

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA



TITULO: VALIDACION DE LA TÉCNICA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE GABAPENTINA CÁPSULA DE 300 mg, POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR), REALIZADO EN EL LABORATORIO
CEGUEL S.A; ENERO – NOVIEMBRE 2014.

AUTORAS:

Bra. Leyla María Calero Granera

Bra. Susana del Rosario Pérez Martínez

TUTORA.

PhD.: Carla Martínez Algaba

MANAGUA, NOVIEMBRE 2014

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

CERTIFICACIÓN

RESUMEN

APARTADO I: GENERALIDADES.....0

1.1 INTRODUCCION.....1

1.2

ANTECEDENTES.....

..3

1.3 JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL

PROBLEMA.....6

1.4

OBJETIVOS.....

..7

APARTADO II: MARCO DE REFERENCIA.....8

2.1 Generalidades de validación 8

2.1.1 Definición de validación..... 8

2.1.1.1 Validación de un procedimiento analítico8

2.1.2 Razones que justifican la validación de métodos analíticos8

2.1.3 Características analíticas para validación de métodos9

2.1.3.1 Test de idoneidad del sistema9

2.1.3.1.1 Ámbito de aplicación10

2.1.3.2 Linealidad y rango10

2.1.3.2.1 Ámbito de aplicación10

2.1.3.3

Precisión.....11

2.1.3.3.1	
Repetibilidad.....	11
2.1.3.3.1.1	Determinacion de la Repetibilidad.....12
2.1.3.3.1.2	Criterios de aceptación de la Repetibilidad.....12
2.1.3.3.2	Precisión intermedia.....
12
2.1.3.3.2.1	Determinación de la precisión intermedia12
2.1.3.3.2.2	Criterios de aceptación de la precisión intermedia12
2.1.3.4	Límite de detección
(LOD).....	13
2.1.3.5	Límite de cuantificación
(LOQ).....	13
2.1.3.6	
Selectividad.....	14
2.1.3.6.1	Ámbito de aplicación14
2.1.3.7	
Exactitud.....	15
2.1.3.7.1	Definición y generalidades15
2.1.3.7.2	Determinación de la exactitud15
2.1.3.7.2.1	Procedimiento de determinación de la exactitud15
2.1.3.7.2.2	Criterios de aceptación de la exactitud16
2.1.3.8	
Robustez.....	16
2.1.3.8.1	Ámbito de aplicación17
2.1.3.9	Definición de la
estabilidad.....	17
2.1.3.9.1	Estudio de estabilidad.....17
2.1.3.9.2	Estudio de estabilidad acelerado17

2.2 Disolución	18
2.2.1 Fundamento	18
2.2.1.1 Aspectos teóricos de la prueba de disolución	18
2.2.1.2 Aplicación:	18
2.2.1.3 Aparato 2 (Aparato con Paleta)	19
2.3 Clases de ensayos	
analíticos	20
2.3.1 Datos requeridos para la validación de procedimientos	
farmacopéico	20
2.4 Fundamentos de Cromatografía de líquidos de alta resolución	
(CLAR)	22
2.4.1 Componentes del aparato cromatografía de líquidos de alta resolución	
(CLAR)	2
2	
2.4.1.1 Sistema de bombeo	22
2.4.1.2	
Inyectores	23
2.4.1.3	
Columnas	23
2.4.1.3.1 Relleno de la	
columna	23
2.4.1.3.2 Eficiencia de la	
columna	24
2.4.1.4	
Detectores	24
2.4.1.4.1 Características de los detectores	24

2.4.1.5 Dispositivos de recolección de datos.....	25
2.4.1.6 Aptitud del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	25
2.4.1.6.1 Resolución (R)	25
2.4.1.6.2 Factor de asimetría (T)	26
2.5 Generalidades Farmacológicas de la molécula de Gabapentina.....	27
2.5.1 Propiedades físico-químicas de la Gabapentina.....	27
2.5.2 Mecanismos de acción	27
2.5.3 Farmacocinética.....	28
2.5.4 Efectos secundarios	29
2.5.5 Indicaciones terapéuticas	29
APARTADO III:	
HIPOTESIS.....	30
APARTADO IV: DISEÑO	
METODOLOGICO.....	31
4.1 Tipo de estudio	31
4.1.1 Tipo de diseño.....	31
4.2 Descripción del ámbito de estudio	31
4.3 Población y muestra.....	31
4.3.1 Población de estudio	31
4.3.2 Muestra	31
4.3.3 Criterio de inclusión	32
4.3.4 Criterio de exclusión	32
4.4	
Variables.....	

4.4.1 Variable independiente	33
4.4.2 Variables dependientes	33
4.4.3 Operacionalización de variables	33
4.4.4 Material y método.....	36
4.4.4.1 Materiales para recolectar la información	36
4.4.4.2 Materiales para procesar la información	36
4.4.4.3 Tipos de fuentes de información primaria.....	36
APARTADO V: DISEÑO	
EXPERIMENTAL.....	37
5.1 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	37
5.1.1 Condiciones cromatográficas	37
5.1.2 Condiciones del Método de Disolución	38
5.1.2.1 Programación del equipo Disolutor.....	38
5.2 Preparación de las soluciones de trabajo.....	39
5.2.1 Preparación de soluciones reactivas	39
5.2.1.1 Ácido clorhídrico (HCl, 0.06 N)	39
5.2.1.2 Ácido clorhídrico (HCl, 1 N)	39
5.2.1.3 Hidróxido de sodio (NaOH, 1N).....	39
5.2.1.4 Solución amortiguadora Fosfato Monobásico de Amonio 0.025 M (pH 2.5).....	39
5.2.2 Preparación de la fase móvil.....	40
5.2.3 Preparación del estándar secundario Gabapentina para la Curva de Calibrado.....	40
5.2.3.2 Preparación del estándar secundario Gabapentina al 100 %.....	42
5.2.4 Preparación de las muestras.....	42

5.2.4.1 Preparación de solución Gabapentina cápsula 300 mg	42
5.2.4.2 Preparación de muestras de Gabapentina cápsula 300 mg para la Curva de Calibrado	43
5.2.5 Preparación del placebo.....	44
5.2.5.1 Solución placebo cargado al 80 %	45
5.2.5.2 Preparación de la Solución Placebo Cargado al 100 %.....	45
5.2.5.3 Solución placebo cargado al 120 %	45
5.2.6 Preparación de la muestras para estabilidad.....	46
5.2.7 Preparación de las soluciones para condiciones de stress.....	47
5.2.7.1 Termólisis.....	47
5.2.7.1.1 Preparación de la solución estándar	47
5.2.7.1.2 Preparación de la solución muestra	48
5.2.7.1.3 Preparación de la solución placebo	48
5.2.7.2 Oxidación.....	48
5.2.7.2.1 Preparación de la solución estándar	48
5.2.7.2.2 Preparación de la solución muestra	48
5.2.7.2.3 Preparación de la solución placebo	49
5.2.7.3 Hidrólisis alcalina.....	49
5.2.7.3.1 Preparación de la solución estándar	49
5.2.7.3.2 Preparación de la solución muestra	49
5.2.7.3.3 Preparación de la solución placebo	49
5.2.7.4 Hidrólisis ácida.....	50
5.2.7.4.1 Preparación de la solución estándar	50

5.2.7.4.2 Preparación de la solución muestra	50
5.2.7.4.3 Preparación de la solución placebo	50
5.3 Preparación del medio de disolución y muestras para el test de Disolución.....	51
5.3.1 Ácido clorhídrico (HCl, 0.06 N)	51
5.3.2 Preparación de la Solución Muestra (Gabapentina 333.33 µg/mL).....	51
5.4 Validación del método de cuantificación del principio activo.....	51
5.4.1 Parámetros de validación del método para la cuantificación del activo gabapentina	51
5.4.1.1 Idoneidad del sistema a validar	51
5.4.1.1.1 Criterios de aceptación.....	52
5.4.1.2 Linealidad del sistema.....	52
5.4.1.2.1 Procedimiento	52
5.4.1.2.1.1 Parámetros Estadísticos y Criterios de aceptación de la Linealidad.....	52
5.4.1.3 Precisión del Sistema.....	53
5.4.1.3.1 Repetibilidad del sistema.....	53
5.4.1.3.1.1 Procedimiento.....	53
5.4.1.3.1.2 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación.....	53
5.4.1.4 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	53
5.4.1.5 Selectividad.....	53

5.4.1.5.1 Prueba de identificación del activo.....	53
5.4.1.5.1.1 Procedimiento.....	53
5.4.1.5.1.2 Criterio de aceptación	54
5.4.1.5.2 Selectividad frente a los excipientes.....	54
5.4.1.5.2.1 Criterios de aceptación	54
5.4.1.5.3 Selectividad frente a productos de degradación.....	54
5.4.1.5.3.1 Criterio de aceptación	55
5.4.1.5.4 Exactitud.....	55
5.4.1.5.4.1 Parámetros Estadísticos y Criterios de Aceptación.....	55
5.5 Parámetros de validación del método para la cuantificación del activo Gabapentina en Gapancel cápsula 300 mg.....	56
5.5.1 Linealidad del método	56
5.5.1.1 Procedimiento.....	56
5.5.1.1.1 Parámetros Estadísticos y Criterios de Aceptación de la Linealidad.....	56
5.5.2 Precisión del método.....	57
5.5.2.1 Repetibilidad del método	57
5.5.2.1.1 Procedimiento	57
5.5.2.1.1.1 Parámetros Estadísticos y Criterios de Aceptación.....	57
5.5.2.2 Precisión intermedia.....	57
5.5.2.2.1 Procedimiento.....	57
5.5.2.2.1.1 Criterio de aceptación de la precisión intermedia	57

5.5.3		
	Robustez.....	58
5.5.3.1	Criterios de aceptación	58
5.6		
	Estabilidad.....	
	59	
5.6.1	Estabilidad de la solución analítica	59
5.6.1.1	Procedimiento.....	59
5.6.1.1.1	Criterio de aceptación.....	59
5.7	Test de	
	disolución.....	59
5.7.1	Parámetros estadísticos y criterios de aceptación	59
5.8	Reactivos, equipos y	
	materiales.....	60
APARTADO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE		
	RESULTADOS.....	63
6.1	Técnica Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con una	
	bomba Isocratica.	63
6.1.1	Adecuación del sistema.....	63
6.1.2	Linealidad del sistema (Gabapentina)	65
6.1.2.2	Ecuación de la recta de la linealidad del sistema	67
6.1.2.3	Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b).....	72
6.1.2.4	Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a)	74
6.1.2.5	Test G de Cochran	75
6.1.2.6	Coefficientes de variación de los factores de respuestas	77
6.1.2.7	Análisis de varianza	78
6.1.3	Precisión del sistema	82
6.1.3.1	Repetibilidad del sistema.....	82
6.1.3.1.1.1	Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema	84
6.1.3.2	Limite Detención (LOD).....	85

