor de asimetría y número de platos teóricos.
2. Se demostró que la metodología para la determinación de Mupirocina Ungüento es selectiva frente a los excipientes, pues no presentaron picos que interfirieran con el principio activo. Se evidenció que el placebo no ejerce efecto alguno al elaborar la curva de calibración normal, por lo que se puede tomar en cuenta o no el placebo en dicha curva.
3. Se estableció que la metodología analítica para Mupirocina 2 % ungüento es lineal en el intervalo de concentración estudiada, desde 80 $\mu\text{g/mL}$ a 120 $\mu\text{g/mL}$ obteniéndose el coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.999$ tanto para el sistema como para el método. Los resultados obtenidos para la precisión del sistema y del método fueron satisfactorios, ya que los valores obtenidos de RSD de los factores de respuesta fueron menores al 1 %, lo que indica que el sistema y el método presenta una buena precisión, es decir, los valores no se encuentran muy dispersos.
4. La metodología analítica presentó excelente exactitud, evaluándose mediante inyecciones de cinco niveles de concentración perfectamente conocidas para posteriormente calcular el porcentaje de recuperación media con su coeficiente de variación obteniéndose un valor de % R de 100.18 ± 0.535 , el cual, estuvo dentro del límite establecido que va de 97,0 % a 103,0 %. El Coeficiente de Variación para la Repetibilidad del método fue menor al 1%, las lecturas de cada día presentaron muy buena precisión. Como no hubo diferencias significativas se calculó el intervalo de confianza, demostrando a través del gráfico de control que los todos los valores experimentales están dentro de la zona de aceptación (límite de tolerancia).
5. Al determinar el Límite de Detección se obtuvo valores de 0.67 $\mu\text{g/mL}$ y el Límite de Cuantificación 2.02 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, lo que indica que están alejados de la concentración de trabajo y fuera del rango de trabajo.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la precisión intermedia realizada por dos analistas.
- Estimar la incertidumbre asociada a la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento.
- Realizar el estudio de la estabilidad de la muestra.

VII. BIBLIOGRAFIA

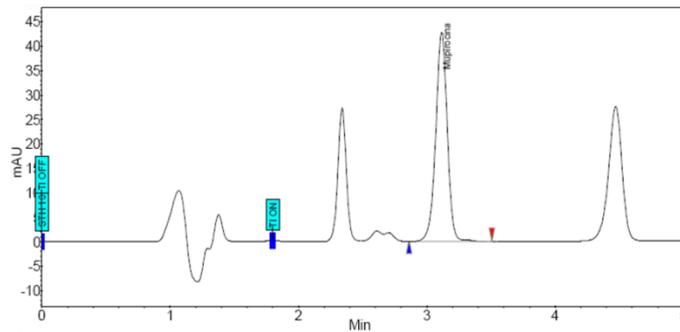
1. Rode H, de Wet PM, Millar AJW, Cywes S. Efficacy of Mupirocin in cutaneous candidiasis (letter). *Lancet* 1991; 338:578.
2. White AR, Beale AS, Boon RJ, et al. Antibacterial activity of mupirocin. In: Dobson RL, Leyden JJ, Noble WC, Price JD, eds. *Current Clinical Practice Series*, Vol. 16. New York: Elsevier Science Publishing, 1985: 19-36.
3. Hughes J, Mellows G. Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Escherichia coli* by pseudomonic acid. *Biochem J* 1987; 176:305-318.
4. De Wet PM, Rode H Steyn LM, Grobler J. Anti-candidal activity of mupirocin-evidence for uptake via an amino-acid transport system. *J Antimicrob Chemother* 1995;36:1107-1108.
5. Rode H, Hanslo D, de Wet PM, et al. Efficacy of mupirocin in methicillinresistant *Staphylococcus aureus* burn wound infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1358-1361.
6. Brook I. Microbiology of secondarily infected diaper dermatitis. *Int J Dermatol* 1992; 31:700-702.
7. Dixon PN, Warin RP, English MP. The role of *Candida albicans* infection in napkin rashes. *Br Med J* 1969; 2:23-27.
8. Longhi F, Carlucci G, Belucci R, et al. Diaper dermatitis: a study of contributing factors. *Contact Dermatitis* 1992;26:248-252.
9. Rouessac Francis and Rouessac Annick, *Chemical Analysis, Modern Instrumentation and Techniques*, Second edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
10. Badillo Arlene M. “Validación de Procesos” Diplomado de Buenas Prácticas de Manufactura 2005.
11. Quattrocchi Oscar Alberto, Abelaria de Andrizzi Sara Inés, Laba Raúl Felipe, “Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica”. Artes Gráficas y Farro S.A.1992.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

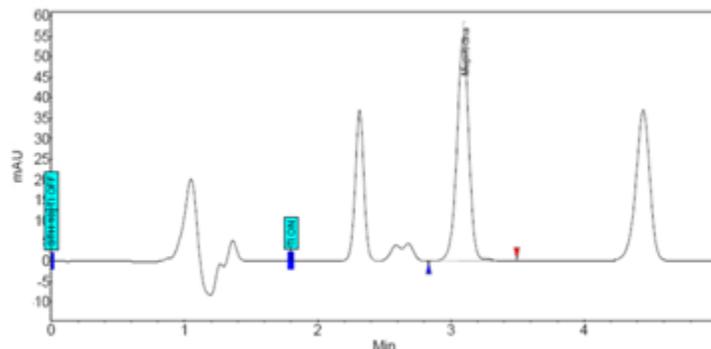
12. Guillén Corrales Glenda Vanesa, Pavón Villanueva Tania Martina, Chamorro Bautista Ronald José (Tutor), “Validación de un método de análisis cuantitativo de Acetaminofén, diclofenac sódico, dipirona, fluconazol, piroxicam, (materia prima) por HPLC”. Tesis (Lic. En farmacia y Química). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León 1999.
13. Chacón Jorge. “Curso teórico práctico en aspectos técnicos del control de calidad interno del laboratorio de análisis”. CIRA/UNAN-Managua. 1999.
14. Delgado Gustavo. “Principios de estadística y técnicas de validación”. UNAN-León. 1999.
15. Riley Christopher and Rosanske Thomas W. “Development and Validation of Analytical Methods”. Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Volume 3. 1996.
16. Taylor John. AnalChem 55(1983) 600A-608A.
17. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.42:07. Productos farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica. Editado por Ministerio de Economía, MINECO, Ministerio de fomento industria y comercio, MIFIC, Ministerio de economía, industria y comercio, MEIC, Consejo Nacional de ciencias y tecnología, CONACYT, Secretaria de industria y comercio, SIC.
18. Rossotti Irving HM HS. Methods for computing successive stability constants from experimental formation curves J. Chem Soc 1953; 3397-3405.
19. USP Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 32_NF 27

ANEXOS

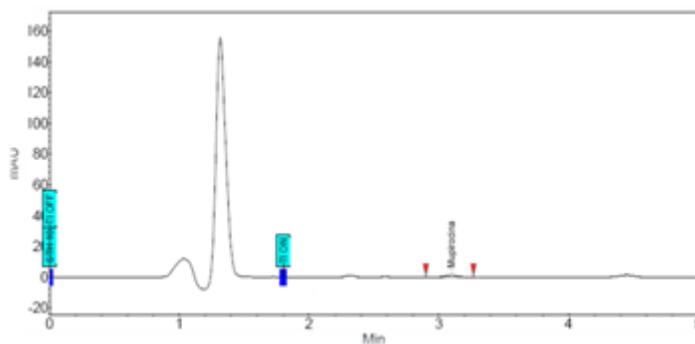
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo 1.**Cromatogramas de la selectividad frente a productos de degradación.***Figura No.10 .Cromatograma de la muestra sometida a Hidrólisis Acida.*

Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

Figura No.11 .Cromatograma de la muestra sometida a Oxidación.