6.1.3.3 Limite de Cuantificación (LOQ).....	85
6.1.4 Selectividad.....	86
6.1.4.1 Prueba de identificación del activo	86
6.1.4.2 Pruebas cuantitativas del contenido del activo	87
6.1.4.2.1 Selectividad frente a excipientes	87
6.1.4.3 Selectividad frente a productos de Degradación	89
6.1.4.3.1 Termólisis	89
6.1.4.3.2 Oxidación.....	91
6.1.4.3.3 Hidrólisis Alcalina	92
6.1.4.3.4 Hidrólisis ácida.....	93
6.1.4.3.5 Sin estrés.....	94
6.1.5 Exactitud del sistema	95
6.1.5.1.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema	96
6.1.5.2 Exactitud.....	97
6.1.5.2.1 Exactitud del método de Gabapentina Cápsula 300 mg, en CLAR....	99
6.2 Linealidad del	
Método.....	102
6.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad del Metodo.....	104
6.2.3 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b)	108
6.2.4 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a).....	110
6.2.5 Test G de Cochran.....	111
6.2.6 Coeficientes de variación de los factores respuestas.....	113
6.2.7 Análisis de varianza.....	114
6.2.8 Repetibilidad del	
Método.....	117
6.2.8.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del método	119
6.2.9 Precisión Intermedia del método	120
6.2.10	
Robustez.....	122

6.2.11 Estabilidad de la solución analítica (gabapentina).....	124
6.2.12 Test de Disolución.....	126
Resumen de Resultados.....	127
APARTADO VI: CONCLUSIONES.....	128
APARTADO VIII: RECOMENDACIONES.....	129
APARTADO IX: BIBLIOGRAFIA.....	130
GLOSARIO.....	132
ABREVIATURAS.....	137
ANEXOS	

LISTA DE DIAGRAMAS

N°	Especificaciones	Página
Diagrama 5.1.3.1	Representación esquemática de la preparación de la curva del calibrado del estándar de Gabapentina.	41
Diagrama 5.2.4.2.1	Representación esquemática de la preparación de la curva del calibrado de Gapancel Cápsula de 300 mg.	44
Diagrama 5.2.5.3.1	Representación esquemática de la preparación de soluciones para la exactitud de Gabapentina Cápsula de 300 mg.	46

LISTA DE TABLAS

N°	Especificaciones	Página
Tabla N° 2.3.1.1	Parámetros Requeridos para la Validación de Procedimientos Farmacopeicos	21
Tabla N° 6.1.1.1	Tratamiento estadístico de la adecuación del sistema	63
Tabla N° 6.1.2.1	Evaluación de la curva de calibración	65
Tabla N° 6.1.2.2.1	Análisis de mínimos cuadrados	68
Tabla N° 6.1.2.5.1	test G de cochran varianza de los factores de respuesta	76
Tabla N° 6.1.2.7.1	Análisis de varianza en CLAR	79
Tabla N° 6.1.3.1.1	Evaluación de la Repetibilidad del sistema	83
Tabla N° 6.1.5.1	Evaluación de la exactitud del sistema	95
Tabla N° 6.1.5.2.1.1	Porcentaje de recuperación de gabapentina 300 mg, cápsula	99
Tabla N° 6.1.5.2.1.1.1	test G de cochran para el porcentaje de recuperación	100
Tabla N° 6.2.1	Evaluación de la linealidad del método de gabapentina 300 mg, cápsula en CLAR	102
Tabla N° 6.2.2.1	Análisis de mínimos cuadrados de la linealidad del método	105
Tabla N° 6.2.5.1	Test G de cochran de los factores de respuesta	112
Tabla N° 6.2.7.1	Análisis de varianza en CLAR	114
Tabla N° 6.2.8.1	Evaluación de la Repetibilidad del método	118
Tabla N° 6.2.9.1	Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista	120
Tabla N° 6.2.9.1.1	Evaluación estadística para la precisión intermedia	121
Tabla N° 6.2.9.2	t estadígrafo student precisión intermedia	122

Tabla N° 6.2.10.1	Evaluación en la Robustez	123
Tabla N° 6.2.11.1	Porcentaje recuperado en la cuantificación de soluciones muestras para la estabilidad	124
Tabla N° 6.2.11.2	Valor de i para cada condición /tiempo	125
Tabla N° 6.2.11.3	Valor de factor l	125
Tabla N° 6.2.12.1	Evaluación del test de Disolución de gabapentina Cápsula de 300 mg	126
Tabla N° 6.3	Resumen de Resultados de la Validación en CLAR	127

LISTA DE GRÁFICOS

N°	Especificaciones	Página
Gráfico 6.1.2.1.1	Gráfico de curva de calibración en área de gabapentina.	66
Gráfico 6.1.2.2.1.1	Gráfico de análisis de residuales de la linealidad del sistema.	69
Gráfico 6.1.2.2.1.2	Gráfico de linealidad del sistema de gabapentina.	71
Gráfico 6.2.1.1	Gráfico de linealidad del método de gabapentina 300 mg.	103
Gráfico 6.2.2.1.1	Gráfico de análisis de residuales de la linealidad del método.	106

LISTA DE FIGURAS

N°	Especificaciones	Pagina
Figura 1	Esquema del Aparato 2 de Disolución.	19
Figura 2	Representación esquemática del mecanismo de acción de la Gabapentina.	28
Figura 3	Cromatogramas obtenidos de las soluciones de la prueba de identificación del activo.	86-87
Figura 4	Cromatogramas obtenidos de las soluciones de selectividad frente a excipientes.	88
Figura 5	Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a la termólisis.	89
Figura 6	Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a oxidación.	91
Figura 7	Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a hidrolisis alcalina.	92
Figura 8	Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a hidrolisis ácida.	93
Figura 9	Cromatogramas obtenidos de las soluciones sin someter a estrés.	94

LISTA DE ANEXOS

Nº	Especificaciones
Anexo 1	Idoneidad del método
Anexo 2	Cromatograma del calibrado del sistema
Anexo 3	Cálculos para las concentraciones de la curva de calibrado
Anexo 4	Cromatogramas de la Linealidad del sistema y del método
Anexo 5	Gráfica de residuales para la linealidad
Anexo 6	Gráfica de los intervalos de confianza
Anexo 7	Cromatogramas de la precisión del sistema
Anexo 8	Precisión intermedia del método en área de muestra de gabapentina 300 mg cápsula
Anexo 9	Precisión intermedia INTER-ANALISTA DIA 2
Anexo 10	Repuestas obtenidas de la precisión intermedia inter analista e inter día
Anexo 11	Respuestas obtenidas de la precisión inter analista inter día
Anexo 12	Cromatogramas de la Exactitud
Anexo 13	Pesos de las cápsulas de gabapentina para la preparación de muestras
Anexo 14	Pesos de las cápsulas de gabapentina 300 mg para la Disolución
Anexo 15	Partes de disolutor VARIAN VK 7000
Anexo 16	Bomba al vacío
Anexo 17	Balanza analítica METTLER TOLEDO
Anexo 18	Cromatógrafo AGILENT 1100 series inyector manual
Anexo 19	Monografía individual de gabapentina cápsula USP 36
Anexo 20	Reglamento técnico centro americano 11:03:39:06
Anexo 21	Reglamento técnico centro americano 11:01:04:05
Anexo 22	Capítulo general Cromatografía líquida de Alta Resolución USP 36
Anexo 23	Capítulo general de Disolución USP 36
Anexo 24	Tablas estadísticas

LISTA DE ECUACIONES

Nº	Ecuación	Página
Ecuación 1	$LOD = \frac{3.3 \sigma}{m}$	13
Ecuación 2	$LOQ = \frac{10 \sigma}{m}$	13
Ecuación 3	$I = \sum i/n$	47
Ecuación 4	$i = \frac{S}{T} * 100$	47
Ecuación 5	$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$	66
Ecuación 6	r^2	66
Ecuación 7	$\hat{y} = b * x + a$	69
Ecuación 8	$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	70
Ecuación 9	$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$	70
Ecuación 10	$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$	70
Ecuación 11	$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$	71
Ecuación 12	$a = \bar{y} - b\bar{x}$	71
Ecuación 13	$t_{exp(b)} = \frac{ b }{S_b}$	72

Nº	Ecuación	Página
Ecuación 14	$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}}$	72
Ecuación 15	$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}}$	73
Ecuación 16	$t_{exp(a)} = \frac{ a }{S_a}$	74
Ecuación 17	$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}}$	74
Ecuación 18	$G_{exp} = \frac{S^2_{máxima}}{\sum S_i^2}$	75
Ecuación 19	$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$	77
Ecuación 20	$S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}$	80
Ecuación 21	$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$	80
Ecuación 22	$S_{y^*}^2 = \sum \frac{(y_i^* - \bar{y})^2}{N}$	80
Ecuación 23	$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$	81
Ecuación 24	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$	84
Ecuación 25	$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$	84

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo con todo amor y cariño:

A DIOS que con su amor infinito nos dio fuerza y nos proveyó de valor y sabiduría para esforzarnos en realizar este trabajo con dedicación y entusiasmo para culminar nuestros estudios superiores.

A nuestros padres quienes con su amor incondicional siempre han estado presente en nuestros triunfos y caídas brindándonos palabras de aliento, de esperanza y sabiduría para salir adelante con esfuerzo y trabajo duro, lo que sin duda alguna da como resultado el fruto de la victoria y la gratificación en el alma de haber vencido sin importar que tan fuertes fueran los vientos.

A los profesores, que gracias a sus conocimientos y disposición a enseñarnos, lograron inculcarnos las bases necesarias para la culminación del presente trabajo, en especial a nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por dedicarnos su generosa atención y tiempo en la minuciosa labor de revisión y corrección de este trabajo.

A todas aquellas personas que nos apoyaron, y que algunas ya no están presentes; siempre nos ofrecieron su apoyo de una forma directa e indirecta, dedicaron su amor, su tiempo, ánimo y conocimientos para hoy haber concluido una de las mayores metas que hemos tenido en la vida y por ello les dedicamos este trabajo con todo el afecto y cariño que alberga nuestro corazón.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a DIOS PADRE por darnos el ser que tenemos con todos sus dones y bendiciones.

A nuestros padres, que con sus esfuerzos nos alentaban y apoyaban incondicionalmente para hacer realidad nuestros sueños de llegar a ser profesionales.

Agradecemos muy especialmente a nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por sus valiosas orientaciones técnicas y el apoyo en la elaboración de la presente monografía.

Al Laboratorio CEGUEL S.A. principalmente al Lic. Alberto Jarquín, Gerente de Planta, Lic. Paula Lago Clark, Gerente de la Garantía del Control de la Calidad y Aseguramiento BPL (Buenas Practicas de Laboratorio), Lic. Orión Lazo, Analista del Laboratorio, por sus invaluable colaboraciones y apoyo en la realización de este estudio. De igual forma a todo el personal que labora en dicho laboratorio, quienes colaboraron de forma directa e indirecta en la realización de esta monografía.

A los Docentes de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – MANAGUA de la Carrera de Química Farmacéutica que nos formaron en esta profesión brindándonos las bases para desarrollar nuestras capacidades y habilidades como profesionales en la rama de Química Farmacéutica.

Finalmente a todas las personas que nos apoyaron y que participaron en la realización del presente trabajo.



CERTIFICACIÓN

Msc. Ramón Ignacio Cáceres
Coordinador de la Carrera Química Farmacéutica
Departamento de Química
UNAN Managua

Estimado Msc. Cáceres:

Me permito presentar a usted el informe final de la monografía: “Validación de la técnica analítica para la cuantificación de gabapentina cápsula de 300 mg, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), realizado en el Laboratorio CEGUEL S.A, Enero - Noviembre 2014.”. Realizado por las bachilleras: Leyla María Calero Granera y Susana del Rosario Pérez Martínez

Así mismo, certifico haber dirigido y supervisado el arduo trabajo realizado con dedicación, empeño, por las bachilleras, esperando su pronta programación para pre defensa y defensa.

Aprovecho la ocasión para saludarle y presentarle a usted mis respetos y consideración.

Firmo la presente en Managua el 09 de Diciembre del 2014.

PhD. Carla Martínez Algaba
Doctora en Farmacia
Tutora



RESUMEN

Gabapentina con nombre químico ácido 1- (aminometil) ciclohexanoacético, es un medicamento antiepiléptico. Posee acciones farmacológicas contra el dolor neuropático, neuralgia postherpética, prevención de migrañas, nistagmo y trastorno bipolar; siendo un principio activo demandado en Hospitales y Centros de Salud.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio CEGUEL S.A, con la finalidad de validar la Técnica Analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de gabapentina, en el preparado farmacéutico cápsula, reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 36, 2013), introduciendo cambios significativos según la metodología interna del laboratorio.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent, modelo 1100 Series con inyector manual, con detector de arreglo de diodo a una longitud de onda fija de 210 nm, trabajando en el rango de concentraciones de 80 % a 120 %, utilizando como fase móvil solución amortiguadora de fosfato monobásico de amonio pH 2.5:Metanol (65:35 v/v) y diluyente HCl 0.06 N.

La técnica validada se le determino los Parámetros de Desempeño, Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez, Selectividad, Estabilidad y Disolución, para cumplir con los requisitos de los Reglamentos Técnicos Centroamericanos Armonizados (RTCA 11.03.39:06); “Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos”, (RTCA 11.03.47:07) “Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad” y RTCA (11.01.04:05) “Productos farmacéuticos. Estudios de estabilidad de medicamentos para uso humano”; siendo una prioridad antes de ser aprobados para ser comercializados.



La curva de calibración demostró ser lineal $r^2 = 0.9997$. Se obtuvo porcentaje de recuperación en cápsula de 100.046 %. En los estudios de la repetibilidad y precisión intermedia los coeficientes de variación fueron menores al 2%. La técnica resultó ser específica, lineal, precisa y exacta, por lo tanto pueden usarse para la rutina de control de calidad en productos farmacéuticos.

Palabras claves: Gabapentina, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Validación, Disolución y Estabilidad.

Apartado I:
ASPECTOS GENERALES



1.1 INTRODUCCIÓN

La validación garantiza la calidad del medicamento, puesto que le confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos, el tema de validación ha sido objeto de estudio desde hace años por diferentes organismos de carácter oficial; desde la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), Organización mundial de la Salud (OMS), Asociación Oficial de Químicos Analíticas (AOAC), Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), Farmacopea Europea y la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), consignan la ineludible necesidad de la validación en los procesos analíticos.

Los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias contempladas en la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas en el artículo 176 del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos Farmacéuticos, así como también en el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11:03:39:06 “Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos”, el objetivo es conseguir plenamente que el medicamento sea seguro, eficaz y estable.

La molécula de Gabapentina es un medicamento con diferentes acciones farmacológicas como son: tratamiento de la epilepsia, dolor de origen neuropático, neuralgia postherpética, prevención de las migrañas, el nistagmo y se ha utilizado en el tratamiento del trastorno bipolar; siendo un principio activo de mucha demanda en los diferentes niveles de atención de salud. Laboratorio CEGUEL S.A; es el primer laboratorio a nivel nacional en fabricar Gabapentina con el nombre comercial GAPANCEL cápsula de 300 mg, es por esto que se hace necesario validar el método de análisis para obtener resultados confiables para su posterior registro sanitario en el país y así cumplir con las normativas de comercialización.



En el presente trabajo, se ha desarrollado y validado un método de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para Gabapentina cápsula de 300 mg, el cual garantiza que los resultados obtenidos son confiables, analizando los parámetros: Adecuación, Linealidad, Precisión, Robustez, Selectividad, Estabilidad, y Disolución.

Así mismo este trabajo aporta la información completa del método de validación el cual servirá como formato guía para futuras validaciones de métodos analíticos.



1.2 ANTECEDENTES

A nivel internacional encontramos un sin número de trabajos reportados en diferentes revistas sobre validaciones de técnicas cromatográficas en diversos preparados farmacéuticos y en algunos de ellos en Gabapentina con diferentes presentaciones farmacéuticas. En Nicaragua no existen estudios de validación de la Técnica Analítica para la Cuantificación de Gabapentina, siendo el Laboratorio CEGUEL S.A, el primer Laboratorio a nivel nacional en validar esta técnica cromatográfica para la cuantificación de Gabapentina, para su posterior fabricación y comercialización.

Internacionales:

2014 “Evaluation of Extemporaneous Pediatric Gabapentin Suspension Prepared from Gabapentin Capsules” Iman I. et al. Latin American Journal of Pharmacy (2014), vol 33, Issue 5: p. 746-52

2011 “Validation of an Isocratic HPLC Assay of Gabapentin in Pharmaceutical formulations and Stress test for Stability of Drug Substance” (2011), vol. 1, Issue 3, April: p 342-350.

2008 “Validación de un método de HPLC simple y rápido para la determinación de metronidazol en formulaciones dermatológicas”. Tashtoush BM; Jacobson EL; Jacobson MK. Drug Development and Industrial Pharmacy (2008), vol. 34, Issue 8, October: p 840-844.

2008 “Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Metronidazol em forma farmacêutica (gel vaginal)”. Bedor, Danilo; Soares, JL; Grangeiro, S; Ramos, S, Lima, Ádley; Rolim, PJ. Latin American Journal of Pharmacy (2008), vol. 27, Issue 02, October: p 263-265.



2007 “Validación de métodos por Espectrofotometría Ultravioleta y HPLC para la determinación cuantitativa del Atenolol en preparaciones farmacéuticas”. Weich, A, Carvalho de Oliveira, D; Melo, J; Goebel, K; Rolim, C. Latin American Journal of Pharmacy (2007), vol. 26, No. 5, Agosto: p 765-770.

2007 “Desarrollo y validación de un método simple para HPLC simultánea determinación in vitro de amoxicilina y metronidazol en una sola longitud de onda”. Naser Tavakoli, Jaleh Varshosaz, Farid Dorkoosh, Mohammad R. Zargarzadeh. Revista de Análisis farmacéuticas y biomédicas (2007), vol. 43, No. 1, Enero: p 325-329.

2004 “Biodisponibilidad comparativa entre dos formulaciones de gabapentina cápsulas de 300 mg en voluntarios sanos colombianos”. Sergio Parra, M.D et al. Revista Colombia Médica. (2004), vol. 35, No. 1, p. 5-11.

Nacionales:

2013 “Validación de dos técnicas analíticas para la cuantificación de Metronidazol base en tableta e inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y espectrofotometría (uv/vis) realizado en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSa), agosto 2011-julio 2013. UNAN-Managua”. Bras. García Artola Ana Raquel y García Cáceres Cándida Azucena.

2012 “Validación del método analítico para la cuantificación de Dexametasona 0.5 mg tableta por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) realizada en Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSa), de agosto 2011 a marzo 2012. UNAN-Managua”. Bras. Téllez María Guissell y Villanueva Martha Ibis.



2011 “Validación del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2% ungüento en Laboratorio CEGUEL en el período comprendido de mayo a noviembre 2009. UNAN-Managua”. Bra. Faife López Adinia.

2004 “Desarrollo y validación para la determinación de Clembuterol y Ambroxol en jarabe por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)”. UNAN-León. Bra. Quiroz Larios, Clelia Guadalupe.



1.3 JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del Desarrollo de un Método Analítico, siendo una de las exigencias regulatorias imperantes en la industria farmacéutica, garantizando la calidad de los medicamentos para uso humano, la cual debe estar soportada por una serie de documentos que demuestre que el producto cumple con los parámetros de calidad establecidos, siendo la Validación de Métodos Analíticos un punto clave en la consecución final.

La molécula de Gabapentina fue seleccionada por el interés del Laboratorio CEGUEL S.A, en producir este fármaco para su comercialización, debido que es un fármaco con una diversidad de acciones farmacológicas como epilepsia, dolores neuropático, neuralgia postherpética, prevención de las migrañas, el nistagmo y se ha utilizado en el tratamiento del trastorno bipolar. Debido a lo anterior ha presentado una gran demanda en la utilización para dar respuestas a múltiples enfermedades.

La farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) y el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 orienta la validación de los nuevos métodos de análisis para verificar la calidad del medicamento para uso humano. Con el presente trabajo se validó una técnica analítica no oficial para la cuantificación y disolución de Gapancel, requisito necesario en la obtención del registro sanitario para la comercialización del producto, el cual le produciría un ahorro sustancial al Ministerio de salud en la adquisición de este medicamento de producción nacional.



1.4 OBJETIVOS:

1.4.1 Objetivo general:

Evaluar los parámetros de desempeño de la técnica analítica para la cuantificación de Gabapentina cápsula de 300 mg (Gapancel), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en el laboratorio CEGUEL S.A, Enero – Noviembre 2014.

1.4.2 Objetivos específicos:

1. Comprobar la idoneidad del Método Analítico, para la cuantificación de Gabapentina cápsula de 300 mg (Gapancel), por la técnica cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).
2. Evidenciar los parámetros del desempeño para la validación del sistema: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, para la cuantificación de Gabapentina cápsula de 300 mg (Gapancel) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).
3. Aplicar el test de Disolución para la cuantificación de Gabapentina cápsula de 300 mg (Gapancel) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Apartado II:
MARCO DE REFERENCIA



2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Generalidades de validación

2.1.1 Definición de validación

La validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. (AEFI, 2001).

2.1.1.1 Validación de un procedimiento analítico

Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. (CEGUEL, Laboratorio, 2007)

2.1.2 Razones que justifican la validación de métodos analíticos

Demostrar que los resultados son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, siendo la validación la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.

Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados lo cual a su vez minimizara el número de fallas y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.

Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico si no también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.

La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos. (AEFI, 2001)



2.1.3 Características analíticas para validación de métodos

Para que un método de análisis sea validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método descritas en la farmacopea. (USP 36 <621>, 2013).

- Test de idoneidad del sistema
- Linealidad
 - Linealidad del Sistema
 - Linealidad del Método
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Precisión intermedia
 - Reproducibilidad
- Exactitud
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Robustez
- Selectividad
- Estabilidad

2.1.3.1 Test de idoneidad del sistema

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema, (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como una parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. En la práctica podría equipararse a una cualificación del proceso analítico (PQ), o una revalidación en continuo, ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo el conjunto del sistema continúa siendo “valido” para el propósito para el que fue concebido. (AEFI, 2001)



2.1.3.1.1 Ámbito de aplicación

El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. Por ejemplo, en procedimientos analíticos volumétricos se incluye la evaluación del blanco y una precisión de los resultados obtenidos. Sin embargo es en las técnicas cromatográficas donde este tipo de pruebas se emplean con mayor asiduidad. (AEFI, 2001)

2.1.3.2 Linealidad y rango

Linealidad: es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas), proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. (AEFI, 2001)

Rango: es el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. (AEFI, 2001)

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuáles son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentración ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica analítica empleada y principalmente en función de las especificaciones. (AEFI, 2001)

2.1.3.2.1 Ámbito de aplicación

Según la guía ICH QZA se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo.