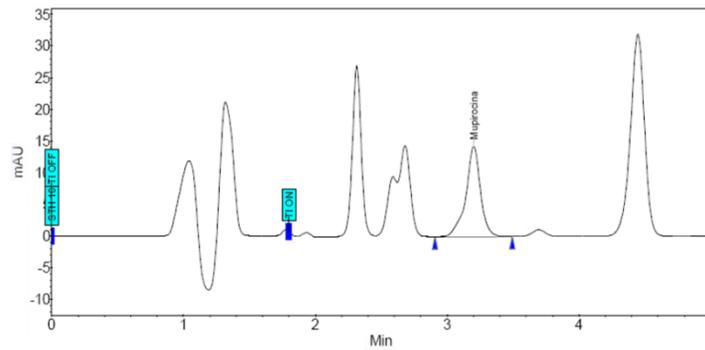
Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

Figura No.12 .Cromatograma de la muestra sometida a Hidrólisis Alcalina.

Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

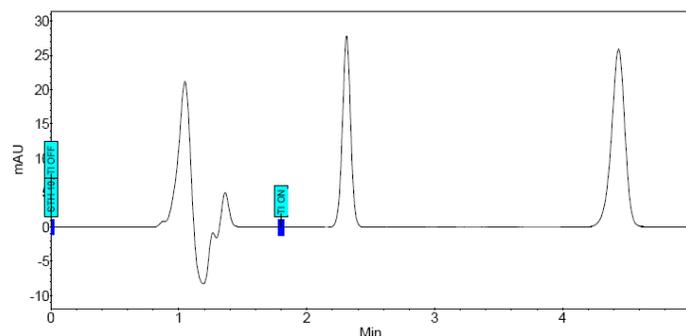
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Figura No.13 .Cromatograma de la muestra sometida a Termólisis.



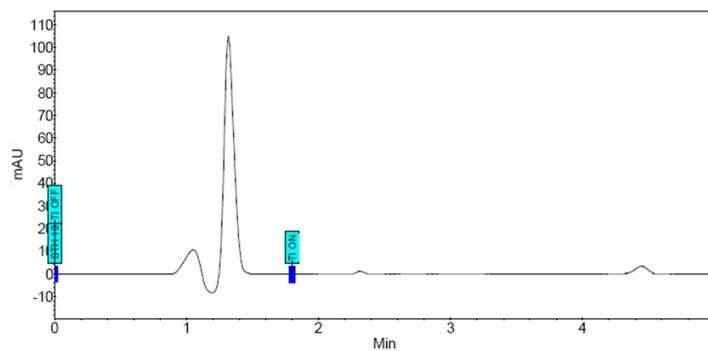
Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

Figura No.14 .Cromatograma del placebo sometida a Hidrólisis Ácida.



Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

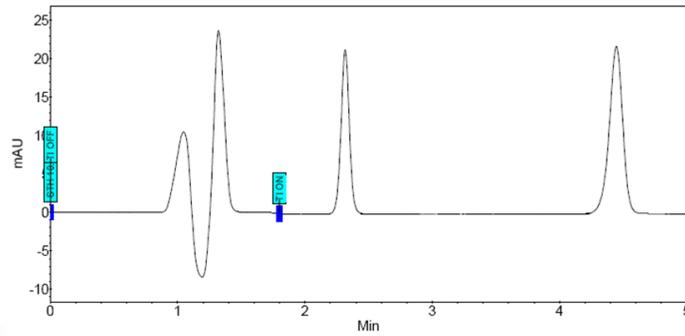
Figura No.15 .Cromatograma del placebo sometida a Hidrólisis Alcalina.



Fuente: Cromatografía Líquida de alta presión.

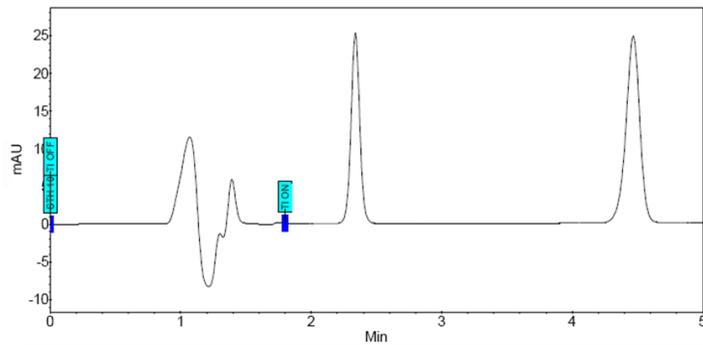
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Figura No.16 .Cromatograma del placebo sometida a Oxidación.

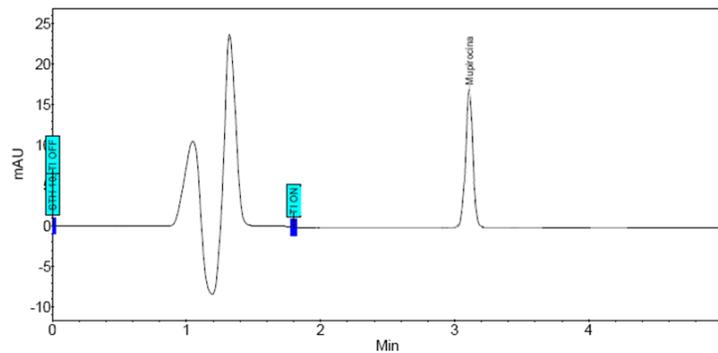


Fuente: Cromatograma Líquido de alta presión.

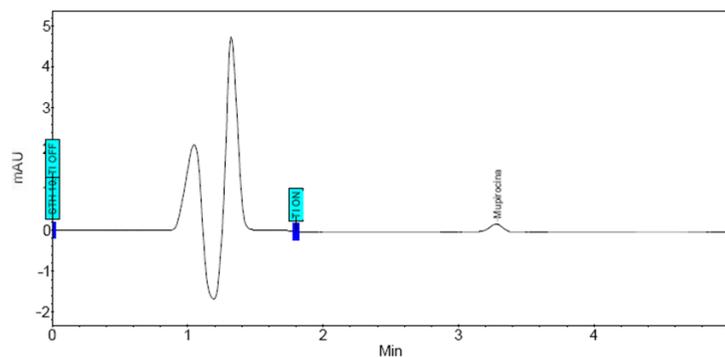
Figura No.17 .Cromatograma del placebo sometida a Termólisis.



Fuente: Cromatograma Líquido de alta presión.

Anexo 2.**Cromatogramas de la Límite de detección y Límite de cuantificación.***Figura No.18. Cromatograma de Limite de Cuantificación.*

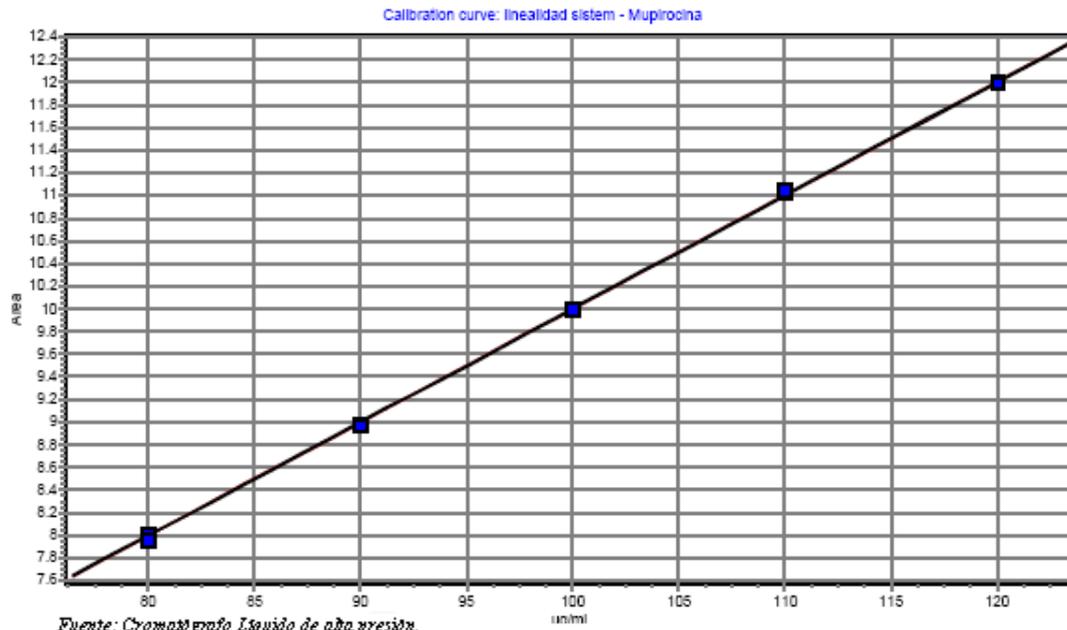
Fuente: Cromatografo Liquido de alta presión.