- Valoración del contenido del principio activo
- Velocidad de disolución
- Cuantificación de impurezas (AEFI, 2001)

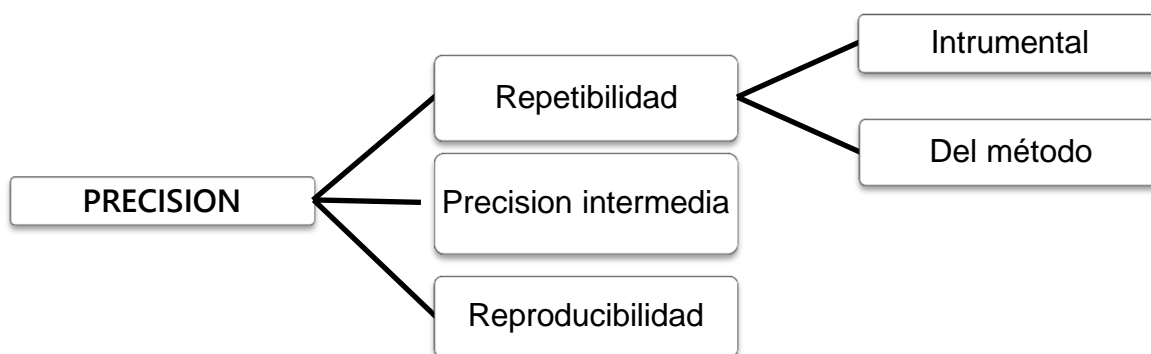


2.1.3.3 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. (AEFI, 2001)

El objetivo de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo como consecuencia de la existencia de estos errores los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias no conducen generalmente a resultados idénticos los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analistas, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.), de aquí la importancia del estudio de precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios



2.1.3.3.1 Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista con los mismos aparatos, y reactivos, etc.). En un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. (AEFI, 2001)



2.1.3.3.1.1 Determinación de la Repetibilidad

La conferencia internacional sobre armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH), recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, se trabaja con el punto medio de la calibración, con sus nueve determinaciones repetidas de esta concentración. (ICH, 2002)

2.1.3.3.1.2 Criterios de aceptación de la Repetibilidad

Existen diferentes criterios de aceptación sin embargo, se puede generalizar que en el caso de la Repetibilidad, la precisión intermedia y la desviación estándar relativa, debe ser menor o igual al 2%, y en algunos casos puede ser igual o menor del 3%. (Union Aduanera, 2004)

2.1.3.3.2 Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra homogénea pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas y días, etc.) en un mismo laboratorio. (AEFI, 2001)

2.1.3.3.2.1 Determinación de la precisión intermedia

Se determina preparando una muestra a la concentración considerada como el 100% o la concentración de análisis rutinario, haciendo análisis por triplicado. El ensayo se realiza por dos analistas diferentes, en días diferentes. (USP 36 <621>, 2013)

2.1.3.3.2.2 Criterios de aceptación de la precisión intermedia:

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global. (Union Aduanera, 2004)



2.1.3.4 Límite de detección (LOD)

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse por una única medición, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas, expresadas habitualmente en forma de concentración de analito (porcentajes, partes por millón ppm) en la muestra. (USP 36 <621>, 2013)

Se determina mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo que puede detectarse confiablemente. El límite de detección se calcula mediante la fórmula.

Dónde:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

2.1.3.5 Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas que se expresa en forma de concentración de analito (porcentajes, partes por millón ppm) en la muestra. (USP 36 <621>, 2013)

El límite de cuantificación se calcula mediante la fórmula:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad



2.1.3.6 Selectividad

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como sinónimo de lo anterior, aunque debería reservarse ante aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta solo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado. (AEFI, 2001)

Debido a que el Laboratorio CEGUEL S.A no tenía disponible estándar de impurezas o productos de degradación de Gabapentina se demostró la especificidad comprobando los resultados de las pruebas de las muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes, estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas (calor, hidrolisis alcalina, hidrolisis acida y oxidación). (USP 36 <1225>, 2013)

2.1.3.6.1 Ámbito de aplicación

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros compuesto tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información de impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.



El estudio de selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico. Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta qué punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles. (AEFI, 2001)

2.1.3.7 Exactitud

2.1.3.7.1 Definición y generalidades

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como un valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. (AEFI, 2001)

2.1.3.7.2 Determinación de la exactitud

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis:

1. Prueba de un estándar de referencia
 2. Mezcla de excipiente (placebo con una cantidad agregada conocida)
 3. Agregado de estándar (muestra con cantidad agregada conocida)
 4. Se deduce a partir de los datos de la especificidad y linealidad
 5. Comparación con un método reconocido como exacto (método de referencia).
- (Union Aduanera, 2004) (ICH, 2002)

2.1.3.7.2.1 Procedimiento de determinación de la exactitud

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones por 3 niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:



1. Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80 – 120%
2. Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel
3. Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20 % a Q+ 20 %, Si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada periodo de tiempo se aplicaría (\pm 20%). (AEFI, 2001)

La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadido sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza (AEFI, 2001)

2.1.3.7.2.2 Criterios de aceptación de la exactitud

En la exactitud el criterio de aceptación es 90.0% - 110.0% de recuperación o 2% de error relativo. (USP 36, 2013)

2.1.3.8 Robustez

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o “estabilidad” durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar datos validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método susceptibles de producirse durante su utilización. (AEFI, 2001)



2.1.3.8.1 Ámbito de aplicación

Las guías ICH recomiendan incluir la robustez en un método en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero. (AEFI, 2001)

2.1.3.9 Definición de la estabilidad

Capacidad que tiene un producto o un principio activo de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad establecidas, para la zona climática IV. (RTCA 11.01.04:05)

2.1.3.9.1 Estudio de estabilidad

Pruebas que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar las materias primas o los productos semielaborados, o los productos terminados según sea el caso. Las pruebas de estabilidad también se emplean para validar periodos de validez del medicamento en su envase primario original y en condiciones de almacenamiento especificadas. (RTCA 11.01.04:05)

2.1.3.9.2 Estudio de estabilidad acelerado

Estudio diseñados con el fin de aumentar la tasa de degradación física o química de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento. Estos estudios tienen como objetivo determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir periodo de validez del medicamento, en condiciones normales de almacenamiento. El diseño de estos estudios puede incluir temperaturas elevadas, altas humedades y exposición a la luz intensa. Los resultados de los estudios acelerados de estabilidad deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones definidas de almacenamiento (RTCA 11.01.04:05)



2.2 Disolución

2.2.1 Fundamento

El procedimiento de disolución de la USP 36 NF 31 es una prueba de desempeño aplicable a muchas formas farmacéuticas. Es una de las pruebas que constituyen la especificación pública de la forma farmacéutica (pruebas, procedimientos para pruebas, criterios de aceptación). Para satisfacer la prueba de desempeño. (USP 36 NF 31)

Por lo general, el procedimiento de disolución aporta datos que permiten la aceptación o rechazo con respecto a los criterios de aceptación, los que con frecuencia se basan en una decisión de la autoridad regulatoria.

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios. Los criterios de aceptación deben ser representativos de varios Lotes con la misma composición nominal y el mismo proceso de fabricación, que usualmente incluyen los lotes de mayor relevancia usados en estudios claves, y deben también ser representativos del desempeño en estudios de estabilidad. (USP 36 NF 31)

2.2.1.1 Aspectos teóricos de la prueba de disolución

2.2.1.2 Aplicación:

La disolución es una prueba físico química que determina la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interfase líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente.

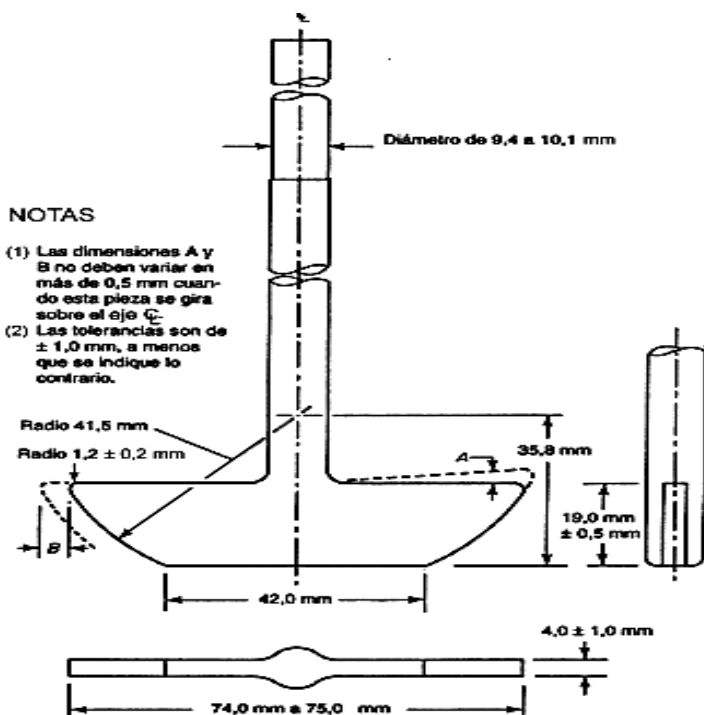


Esta prueba se realiza para determinar el cumplimiento de los requisitos de disolución (si estuviera indicado en la monografía individual), de las formas farmacéuticas administradas oralmente. El procedimiento de disolución requiere un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método suficientemente discriminatorio, tolerante, reproducible día a día y capaz de ser transferido entre laboratorios. (USP 36 NF 31)

2.2.1.3 Aparato 2 (Aparato con Paleta)

Emplear el Aparato 2 usando como elemento de agitación una paleta compuesta por un aspa y un eje. Colocar el eje propulsor de forma tal que su eje central guarde una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. La línea central vertical del aspa está alineada con el eje propulsor de forma tal que el extremo inferior del aspa esta nivelado con el extremo inferior del eje propulsor. La paleta cumple con las especificaciones que se indican en la Figura 1

Figura 1 Esquema del aparato 2 de Disolución





La distancia entre el fondo interno del vaso y el aspa se mantiene en 25 ± 2 mm durante la prueba. El aspa metálica o de otro material inerte adecuado y el eje forman una unidad. En algunos casos, se puede usar un dispositivo desmontable de dos partes, siempre y cuando las partes permanezcan firmemente ajustadas durante la prueba.

El eje y el aspa de la paleta pueden estar recubiertos con un material inerte adecuado. Dejar que la unidad de dosificación se hunda hasta el fondo del vaso antes de empezar a rotar el aspa. A las unidades de dosificación se les puede agregar una pieza pequeña, suelta, de algún material no reactivo, como por ejemplo un par de vueltas de alambre, para evitar que floten. (USP 36 NF 31)

2.3 Clases de ensayos analíticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica, en cuatro clases principales con sus respectivas especificaciones para la validación de métodos analíticos, que se nombran en: (Inf. 32 OMS Anexo 5, 2006)

Clase A: Para establecer identidad

Clase B: Para detectar y cuantificar impurezas

Clase C: Para determinar cuantitativamente la concentración

Clase D: Para evaluar las características, disolución, uniformidad de contenido

2.3.1 Datos requeridos para la validación de procedimientos farmacopéicos

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían dependiendo de la naturaleza de la prueba específica, considerando esta amplia variedad es lógico que diferentes procedimientos requieran diferentes esquemas de validación, que a continuación se detallan (USP 36 <621>, 2013)

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



Categoría II: para la determinación de impurezas en fármacos a granel o producto de degradación en productos farmacéuticos.

Categoría III: para la determinación de las características de desempeño (ej. disolución, liberación de fármacos).

Categoría IV: pruebas de identificación

Tabla 2.3.1.1 Parámetros requeridos para la validación de procedimientos farmacopéicos.

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

Fuente: (USP 34 <1225>, 2011)* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.



2.4 Fundamento de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida que esta inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra llamada fase móvil líquida, que se desplaza al contacto de la primera (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1 Componentes del aparato cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como, por ejemplo, una computadora, un integrador o un registrador (USP 36 <621>, 2013)

Además de recibir y reproducir señales enviadas por el detector, las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.1 Sistemas de bombeo

Los sistemas de bombeo de CLAR administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. (USP 36 <621>, 2013)

Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de bombear la fase móvil a una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante períodos de tiempo prolongados.

Los tipos de bombas que existen en la actualidad son: isocrática, binaria y cuaternaria (Agilent, 2009-2010).



Bomba isocrática: solo tiene un canal de disolvente; es decir, no se puede modificar la composición durante un método por que no hay una válvula de gradiente multicanal (MCGV) (Agilent, 2009-2010).

Bomba binaria: se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa, proporciona la generación de un gradiente por mezcla a alta presión. (Agilent, 2009-2010)

Bomba cuaternaria: está compuesta por una cabina de disolventes, un desgasificador de vacío y una bomba de gradiente de cuatro canales. Esta última comprende una válvula de partición de alta velocidad y un dispositivo de bomba. (Agilent, 2009-2010)

2.4.1.2 Inyectores

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar, se inyectan en la fase móvil, ya sea manualmente usando jeringas o automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.3 Columnas

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.3.1 Relleno de la columna

L₁: Octadecil silano ligado químicamente a partículas de sílice porosas o micropartículas cerámicas, de 1,5 a 10 µm de diámetro. (Agilent Technologies, 2014)



2.4.1.3.2 Eficiencia de la columna

La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay sólo un pico de interés en el cromatograma; sin embargo, es un medio menos confiable para asegurar la resolución que la medición directa. (USP 36 <621>, 2013)

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar empleada en la valoración u otra solución estándar se comparan para determinar si se cumplen con los requisitos de precisión. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa, (SR ó DSR), si el requisito es 2,0% o menor; se emplean los datos de seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es más de 2,0%. (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.4 Detectores

Para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna estratégicamente se utiliza un detector, que es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física. (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.4.1 Características de los detectores

- a) **Sensibilidad:** medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- b) **Linealidad:** rango de masa o concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin desviación arbitraria.
- c) **Rango dinámico lineal:** rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.
- d) **Ruido:** es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal.



e) Límite de detección: está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble de nivel del ruido. (Trejos, D.E Managua UNAN - MANAGUA, 2011)

2.4.1.5 Dispositivos de recolección de datos

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen los cromatogramas completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando períodos largos de operación sin necesidad de supervisión. (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.6 Aptitud del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y se emplean para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico, son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal (USP 36 <621>, 2013)

2.4.1.6.1 Resolución (R)

Es una función de la eficiencia de la columna, N (número de platos teóricos en una columna cromatográfica) y se especifica para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre sí se resuelvan unos de otros, para establecer el poder de resolución general del sistema y para asegurar que el estándar interno se resuelva del fármaco (USP 36 <621>, 2013)



2.4.1.6.2 Factor de asimetría (T)

Es una medida de la simetría del pico, siendo la unidad para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada. (USP 36 <621>, 2013)

En algunos casos, pueden observarse valores menores a la unidad. A medida que la asimetría del pico aumenta, la integración y por tanto la precisión se tornan menos confiables. (USP 36 <621>, 2013)

Estas pruebas se realizan mediante la recolección de datos de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones, según se especifique en la monografía individual. Puede ser necesario realizar ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema. A menos que se especifique algo diferente en la monografía, los parámetros de aptitud del sistema se determinan a partir del pico del analito. (USP 36 <621>, 2013)

Para determinar la eficacia del sistema operativo final, se debe someter a una prueba de aptitud. Las inyecciones repetidas de la preparación estándar requeridas para demostrar que la precisión del sistema es adecuada pueden efectuarse antes de inyectar las muestras o intercalarse entre las inyecciones de las muestras. (USP 36 <621>, 2013)



2.5 Generalidades Farmacológicas de la molécula de Gabapentina

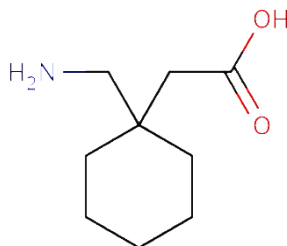
Gabapentina (antiepiléptico)

2.5.1 Propiedades físico química de Gabapentina (Galichet, L. 2005)

Nombre Propio: Gabapentina

Nombre químico: ácido 1- (aminometil) ciclohexanoacético.

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: C₉H₁₇NO₂

Peso Molecular: 171.2 g/mol

Descripción: solido cristalino blanco a blanquecino

Solubilidad: fácilmente soluble en agua y en soluciones alcohólicas y acidas.

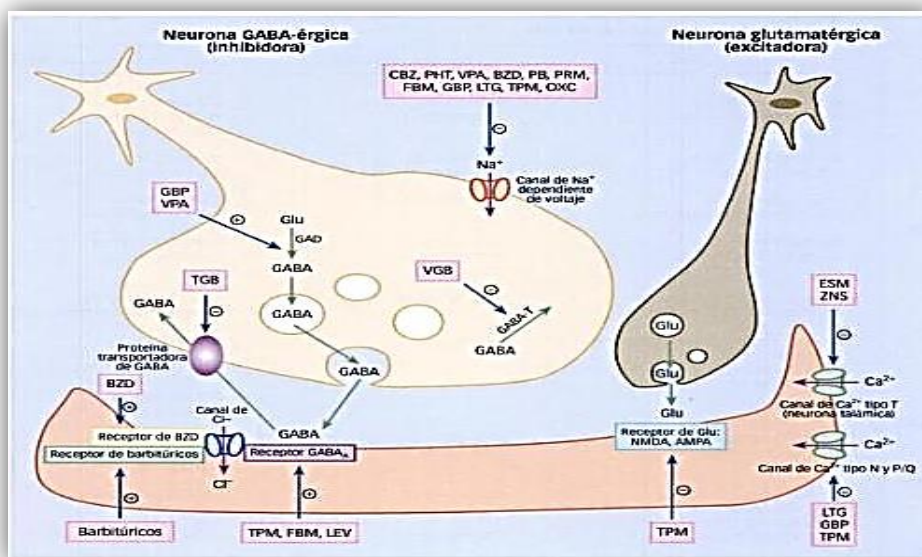
pK_a: 3.68

2.5.2 Mecanismos de acción

Se une a receptores de canales de Ca²⁺ en el neocórtex y el hipocampo, modulación o bloqueo de los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje, e inhibe la liberación de mono aminas excitadoras. No actúa directamente sobre los receptores de GABA, pero aumenta la concentración de este neurotransmisor, potenciación GABA-érgica (Fármacos anticonvulsivantes y antiepilépticos, 2008).



Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de acción de la Gabapentina



2.5.3 Farmacocinética

Tiene un espectro farmacocinético muy seguro. Su biodisponibilidad es del 60%. A partir de dosis elevadas disminuye su absorción debido a que ésta se lleva a cabo por transporte activo mediante un L-aminoácido. La edad y los alimentos no influyen en su absorción intestinal. Alcanza su concentración plasmática máxima en 2-4 horas. Carece de metabolismo hepático y es eliminado de forma inalterada por el riñón. Su aclaramiento renal presenta una relación lineal con el aclaramiento de creatinina. Se elimina durante hemodiálisis y su semivida es de 5 – 9 horas, por lo que requiere tres dosis diarias. Alcanza el equilibrio estable en 2 o 3 días. Es posible alcanzar dosis eficaces de 900 – 1200 mg/día a partir del tercer día de tratamiento (Fármacos anticonvulsivantes y antiepilépticos, 2008).

Propiedades farmacocinéticas e interacciones de Gabapentina

Absorción (%)	Efecto enzimático	Unión a proteínas (%)	Nivel plasmático (µg/mL)	Efecto de éste sobre otros fármacos	Efecto de otros fármacos sobre éste
35	No	No	2-20	-	↓ GBP 20% ; antiácidos



2.5.4 Efectos secundarios

Somnolencia, aumento de peso, inestabilidad, temblor y diplopía; en general mejoran al reducir la dosis (Fármacos anticonvulsivantes y antiepilépticos, 2008).

2.5.5 Indicaciones terapéuticas

Como adyuvante y en monoterapia en crisis parciales y secundariamente generalizadas de adultos y niños. Es ineficaz en ausencias y mioclonías. También está indicada en el tratamiento del dolor neuropático y se utiliza de forma empírica en el tratamiento de algunos trastornos psiquiátricos, el temblor esencial y los movimientos periódicos del sueño. (Fármacos anticonvulsivantes y antiepilépticos, 2008)

Apartado III:
HIPOTESIS



3. HIPOTESIS

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) es una metodología analítica aceptable para cuantificar y posterior aplicación del test de Disolución de Gabapentina en su formulación cápsula.

Apartado IV:
DISEÑO METODOLOGICO



4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal: es descriptivo por realizar análisis estadístico, es univariado porque solo describe o estima parámetros en la población de estudio a partir de una muestra y transversal ya que implica la recolección de datos en un solo corte en el tiempo.

4.1.1 Tipo de diseño

Experimental porque se realizaron los análisis de forma práctica donde obtuvimos datos en el área de validación del Laboratorio CEGUEL. Debido que se desea comprobar los efectos de una intervención específica y requiere dos condiciones: intervención y asignación aleatoria (grupo control).

4.2 Descripción del ámbito de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio Complejo César Guerrero S.A (CEGUEL), sobre la carretera a los Malacos, Granada.

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población de estudio

La población de estudio proporcionada por el departamento de investigación y desarrollo del laboratorio CEGUEL, fue de 200 cápsulas de 300 mg de Gabapentina, perteneciente a un lote piloto.

4.3.2 Muestra

Debido la cantidad de muestra facilitada por Laboratorio CEGUEL, se realizó muestreo aleatorio simple, seleccionándose 50 cápsulas de 300 mg de gabapentina, que corresponde al 25% de la población.



4.3.3 Criterio de inclusión

Cápsulas de 300 mg de gabapentina

4.3.4 Criterio de exclusión

Cápsulas de 600 mg, 400 mg y capletas de 600 mg, 300 mg de gabapentina



4.4 Variables

4.4.1 Variable independiente

Concentración (variable no sujeta a errores indeterminados)

4.4.2 Variables dependientes

Área (sujeta a errores indeterminados), linealidad, precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, test de disolución, estudio de estabilidad para gabapentina mediante la técnica validada por CLAR.