Figura No.19. Cromatograma de Limite de Detección.

Fuente: Cromatografo Liquido de alta presión.

Anexo 3. Curva de Calibración Normal.

Figura No.20 .Curva de calibración normal de Mupirocina por HPLC Varian.



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo 4.

Resultados de los Cálculos en Excel.

4.1 Idoneidad del Sistema.

4.2 Linealidad del Sistema

4.3 Linealidad del Método

4.4 Exactitud

4.5 Repetibilidad

Anexo 4.1 Tabla de la Idoneidad del sistema

Mupirocina						
µg/mL	Tiempo de retención (Tr)	Factor de Asimetría(T)	Ancho (W)	Factor de capacidad (K')	Números de platos teóricos (N)	Tiempo muerto
80	3.38	0.96	0.18	1.27	5641.68	1.49
80	3.38	0.97	0.18	1.27	5641.68	1.49
80	3.38	0.93	0.18	1.27	5641.68	1.49
80	3.39	0.95	0.18	1.28	5676.11	1.49
80	3.38	0.96	0.18	1.27	5641.68	1.49
90	3.38	0.96	0.18	1.27	5641.68	1.49
90	3.38	0.92	0.18	1.27	5641.68	1.49
90	3.38	0.93	0.18	1.27	5641.68	1.49
90	3.38	0.93	0.18	1.27	5641.68	1.49
90	3.37	0.93	0.18	1.26	5608.35	1.49
100	3.38	0.97	0.18	1.27	5641.68	1.49
100	3.38	0.94	0.18	1.27	5641.68	1.49
100	3.38	0.95	0.18	1.27	5641.68	1.49
100	3.38	0.94	0.18	1.27	5641.68	1.49
100	3.37	0.93	0.18	1.26	5608.35	1.49
110	3.38	0.93	0.18	1.27	5641.68	1.49
110	3.38	0.95	0.18	1.27	5641.68	1.49
110	3.37	0.93	0.18	1.26	5608.35	1.49
110	3.37	0.95	0.18	1.26	5608.35	1.49
110	3.37	0.93	0.18	1.26	5608.35	1.49
120	3.37	0.92	0.18	1.26	5608.35	1.49
120	3.37	0.96	0.18	1.26	5608.35	1.49
120	3.38	0.94	0.18	1.27	5641.68	1.49
120	3.37	0.95	0.18	1.26	5608.35	1.49
120	3.37	0.95	0.18	1.26	5608.35	1.49
Promedio	3.38	0.94	0.18	1.27	5631.02	1.49

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo 4.2 Tabla de la Linealidad del sistema

Linealidad del sistema						Mupirocina	
	80	90	100	110	120	mg/mL	Área
	480.75	539.59	605.25	665.96	722.35	80	479.83
	479.75	540.25	602.75	668.16	720.05	90	539.53
	481.65	539.81	603.15	666.36	718.85	100	601.93
	478.95	539.23	601.55	665.66	720.92	110	666.23
	479.15	540.15	599.85	666.46	719.17	120	720.46
	478.75	538.16	599.05	664.76	721.42	R	0.9996
Promedio	479.83	539.53	601.93	666.23	720.46	R2	0.9993
						a	-6.36
						b	6.07

4.2.1 Factores de respuesta de la Linealidad del sistema.

Factor de repuesta					
	6.00	5.99	6.05	6.05	6.02
	5.99	6.00	6.03	6.07	6.00
	6.02	5.99	6.03	6.06	5.99
	5.99	5.99	6.02	6.05	6.01
	5.99	6.00	5.99	6.06	5.99
	5.98	5.98	5.99	6.04	6.01
promedio	6.00	5.99	6.02	6.06	6.00
Desv. Estandar	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
C.V.	0.24	0.14	0.38	0.17	0.19
Varianza	0.0002	0.0001	0.0005	0.0001	0.0001
Varianza max	0.0005				
G exp	0.50				

4.2.2 Criterios de aceptación de la Linealidad del sistema.

Coefficiente de correlación múltiple	0.9996
Coefficiente de determinación R²	0.9994
Intercepto	-6.36
Pendiente	6.07
Promedio	6.01
Desv. Estandar	0.01
C.V.	0.22
Test del intercepto	-0.70
Test de la pendiente	68.07
Intervalo de confianza para intercepto	35,06 a 22,34
Intervalo de confianza para pendiente	5,79 a 6,36
Varianza max	0.0005
G exp	0.50

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo 4.3 Tabla de la Linealidad del método.

Linealidad del método					
	80	90	100	110	120
	472.1	524.1	590.8	641.4	697.4
	471.1	523.7	588.3	643.6	695.1
	473	524.3	588.7	641.8	693.9
	470.3	523.6	587.1	641.1	696.0
	470.5	523.6	585.4	641.9	694.2
	470.1	524.3	584.6	640.2	696.5
Promedio	471.18	523.93	587.48	641.67	695.51

Mupirocina	
mg/mL	Área
80	471.18
90	523.93
100	587.48
110	641.66
120	695.46
R	0.9995
R2	0.9991
a	17.65
b	5.66

4.3.1 Factores de respuesta de la Linealidad del método.

Factor de respuesta					
	5.90	5.82	5.91	5.83	5.81
	5.89	5.82	5.88	5.85	5.79
	5.91	5.83	5.89	5.83	5.78
	5.88	5.82	5.87	5.83	5.80
	5.88	5.82	5.85	5.84	5.79
	5.88	5.83	5.85	5.82	5.80
promedio	5.89	5.82	5.87	5.83	5.80
Desv. Estandar	0.01432691	0.003762496	0.02278084	0.01024762	0.011260026
C.V.	0.2432499	0.064631251	0.38776998	0.17567353	0.194275626
Varianza	0.00020526	1.41564E-05	0.00051897	0.00010501	0.000126788
Varianza max	0.0005				
G exp	0.53				

4.3.2 Criterios de aceptación de la Linealidad del método.

Coeficiente de correlación múltiple	0.9995
Coeficiente de determinación R²	0.9991
Intercepto	17.65
Pendiente	5.66
Promedio	5.84
Desv. Estandar	0.01
C.V.	0.21
Test del intercepto	1.79
Test de la pendiente	58.18
Intervalo de confianza para intercepto	-13,63 a 48,93
Intervalo de confianza para pendiente	5,35 a 5,97
Varianza max	0.0005
G exp	0.53

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo 4.4 Tabla de la exactitud.

Área de las muestras				
80	90	100	110	120
477.66	531.98	601.59	654.42	712.83
476.65	531.55	598.98	656.67	710.45
478.59	532.14	599.39	654.83	709.2
475.81	531.43	597.73	654.06	711.34
475.99	531.45	595.95	654.89	709.56
Concentración Experimental				
80.47	89.62	101.35	110.25	120.09
80.30	89.55	100.91	110.63	119.69
80.63	89.65	100.98	110.32	119.48
80.16	89.53	100.70	110.19	119.84
80.19	89.53	100.40	110.33	119.54

4.4.1 Criterios de aceptación de la Exactitud.

Coefficiente de correlación múltiple	0.9993
Coefficiente de determinación R²	0.9987
Intercepto	0.98
Pendiente	0.99
Test del intercepto	0.48
Test de la pendiente	49.11
Intervalo de confianza para intercepto	-5.50 a 7.47
Intervalo de confianza para pendiente	0.93 a 1.05
G exp	0.53

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

4.5 Tablas de la Repetibilidad

Mupirocina					
Replica	Días				
	1	2	3	4	5
1	579.5	584.2	581.6	583.2	580.8
2	580	583.2	584.6	583.7	585.3
3	583.7	584.2	586.2	582.4	586.7
4	581.2	581.8	586.3	581.3	586.1
5	578.6	581.5	585.3	582.6	585.4
6	579.2	582.1	576.3	584.7	583.7
7	583	580.1	585.1	582.2	583.2
8	583.7	579.5	584.8	582.7	582.5
9	582.7	587.1	578.5	585.1	584.6
CV	0.35	0.40	0.62	0.21	0.32
Desv STD	2.03	2.34	3.60	1.22	1.88
media	581.29	582.63	583.19	583.1	584.26
varianzas	4.13	5.46	12.93	1.49	3.54
vi =n-1	8	8	8	8	8
vi LnSi	2.83	3.39	5.12	0.79	2.53
h = # series	5	$X_{0.95}=1-\alpha$ $\alpha = 1-0.95$ $\alpha = 0,05$ $X^2= 16.919$			
n= # lecturas	9				
N=n*h	45				
Vi =N-h	40				
S ² CONJ	2.21				
$\sum 1/vi$	0.63				
$1/\sum vi$	0.13				
3(k-1)	12				
C	1.04				
1/C	0.96				
$\sum vi \text{ LnSi}^2$	29.34	Crterios: Si $M < X^2_{0.95}$ las varianzas son homogéneas $2.34 < 16.919$ las varianzas son homogéneas, toda la serie de resultados tiene la misma precisión, es decir, que tienen el mismo grado de dispersión.			
$\sum vi \text{ Ln } S^2_{CONJ}$	31.77				
M	2.34				

4.5.1 Tabla de sumatoria de los valores de Repetibilidad.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	9	5231.6	581.29	4.13
Columna 2	9	5243.7	582.63	5.46
Columna 3	9	5248.7	583.19	12.93
Columna 4	9	5247.9	583.10	1.49
Columna 5	9	5258.3	584.26	3.54

$$M = 1/C \left[\sum_{i=1}^k v_i \text{ Ln} S^2 - \sum_{i=1}^k v_i \text{ Ln} S_i^2 \right]$$

$$C = 1 + \frac{\sum \left(\frac{1}{v_i} \right) - \left(\frac{1}{\sum v_i} \right)}{3(k-1)}$$

$$S^2 = \frac{\sum v_i S_i^2}{\sum v_i}$$

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACION DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo N°5
Robustez del ensayo de Mupirocina

Longitud de onda	243 nm	240 nm	237 nm
Porcentaje de recuperación	98.68	97.71	98.22
	98.57	97.55	98.20
	98.62	97.71	98.18
Promedio	98.63	97.65	98.2
CV	0.06	0.09	0.02

Temperaturas	35 °C	40°C
Porcentaje de recuperación	98.36	97.44
	98.20	97.48
	98.01	97.51
Promedio	98.19	97.47
CV	0.18	0.04

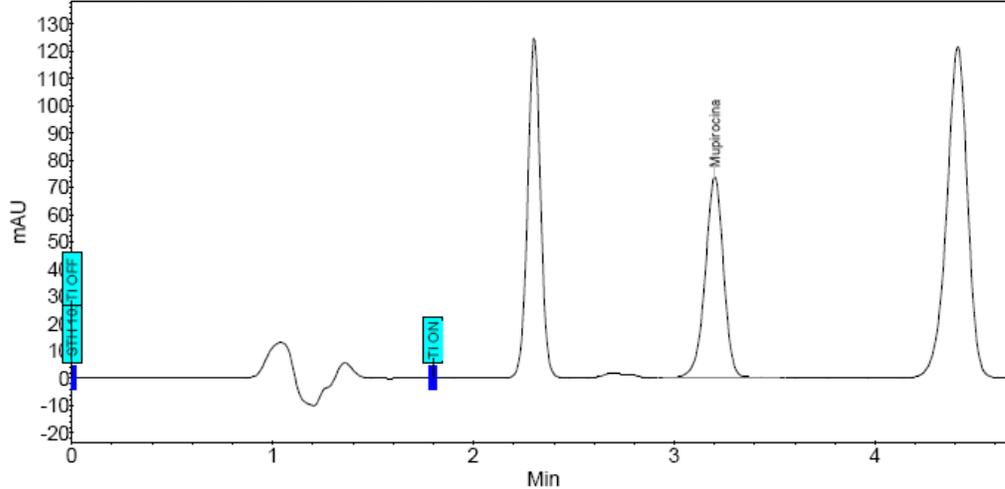
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo N° 6

Cromatograma de la linealidad del método

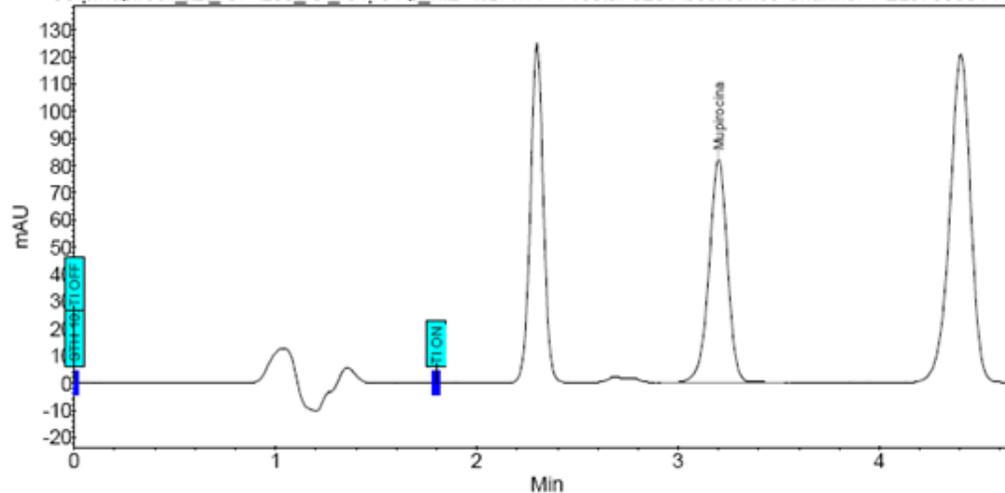
Validación de Mupirocina Linealidad del metodo Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
29/07/2009 01:43:24 p.m.

80%Mupirocina29_07_2009_01_37_44 p.m.1_1.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