4.4.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
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.	Coeficiente de variación (C.V) Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación (r^2) Test del intercepto t_{int} Test de linealidad de la pendiente t_{pen} Test de la regresión t_{reg}	C.V. de la pendiente $\leq 2\%$ $r \geq 0.9900$ $r^2 > 0.9980$ $t_{int} < t_{tab.}$ $t_{pend} > t_{tab.}$ $t_{reg} > t_{tab.}$	Categórica
Precisión	Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación a través de un corto intervalo de tiempo. También significa una precisión entre ensayos.	El coeficiente de variación (CV) de los resultados, tanto para los datos correspondientes a la repetibilidad como para la precisión intermedia; no debe ser mayor de 5%.	C.V $\leq 2\%$ (CLAR)	Categórica



VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Exactitud	Es la proximidad entre los resultados de las pruebas obtenidos mediante ese método y el valor verdadero	Test de Cochran Ensayo de hipótesis de t de Student: Recuperación de muestra por concentración en el procedimiento analítico.	$G_{exp} < G_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$ % Recuperación 90.0 % a 110.0%	Categórica
Especificidad	Capacidad de evaluar e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de excipientes presentes en la matriz de la muestra.	Programa Chemstation integrado al equipo CLAR	Comparación entre la señal obtenida del estándar y el placebo: Negativa	Categórica
Selectividad	Capacidad de un método analítico para medir o identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.	Selectividad Identificación de activo Selectividad Frente a excipientes Selectividad Frente a productos de degradación.	La señal obtenida del activo no debe interferir en la señal obtenida por los excipientes. Los productos de degradación no deben presentar ninguna señal que interfiera con la señal obtenida para el estándar.	Nominal



VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Estabilidad	Capacidad que tiene un producto o principio activo de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales, dentro de las especificaciones de calidad establecidas, para la zona climática IV.	Determinación del Factor I	90 % - 110 %	Categórica
Robustez	Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.	Factor de capacidad (k') Número de platos teóricos (N) Factor de coleo (T) Resolución (R)	Factor de Capacidad $k > 1$ (óptimo > 2) Número de Platos teóricos > 2000 Factor de asimetría o factor de coleo < 2 Resolución > 1.5 (óptimo > 2)	Categórica



4.4.4 Material y método

4.4.4.1 Materiales para recolectar la información

Consulta de Farmacopea de Estados Unidos Americanos USP 36 - NF-31, COMIECO “Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39.06. Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos”, Asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI 2001) “Validación de Métodos Analíticos”, Catálogo de instrumentos y accesorios de Agilent Technologies 2009-2010, ICH 2002 “Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3, informe 36”, Informe 32 OMS Anexo 5, 2006 “Validación de procedimientos analíticos empleados en el examen de los materiales farmacéuticos”, Journal of Chromatography, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Unión Aduanera 2004 “Guía de validación de métodos analíticos” y sitios webs Internet.

4.4.4.2 Materiales para procesar la información

El análisis se realizó haciendo uso de hojas de cálculo del programa Microsoft Excel 2010, utilizando la herramienta de análisis de datos del programa (Regresión, Fisher, Análisis de Varianza y Correlación), se diseñaron las hojas de cálculos con las formulas correspondiente para verificaron estadísticas de los datos específicamente para tal fin, también se verificó con el programa Minitab 16, presentando la información obtenida a través de cuadros y gráficos en Microsoft Word 2010.

4.4.4.3 Tipos de fuentes de información primaria

Generada por el programa ChemStation versión B.03 (Programa integrado al CLAR. Agilent 1100 series).

Apartado V:
DISEÑO EXPERIMENTAL



5. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGIA ANALITICA GENERAL)

5.1 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

5.1.1 Condiciones cromatográficas

- ✓ Equipo : Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
- ✓ Marca : Agilent
- ✓ Modelo : 1100 Series
- ✓ Columna : Agilent Extend C₁₈ 250 mm x 4.6 mm x 5 µm
- ✓ Fase Móvil : Solución amortiguadora de Fosfato Monobásico de Amonio 0.025 M pH 2.5/Metanol (65:35)

- ✓ Velocidad de Flujo : 1.0 mL/min
- ✓ Presión : 195 ± 5 Bar
- ✓ Sistema : Isocrático
- ✓ Volumen de inyección : 20 µL
- ✓ Jeringa : Hamilton Bonaduz 100 µl
- ✓ Temperatura Horno Columna: Ambiente (20 °C)
- ✓ Sistema de Detección : UV
- ✓ Longitud de Onda : 210 nm
- ✓ Tiempo de Retención : 4.3 Minutos
- ✓ Tiempo de Corrida : 6 Minutos
- ✓ Modo de integración : Áreas
- ✓ Concentración al 100% : Gabapentina 400 µg/mL
- ✓ Modo de inyección : Manual
- ✓ Loop : 20 µL



5.1.2 Condiciones del Método de Disolución

- Medio de disolución : HCl 0.06 N
- Volumen de disolución : 900 mL
- Aparato : 2 (Paletas)
- Revoluciones por minuto : 50 RPM
- Temperatura : $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- Tiempo de prueba : 20 min
- Longitud de onda : 210 nm
- Flujo : 1.0 mL/min
- Volumen de inyección : 20 μL
- Concentración al 100% : Gabapentina 333.33 $\mu\text{g/mL}$ (ver anexo 14)
- Fase móvil : Solución amortiguadora pH 2.5 (Fosfato Monobásico de Amonio): Metanol (65:35)
- Acondicionar la columna con la fase móvil previamente al análisis hasta obtener una fase estable.

5.1.2.1 Programación del equipo Disolutor:

Para la disolución de Gabapentina Cápsula de 300 mg se utilizó el Disolutor Varian VK 7000, de 9 estaciones de las cuales se utilizaron 6 estaciones con vasos de 1000 mL descrito por el Instructivo de Metodología Analítica facilitado por el área de Investigación del Laboratorio CEGUEL S.A, se programaron las condiciones en el disolutor según método en estudio y se esperó hasta que se estabilizara la temperatura de cada una de las estaciones del disolutor a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.



5.2 Preparación de las soluciones de trabajo

5.2.1 Preparación de soluciones reactivos

5.2.1.1 Ácido clorhídrico (HCl 0.06 N)

Se midió con una probeta de 1000 mL, 600 mL de agua destilada y se agregó a un matraz aforado de 1000 mL limpio y seco, se adiciono 5 mL de HCl concentrado medidos con una pipeta volumétrica de 5 mL, sonificándolo por 2 minutos y una vez homogenizado se aforó con agua destilada.

5.2.1.2 Ácido clorhídrico (HCl 1 N)

Se midió con una probeta de 100 mL, 60 mL de agua destilada y se agregó a un matraz aforado de 100 mL limpio y seco, se adiciono 8.5 mL de HCl concentrado medidos con una micropipeta, sonificándolo por 2 minutos y una vez homogenizado se aforó con agua destilada.

5.2.1.3 Hidróxido de sodio (NaOH 1N)

En una balanza analítica se pesó exactamente 4 g de NaOH en un beaker de 50 mL, y se agregó 40 mL de agua destilada, se tapó con parafilm, sonificándolo por 2 minutos hasta completa disolución, transfiriéndose a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada.

5.2.1.4 Solución amortiguadora (NH₄)H₂PO₄ Fosfato Monobásico de Amonio 0.025 M pH 2.5

Se pesó en la balanza analítica exactamente 2.8725 g de (NH₄)H₂PO₄ Fosfato Monobásico de Amonio, se transfirió a un matraz aforado de 1000 mL se disolvió y aforo con agua destilada se agitó de forma manual por 2 minutos hasta completa disolución. Se ajustó el pH de la solución a 2.5 con (H₃PO₄) ácido fosfórico 0.1 %, filtrado con filtro de membranas de nylon y desgasificada con una bomba al vacío.



5.2.2 Preparación de la fase móvil

En la preparación de la fase móvil se empleó solución amortiguadora pH 2.5 (ítem 5.2.1.4) y Metanol grado HPLC, individualmente fueron filtradas con filtro de membranas de nylon y desgasificadas con una bomba al vacío para evitar complicaciones durante el procedimiento analítico. En un beaker de 1000 mL, se adicionaron 650 mL de solución amortiguadora pH 2.5 y 350 mL de Metanol grado HPLC. Agitándose de forma manual por 1 minuto para tener una buena homogeneidad de la fase móvil.

5.2.3 Preparación del estándar secundario Gabapentina para la Curva de Calibrado.

En la preparación de la solución madre; se utilizó estándar secundario de referencia Gabapentina, con un grado de pureza de 100.7 % según certificado de análisis mostrado por el área de investigación del Laboratorio CEGUEL S.A, que por motivo de confidencialidad no se muestra en el documento. En el cual respalda la verificación de su pureza contrastado con el análisis de un estándar primario USP.

Según recomendaciones de la USP 36, se pesó en una balanza analítica con exactitud 24.830 mg de estándar secundario, multiplicándose ese valor por la potencia declarada en la etiqueta del estándar para obtener el valor verdadero de 25.00 mg de gabapentina, transfiriéndose inmediatamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió en HCl 0.06 N, se agitó manualmente y una vez homogenizado se aforó con HCl 0.06 N, obteniéndose una concentración madre de 100.00 % de Gabapentina.

Se preparó a partir de la solución madre las cinco concentraciones para la curva de calibrado: 320 µg/mL, 360 µg/mL, 400 µg/mL, 440 µg/mL, 480 µg/mL (80%, 90%, 100%, 110% y 120%), respectivamente, todas con HCl 0.06 N. Se agitó de forma manual por 2 minutos.

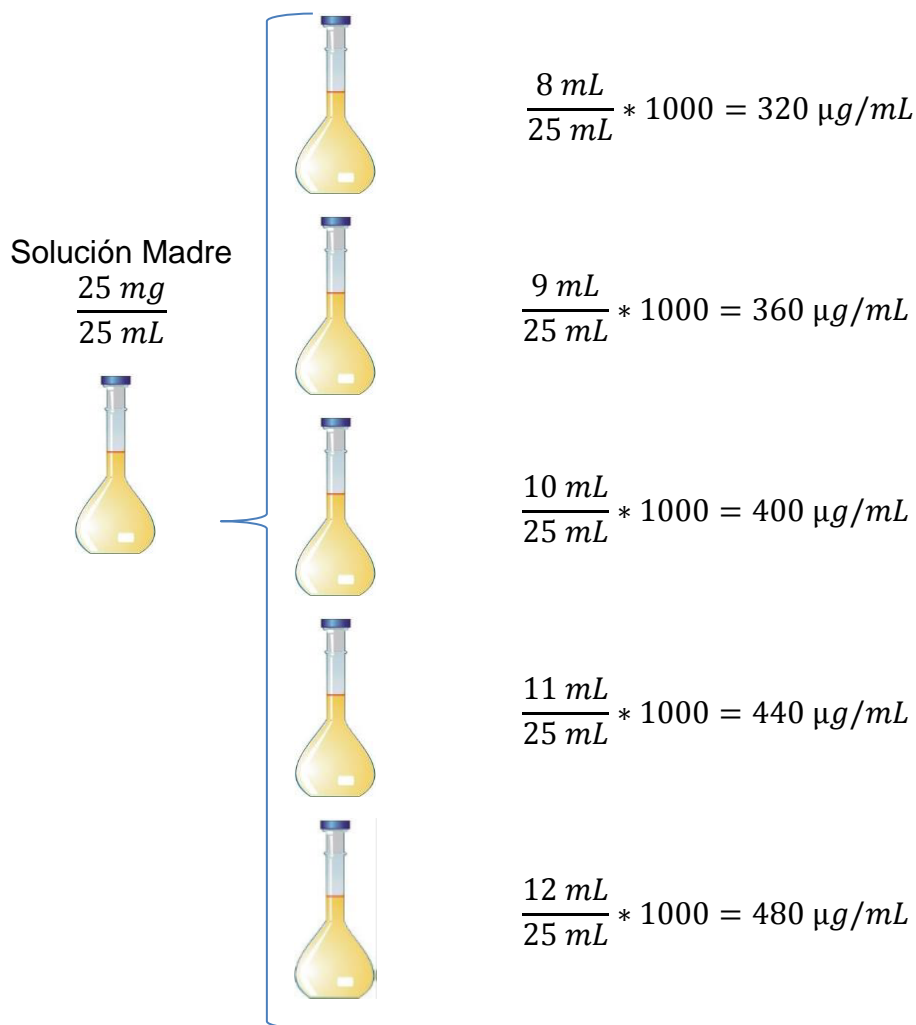


Posteriormente fueron filtradas con filtro de Nylon 0.22 μm , se descartó las cinco primeras gotas para curar el filtro y la jeringa, consecutivamente se adicionó en los viales correspondientes para ser inyectados manualmente en el equipo.

Los cálculos para llegar a las concentraciones finales son las siguientes: (ver Anexo 2 y3)

Diagrama 5.2.3.1

Representación esquemática de la preparación de la curva del calibrado del estándar de Gabapentina.





5.2.3.2 Preparación del estándar secundario Gabapentina al 100 %

Solución 1: Se pesó 25 mg de gabapentina, transfiriéndose inmediatamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió en HCl 0.06 N, se agito manualmente y una vez homogenizado se aforó con HCl 0.06 N.

Solución 2: De la solución 1, se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se aforó con HCl 0.06 N; se agitó de forma manual por 2 minutos, se filtró con filtro de Nylon 0.22 µm. Obteniéndose una concentración de 400.00 µg/mL de estándar de Gabapentina, correspondiente al 100 %.

5.2.4 Preparación de las muestras

5.2.4.1 Preparación de solución Gabapentina cápsula 300 mg

La cantidad de Gabapentina por cápsula de acuerdo a su composición es de 300 mg, al desarrollar el método de determinación cuantitativo del producto, se preparó la muestra considerando la curva de calibrado, tomándose el punto intermedio de la misma para obtener una concentración del 100 % del principio activo en la muestra. Se escogieron 10 cápsulas de manera aleatoria, cada cápsula llena pesó 633.808 mg con un rango de aceptación de ± 5%, el peso promedio del contenido de las cápsulas es de 537.386 mg con un rango de aceptación de ± 5% (ver Anexo 13), siguiendo indicaciones del instructivo de Metodología Analítica de Laboratorio CEGUEL S.A, no se presentó la fórmula cualitativa-cuantitativa de la formulación, debido que es información confidencial.

Posteriormente se pesaron 44.782 mg de muestra que equivalen a 25 mg de Gabapentina contenidos en la cápsula y 19.782 mg de placebo analítico.

$$\text{Cantidad de contenido a pesar} = \frac{537.386 \text{ mg (contenido)} \times 25 \text{ mg (principio activo)}}{300 \text{ mg (concentración declarada)}} = 44.782 \text{ mg}$$



Solución 1: Se pesó 44.782 mg de Gapancel, equivalente a 25 mg de Gabapentina se transfirió a un matraz aforado de 25 mL y se adiciono 15 mL de HCl 0.06 N, sonificándolo por 2 minutos, se aforó con HCl 0.06 N, se agitó de forma manual por 30 segundos.

Solución 2: De la solución 1, se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se aforó con HCl 0.06 N; se agitó de forma manual por 2 minutos, y se filtró con filtro de Nylon 0.22 μm . Obteniéndose una concentración de 400.00 $\mu\text{g/mL}$ de Gabapentina, correspondiente al 100% o sea en el punto intermedio de la curva de calibrado.

5.2.4.2 Preparación de muestras de Gabapentina 300 mg cápsula para la Curva de Calibrado.

Se prepararon en forma independiente 5 soluciones de muestra a las siguientes concentraciones 320 $\mu\text{g/mL}$, 360 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 440 $\mu\text{g/mL}$, 480 $\mu\text{g/mL}$ (80%, 90%, 100%, 110% y 120%), para la cual se pesaron 44.782 mg de muestra equivalente a 25 mg de Gabapentina, transferidos a un matraz aforado de 25 mL se le agrego HCl 0.06 N y se aforaron agitándose de forma manual; para cada solución se tomó un volumen conocido, se transfirieron a un matraz aforado de 25 mL aforando con HCl 0.06N. se filtró con filtro de Nylon 0.22 μm .

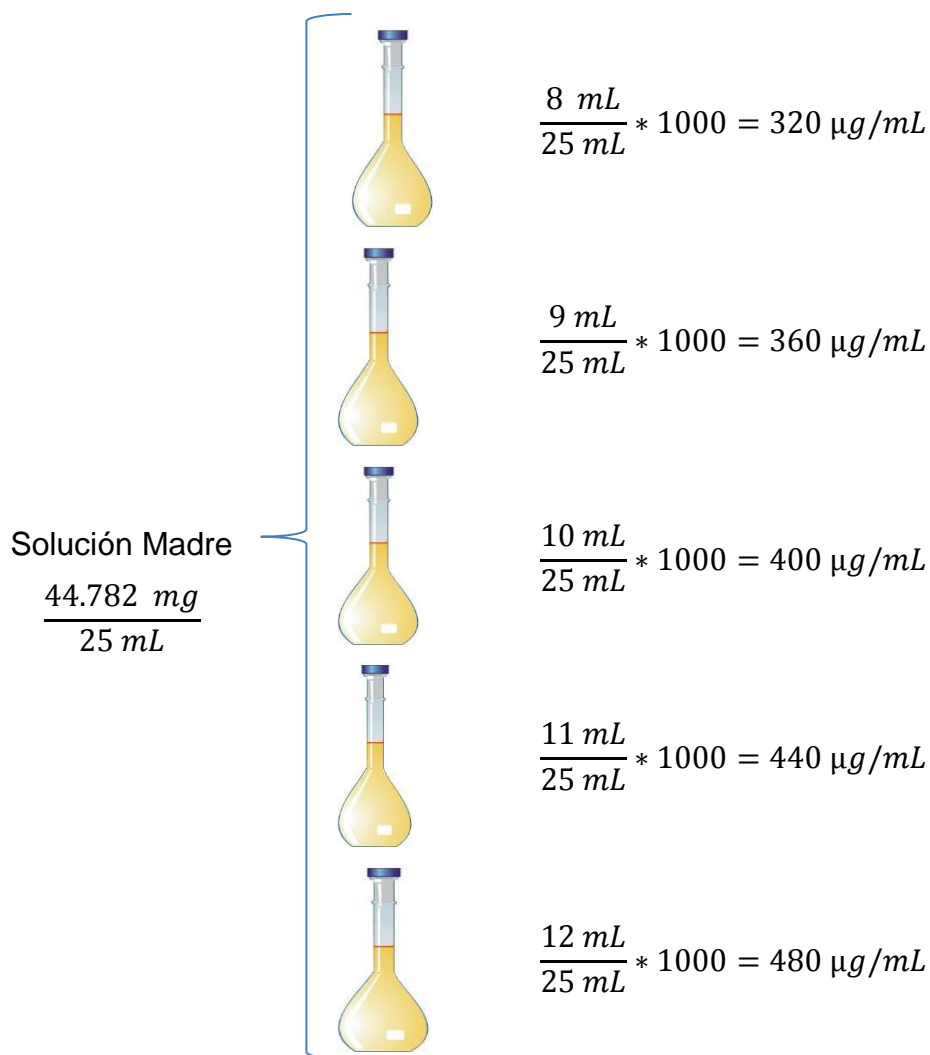
Se analizó por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración.



Los cálculos para llegar a las concentraciones finales son las siguientes: (ver Anexo 2 y 3)

Diagrama 5.2.4.2.1

Representación esquemática de la preparación de la curva de calibrado de Gapancel Cápsula de 300 mg.



5.2.5 Preparación del placebo

Solución 1: Se pesó 19.782 mg de placebo de Gapancel, cápsula, se colocó en un matraz aforado de 25 mL, se agregó HCl 0.06 N, se aforó y agitó de forma manual por 2 minutos.



Solución 2: De la solución 1, se tomó 10 mL, se transfirieron a un matraz aforado de 25 mL, se aforo con HCl 0.06 N, se agito de forma manual por 2 minutos y se filtro con filtro de Nylon 0.22 μm ; con el objetivo de obtener la misma concentración del producto terminado en el análisis.

$$\text{Cantidad de placebo a pesar} = 44.782 \text{ mg (contenido en la cápsula)} - 25 \text{ mg (principio activo)} = 19.782 \text{ mg}$$

5.2.5.1 Solución placebo cargado al 80 %:

Solución 1: se pesó 20 mg de estándar de Gabapentina y 15.825 mg de Placebo de Gapancel, transfiriendo las dos pesadas a un matraz aforado de 25 mL, se agregó HCl 0.06 N y se aforo, agitándose de forma manual por 2 minutos.

Solución 2: De la Solución 1 se tomaron 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 25 mL, se aforo con HCl 0.06 N. Agitándose de forma manual por 2 minutos. Se filtro con filtro de Nylon 0.22 μm .

5.2.5.2 Preparación de la Solución Placebo Cargado al 100 %

Solución 1: Se pesó 25 mg de estándar de Gabapentina y 19.782 mg de placebo de Gapancel, se transfirió las dos pesadas a un matraz aforado de 25 mL, agregó HCl 0.06 N y se aforó, se agitó de forma manual por 2 minutos.

Solución 2: De la Solución 1 se tomó 10 mL y transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se aforo con HCl 0.06 N, se agitó de forma manual por 2 minutos. Se filtró con filtro de Nylon 0.22 μm .

5.2.5.3 Solución placebo cargado al 120 %:

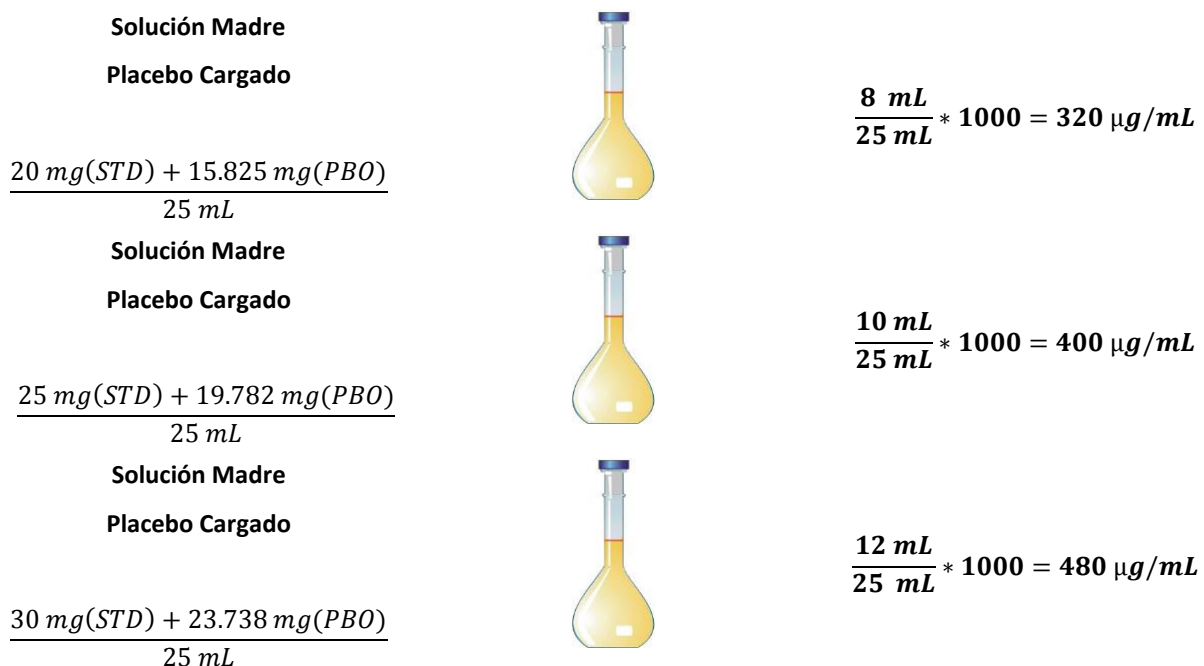
Solución 1: Se pesaron 30 mg de estándar de Gabapentina y 23.738 mg de Placebo de Gapancel, se transfirieron las dos pesadas a un matraz aforado de 25 mL, se agregó HCl 0.06 N y se aforo, agitándose de forma manual por 2 minutos.