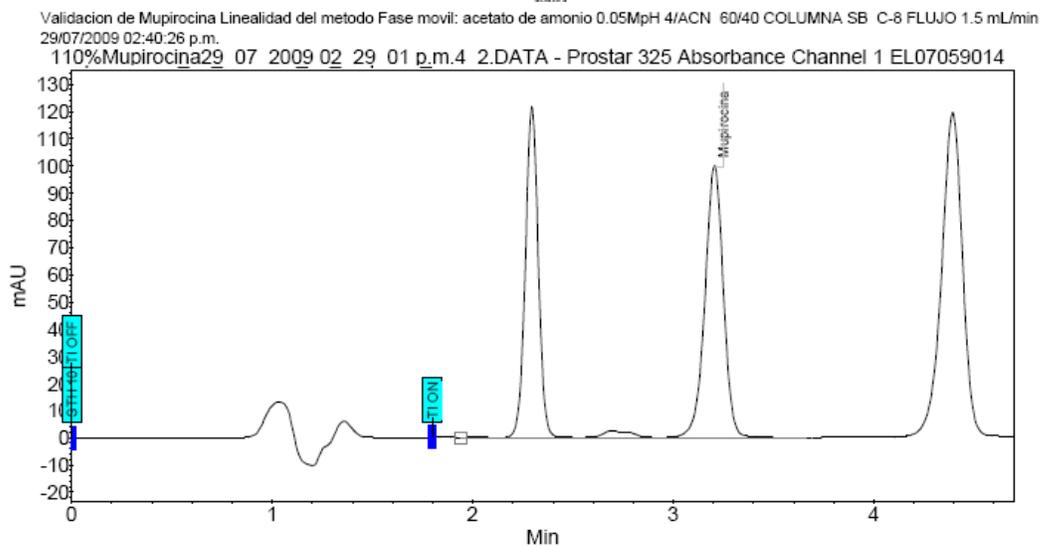
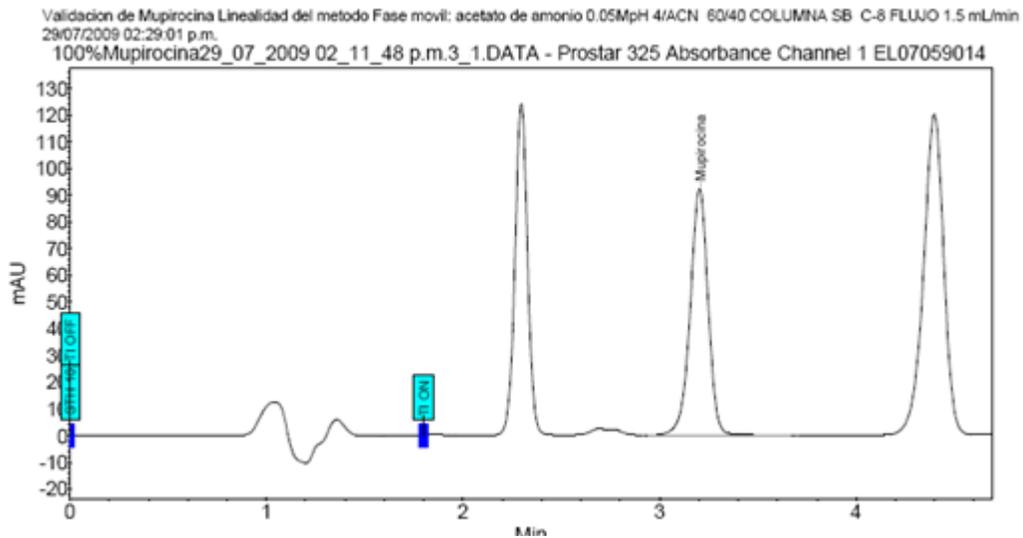


Validación de Mupirocina Linealidad del metodo Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
29/07/2009 02:00:28 p.m.

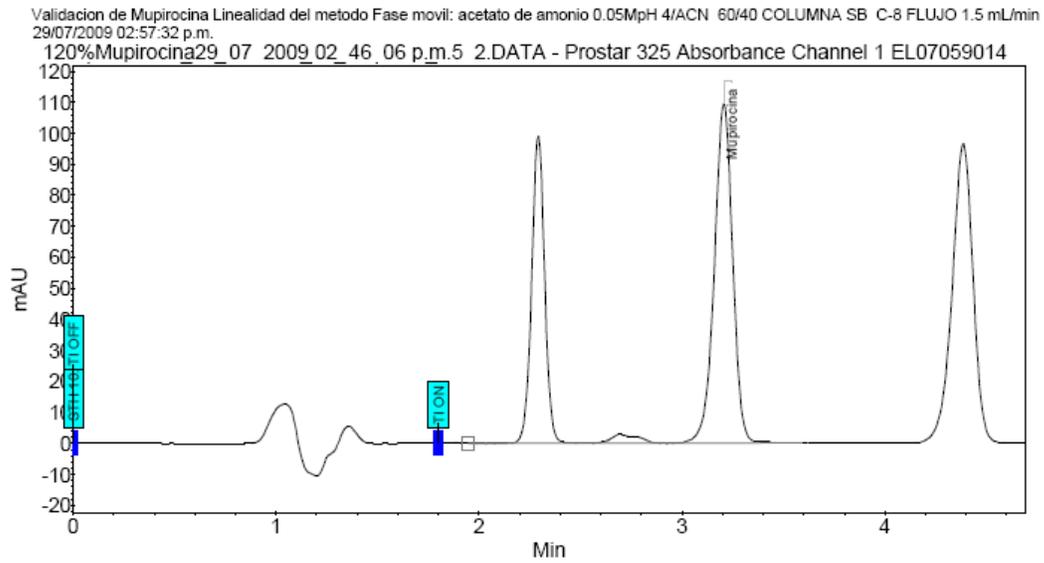
90%Mupirocina29_07_2009_01_54_51 p.m.2_1.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.



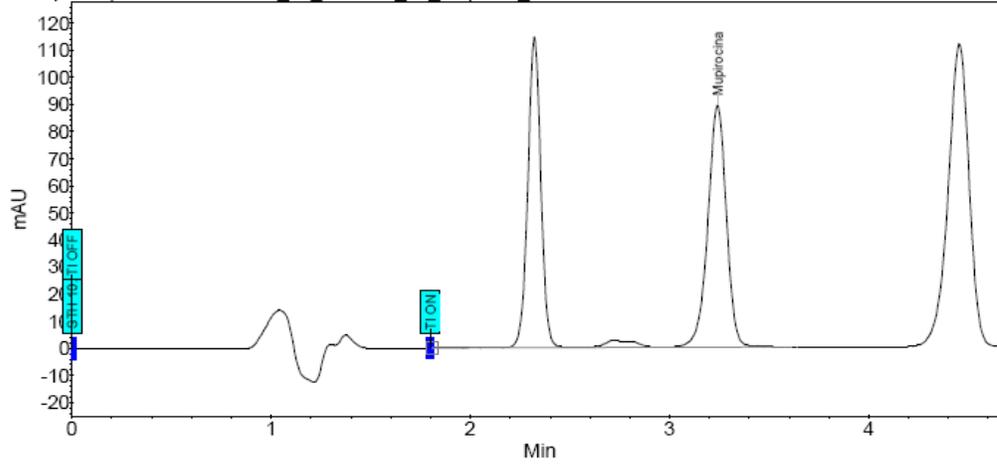
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo N° 7

Cromatogramas de la Repetibilidad del método.

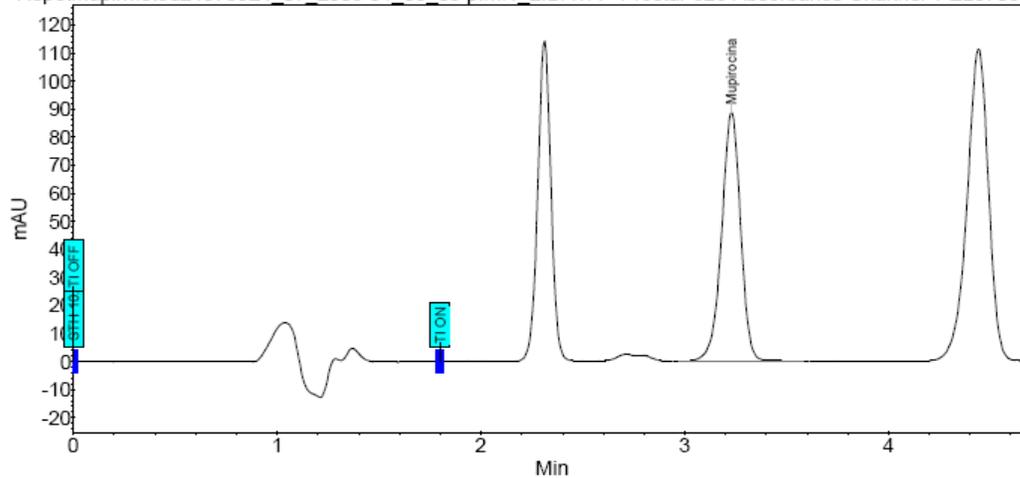
Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:14:19 p.m.

RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_1.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014



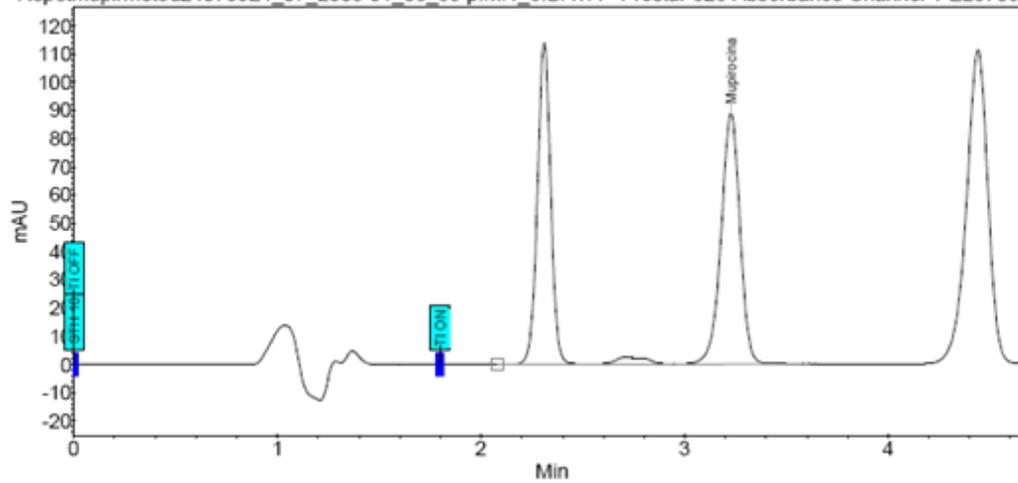
Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:19:58 p.m.

RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_2.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

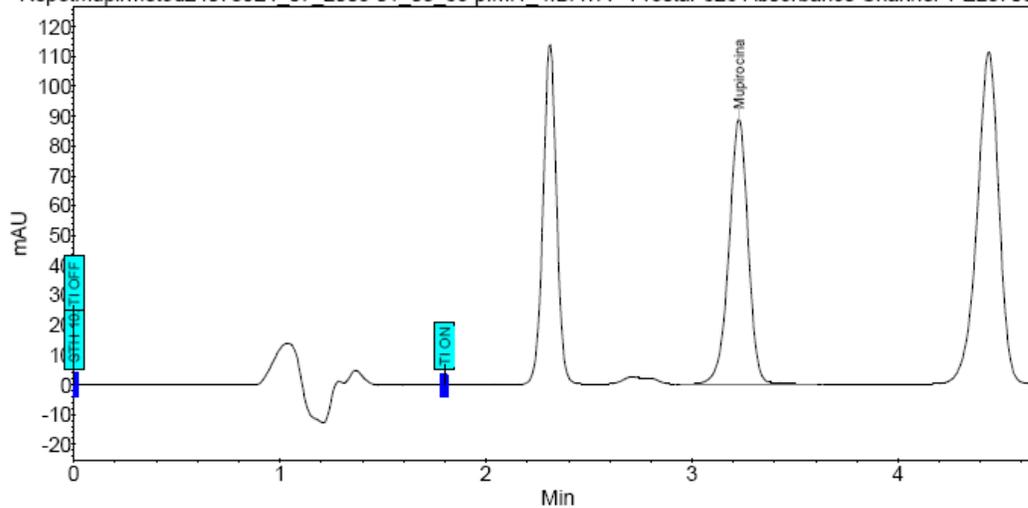


VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05MpH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:25:39 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_3.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

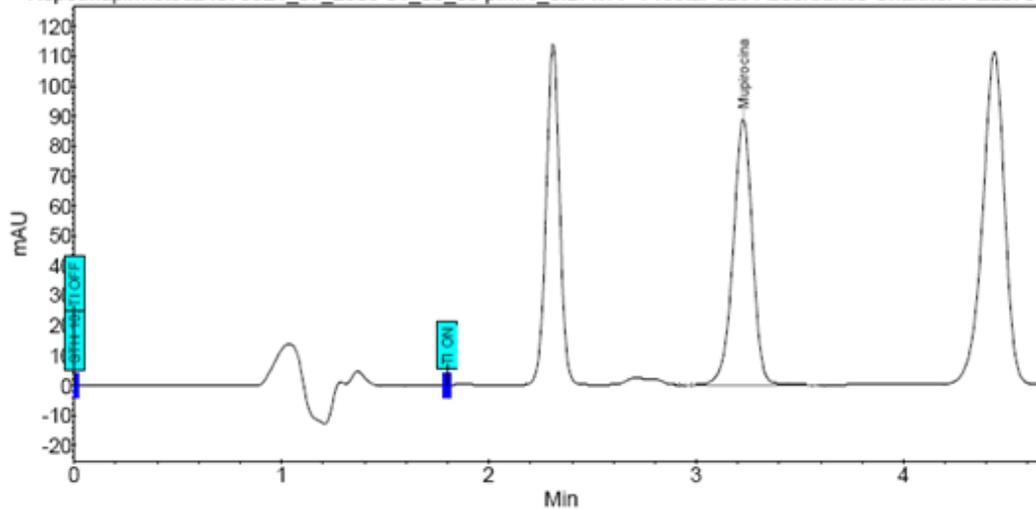


Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05MpH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:31:19 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_4.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

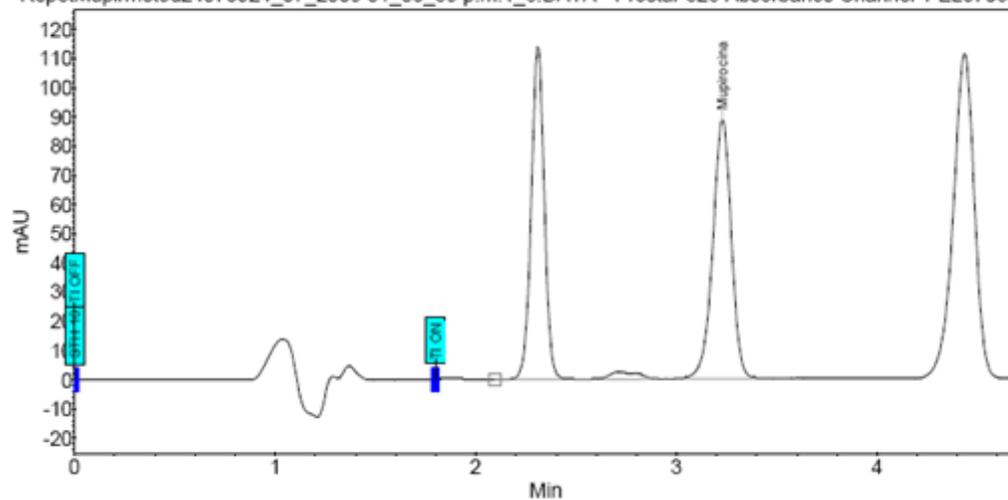


VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:37:03 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_5.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

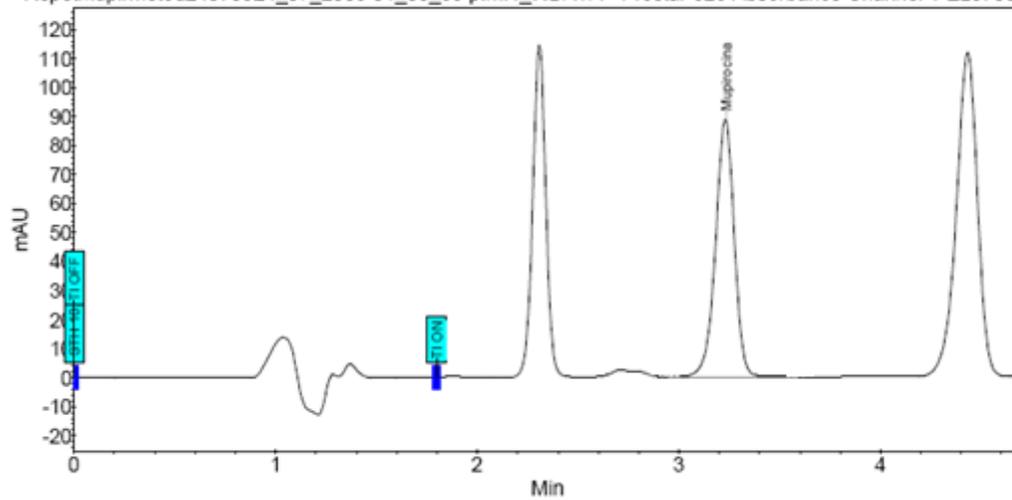


Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05M pH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:42:43 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_6.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

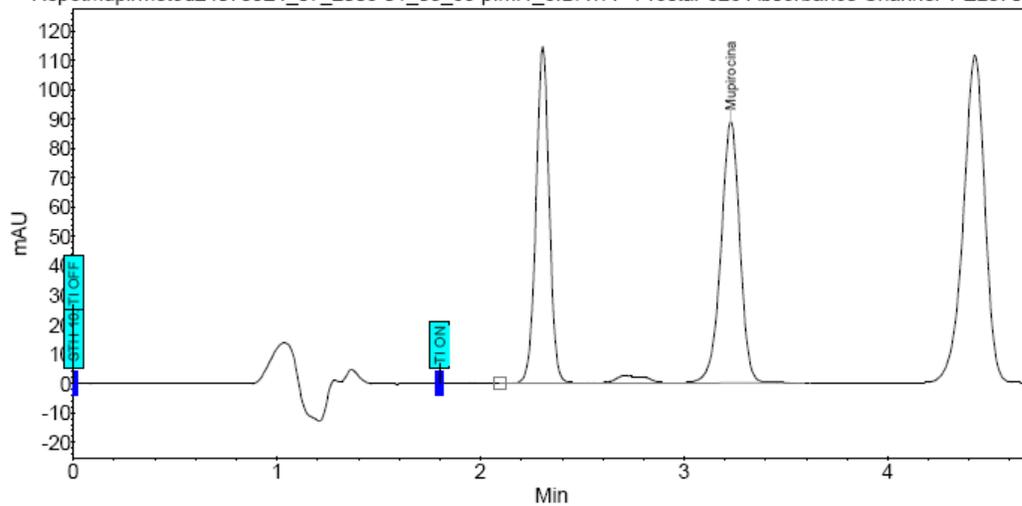


VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05MpH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:48:24 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_7.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014

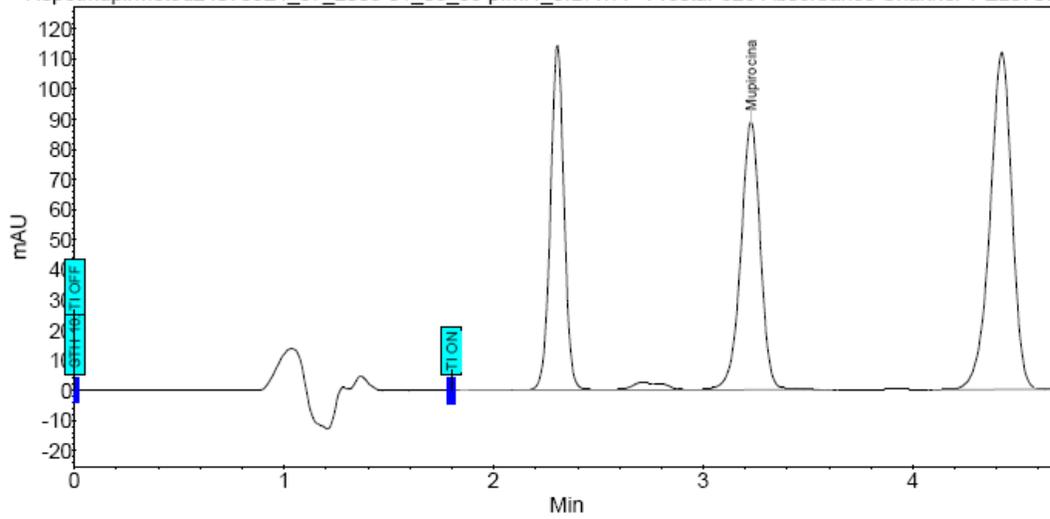


Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05MpH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:54:03 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_8.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014



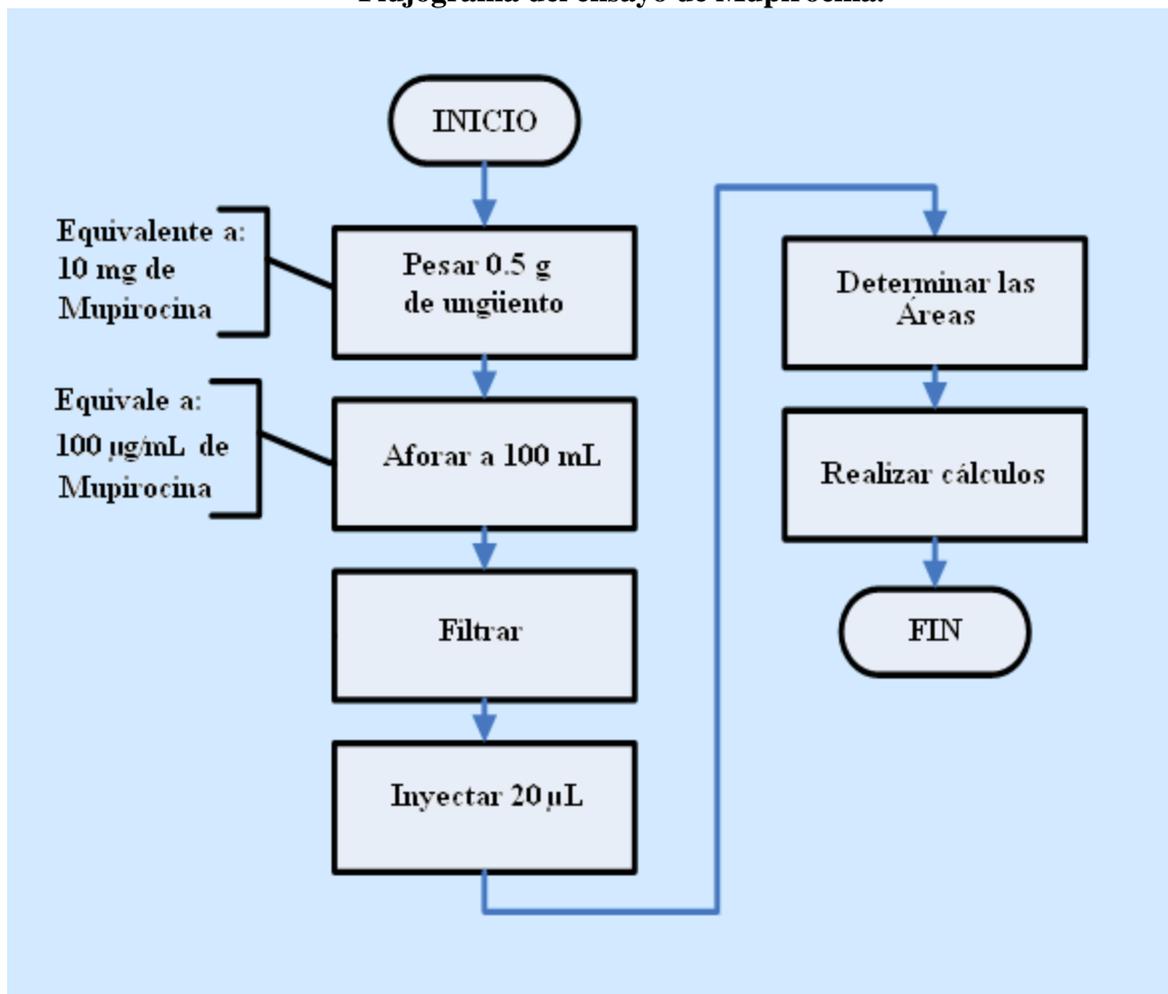
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Repetibilidad del metodo Determinacion de Mupirocina Fase movil: acetato de amonio 0.05MpH 4/ACN 60/40 COLUMNA SB C-8 FLUJO 1.5 mL/min
24/07/2009 01:59:52 p.m.
RepetMupirmetod24070924_07_2009 01_08_39 p.m.1_9.DATA - Prostar 325 Absorbance Channel 1 EL07059014



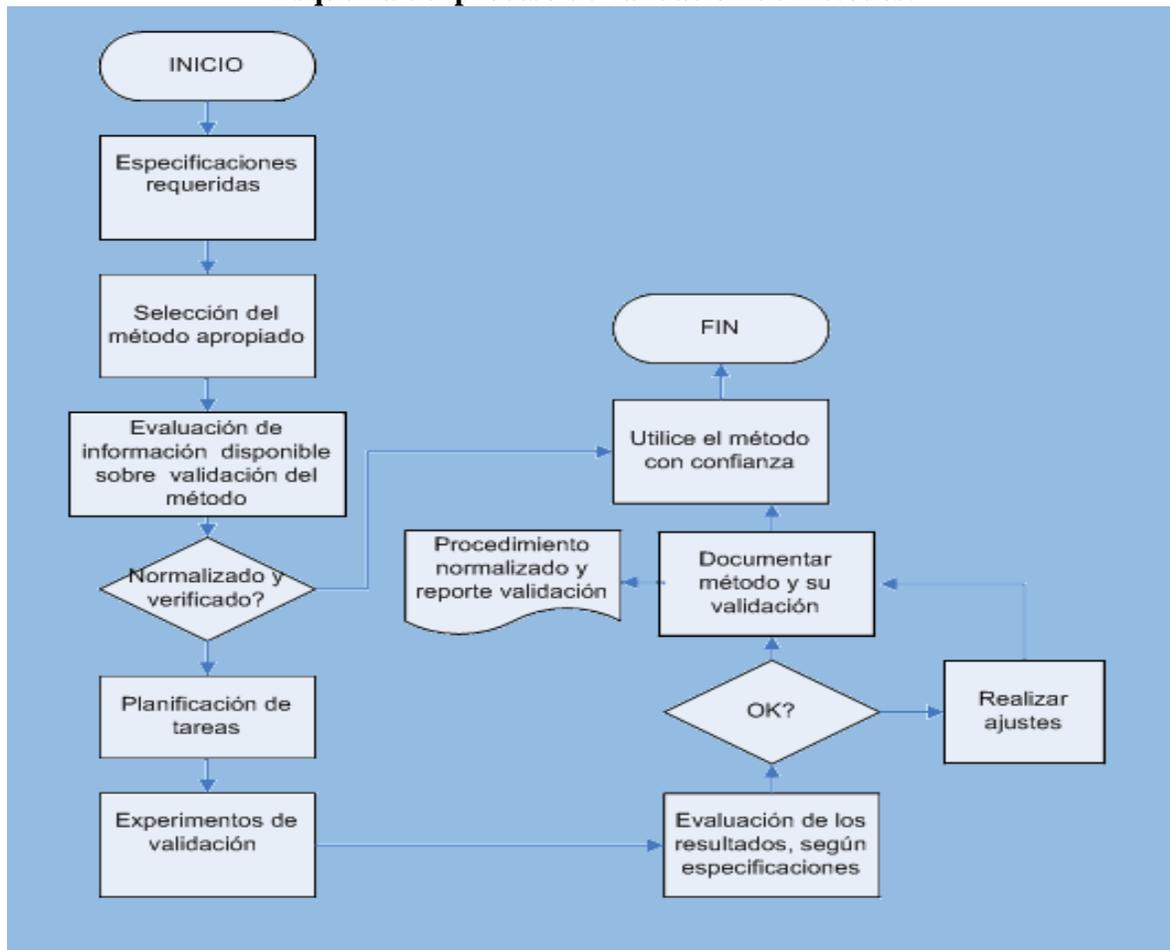
VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo N° 8
Flujograma del ensayo de Mupirocina.



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Anexo N° 9
Esquema del proceso de validación de métodos.



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Glosario

Aftas: Pequeñas ampollas que se forman en algunas membranas mucosas: La temperatura ocasiona aftas bucales.

Aseguramiento de la calidad: es el conjunto de medidas y procedimientos definidos con el fin de asegurar que los productos elaborados sean de la calidad necesaria para el uso al que están destinados.

b: Ordenada al origen o intercepto

Buenas prácticas de laboratorio: conjunto de normas, procedimientos operativos y prácticas, para garantizar que los datos generados por un laboratorio de Control de Calidad son íntegros, confiables, reproducibles y de calidad.

Buenas prácticas de manufactura: conjunto de procedimientos y normas destinados a garantizar la producción uniforme de los lotes de productos farmacéuticos que cumplan las normas de calidad.

Calibración: proceso mediante el cual se establece si el desempeño de un instrumento satisface las especificaciones establecidas.

Calidad: naturaleza esencial de un producto y la totalidad de sus atributos y propiedades, las cuales determinan su idoneidad para los propósitos a los cuales se destina.

Calificación de equipo: acción de demostrar y documentar que el equipo o los sistemas auxiliares están correctamente instalados, trabajan y conducen realmente a los resultados esperados.

Criterio de Aceptación: Las especificaciones que son utilizadas para tomar una decisión para aceptar o rechazar un lote o batch de producto o aceptar una pieza de equipamiento que ha sido calificada.

Control de calidad: sistema planificado de actividades cuyo propósito es verificar la calidad del producto.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Especificaciones: Descripción de los requisitos que debe satisfacer el material inicial, el material de empaque y los productos intermedios, a granel y terminados. Dichos requisitos incluyen propiedades físicas, químicas y de ser posible biológicas.

Especificidad de un test analítico: Es la habilidad para calcular inequívocamente un analito en presencia de otros componentes que se espera que esté presente.

Estabilidad: capacidad que tiene un producto, de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales, dentro de las especificaciones establecidas.

Estándar: Una sustancia que ha sido reconocida por un conjunto extensivos de análisis, para ser un auténtico material de alta pureza. Este estándar puede ser obtenido a través de una fuente reconocida o preparado por medio de una síntesis independiente o por una purificación sucesiva de un material existente de producción.

Exactitud: Que mide la magnitud de los errores sistemáticos.

Fiat: Organización que se encarga de un tipo específico de medición.

Límite de cuantificación: Es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser determinado en forma cuantitativa con precisión y exactitud. Este límite es un parámetro del ensayo cuantitativo para bajos niveles de compuestos en muestras matrices y es usado particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

Límite de detección: Es La cantidad mínima de de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto.

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

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.

Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación a través de un corto intervalo de tiempo. También significa una precisión entre ensayos.

Validación: acción documentada que demuestra que un procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema conducen a los resultados previstos.

Tabla N° 27 Indicadores de las variables evaluadas

Variable	Significado
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación o RSD.
IC	Intervalo de confianza al 97.5%
Σ	Sumatoria
b ₁	Pendiente
S _{bo}	Desviación Estándar de la Pendiente
n	Número de replicaciones
N	Numero total de determinaciones
%RSD	Desviación estándar Relativa
%R	Porcentaje de recuperación
t _{tab}	Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975
LCS	Límite Superior del Intervalo de Confianza al 95%.
LCI	Límite Inferior del Intervalo de Confianza al 95%
μ	Media del intervalo de confianza al 95 %
gl	Grado de libertad
X ² _{tab}	Valor de la varianza de la precisión de Bartley
G _{tab}	Valor critico de Cochran para la homogeneidad de las varianzas
SS Entre días	Fuente de variación del análisis de un factor ANOVA
SS Dentro días	Fuente de variación del análisis de un factor ANOVA
F _{tab}	Valor critico de F de Fisher de la homogeneidad de las medias
LD	Limite de Detección
LC	Limite de Cuantificación
Var	Varianza
FR	Factor de Respuesta
Tr	Tiempo de Retención
K	Factor de Capacidad
NPT	Numero de Platos teóricos
T	Factor de Asimetría

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MUPIROCINA 2 % UNGÜENTO EN LABORATORIOS CEGUEL EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE MAYO A NOVIEMBRE 2009.