Solución 2: De la Solución 1 se tomaron 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 25 mL, se aforo con HCl 0.06 N. Agitándose de forma manual por 2 minutos. Se filtro con filtro de Nylon 0.22 μm .

Diagrama 5.2.5.3.1

Representación esquemática de la preparación de soluciones para la exactitud de Gabapentina Cápsula de 300 mg.



5.2.6 Preparación de las muestras para estabilidad

Se prepararon 3 soluciones de muestra según como se indica en el inciso 5.2.4.1, se realizaron lecturas por triplicado de cada solución muestra, esto corresponde al tiempo inicial, luego se almacenaron cada una de las soluciones de la siguiente forma:

- ✓ Solución 1, a temperatura ambiente del laboratorio (22 °C – 25 °C).
- ✓ Solución 2, protegido de la luz; cubriendo el matraz aforado con papel de aluminio y se colocó en un lugar protegido de la exposición directa a la luz.
- ✓ Solución 3, en refrigeración (2 °C – 8 °C).



Luego se realizaron las lecturas de cada solución en las condiciones de almacenamiento anteriormente mencionadas a las 2, 4, 6 y 8 horas de almacenamiento. Según la guía para la Validación de Método Analítico en el Laboratorio Ceguel S.A AC-017 determinando el factor I para cada intervalo de tiempo y para cada condición de almacenamiento con la siguiente fórmula:

$$I = \sum i/n \quad (\text{Ecuación 3})$$

Primero se calculó el valor de “i” para cada lectura con la fórmula:

$$i = S/T * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

El valor de “i” se obtiene dividiendo el % recuperado en cada lectura en función de la condición de almacenamiento/tiempo (S) entre el % recuperado de la solución inicial (T), es decir, a cero horas y multiplicando por cien.

Donde:

I = Factor I

i = % recuperado de la muestra condición/tiempo en relación a la concentración inicial multiplicado por 100.

n = número de lecturas en la condición/ tiempo evaluada

S = % recuperado de la muestra condición/ tiempo.

T = % recuperado de la muestra inicial.

5.2.7 Preparación de las soluciones para condiciones de stress

5.2.7.1 Termólisis

5.2.7.1.1 Preparación de la solución estándar

Se pesó 25 mg de estándar de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, dejándose enfriar el material volumétrico y se procedio a la preparación de la solución como se indicó en ítem 5.2.3.2



5.2.7.1.2 Preparación de la solución muestra

Se pesó 44.782 mg de Gapancel 300 mg, cápsula equivalente a 25 mg de Gabapentina se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se procedió a la preparación de la solución como se indicó en 5.2.4.1.

5.2.7.1.3 Preparación de la solución placebo

Se pesó 19.782 mg de placebo de Gapancel 300 mg cápsula, luego se transfirió en un matraz aforado de 25 mL, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se procedió a la preparación de la solución como se indicó en 5.2.5

5.2.7.2 Oxidación

5.2.7.2.1 Preparación de la solución estándar

Se pesó 25 mg de estándar de Gabapentina, transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el inciso 5.2.3.2.

5.2.7.2.2 Preparación de la solución muestra

Se pesó 44.782 mg de Gapancel 300 mg, cápsula equivalente a 25 mg de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el inciso 5.2.4.1



5.2.7.2.3 Preparación de la solución placebo

Se pesó 19.782 mg de placebo de Gapancel 300 mg, cápsula luego se transfirió en un matraz aforado de 25 mL, se adicionó 5 mL de agua destilada y 10 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.5.

5.2.7.3 Hidrólisis alcalina

5.2.7 3.1 Preparación de la solución estándar

Se pesó 25 mg de estándar de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de NaOH 1 N y se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se adicionó 5 mL de HCl 1 N se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.3.2.

5.2.7.3.2 Preparación de la solución muestra

Se pesó 44.782 mg de Gapancel 300 mg, cápsula equivalente a 25 mg de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de NaOH 1 N. se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y adicionó 5 mL de HCl 1 N se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.4.1.

5.2.7.3.3 Preparación de la solución placebo

Se pesó 19.782 mg de placebo de Gapancel 300 mg, cápsula luego se transfirió en un matraz aforado de 25 mL, se adicionó 5 mL de NaOH 1 N, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se adiciono 5 mL de HCl 1N, se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.5.



5.2.7.4 Hidrólisis ácida

5.2.7.4.1 Preparación de la solución estándar

Se pesó 25 mg de estándar de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de HCl 1 N y se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se adicionó 5 mL de NaOH 1 N se procedió a la preparación de la solución como se indicó en ítem 5.2.3.2.

5.2.7.4.2 Preparación de la solución muestra

Se pesó 44.782 mg de Gapancel 300 mg, cápsula equivalente a 25 mg de Gabapentina, se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se le adicionó 5 mL de HCl 1 N. se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y adicionó 5 mL de NaOH 1 N se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.4.1.

5.2.7.4.3 Preparación de la solución placebo

Se pesó 19.782 mg de placebo de Gapancel 300 mg, cápsula luego se transfirió en un matraz aforado de 25 mL, se adicionó 5 mL de HCl 1 N, se colocó en el horno a 100 °C por 2 horas. Concluido el tiempo de estrés se retiró el matraz del horno, se dejó enfriar y se adicionó 5 mL de NaOH 1 N, se procedió a la preparación de la solución como se indicó en el ítem 5.2.5.

Se analizó cada solución de estándar, muestra y placebo sometido a estrés por triplicado.

Finalmente se preparó una solución estándar como se indicó en **5.2.3.2**, una solución muestra cómo se indicó en **5.2.4.1** y una solución placebo como se indicó en **5.2.5**. sin someter a estrés y fueron analizadas por triplicado, inyectándose un volumen de 20 µL. Se compararon los resultados obtenidos de las muestras, estándar y placebos sometidos a estrés con el estándar, muestra y placebo sin someter a estrés.



5.3 Preparación del medio de disolución y muestras para el test de Disolución

5.3.1 Ácido clorhídrico (HCl 0.06 N)

Se midió con una probeta de 1000 mL, 6 L de agua destilada y se agregó a un Balde graduado de 12 L limpio y seco, se adiciono 35 mL de HCl concentrado medidos con una pipeta volumétrica de 25 y de 10 mL, agitándolos por 2 minutos y una vez homogenizado se aforó con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 7L.

5.3.2 Preparación de la Solución Muestra (Gabapentina 333.33 µg/mL)

Solución 1: En la balanza analítica se pesaron 6 cápsulas de manera individual de Gapancel, posteriormente una vez alcanzada la temperatura de trabajo deseada en el disolutor, se adicionó una cápsula a cada estación, se hizo uso de hélice de alambre alrededor de cada cápsula para evitar que flotaran durante la prueba, a continuación se dio inicio a la prueba de disolución. Al terminar el tiempo de prueba se apagó el equipo y se tomó de cada estación una porción de muestra. Filtrada con filtro nylon 0.22 µm. Obteniéndose una concentración final de 333.33 µg/mL.

5.4 Validación del método de cuantificación del principio activo

Según la USP 36 el presente trabajo corresponde a la categoría I, en el cual se evaluaron las características de desempeño analítico: linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y exactitud.

5.4.1 Parámetros de validación del método para la cuantificación del activo gabapentina

5.4.1.1 Idoneidad del sistema a validar

Se verifico la adecuación del método analítico observando la capacidad de este, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias químicas diferentes que pueden estar presentes en una misma muestra.



Para la adecuación del sistema se preparó una solución estándar al 100 %. Según ítem 5.2.3.2, luego se procedió a inyectar 20 μ L de manera manual. Se realizó 10 lecturas de los estándares de manera independiente y se determinaron los parámetros según la tabla 5.4.1.1.1.

5.4.1.1.1 Criterios de aceptación

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$CV \leq 2 \%$
Factor de cola	< 2
Número de platos teóricos	> 2000

5.4.1.2 Linealidad del sistema

5.4.1.2.1 Procedimiento:

Se preparó en forma independiente 5 soluciones estándar según inciso 5.2.3. se analizó por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración y se determinaron los parámetros según la tabla 5.4.1.2.1.1.

5.4.1.2.1.1 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación de la linealidad

Parámetros estadísticos	Criterios de aceptación
✓ Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.9900$
✓ Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
✓ Intercepto	Aproximadamente 1
✓ Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero
✓ Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$
✓ 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	$t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$
✓ Coeficiente de variación	$CV \leq 2\%$
✓ Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$
✓ Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.



5.4.1.3 Precisión del Sistema

En la evaluación de la precisión del sistema se evaluó en condiciones de repetibilidad.

5.4.1.3.1 Repetibilidad del sistema

5.4.1.3.1.1 Procedimiento:

En el caso de la Repetibilidad del sistema se preparó una solución estándar al 100%, según como se indica en 5.2.3.2. Se realizaron 10 lecturas de las soluciones estándares.

5.4.1.3.1.2 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación	$CV \leq 2.0 \%$

5.4.1.4 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Ambos límites se determinaron de manera matemáticamente según las ecuaciones 1 y 2.

5.4.1.5 Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés sin interferencias.

5.4.1.5.1 Prueba de identificación del activo

5.4.1.5.1.1 Procedimiento:

Se preparó una solución muestra que contenía el analito a identificar como se indica en el ítem 5.2.4.1 (Solución A). Luego se preparó una solución placebo, que no contenía el analito a identificar como se indica en el apartado 5.2.5. (Solución B). Finalmente se preparó una solución estándar de la sustancia a identificar como se indica en el apartado 5.2.3.2.



Se prepararon tres soluciones que corresponden a solución muestra, solución estándar y solución placebo, según se indican en los ítems 5.2.4.1, 5.2.3.2, 5.2.5. Respectivamente se analizaron cada una de ellas por duplicado y se compararon las señales obtenidas en la muestra y el placebo con las señales obtenidas para el estándar, con la finalidad de comprobar que no existe interferencia de los excipientes en la determinación del principio activo.

5.4.1.5.1.2 Criterio de aceptación:

Deben obtenerse los siguientes resultados para cada solución:

- La solución A. Identificación positiva.
- La solución B. Identificación negativa.

5.4.1.5.2 Selectividad frente a los excipientes

Se prepararon 2 soluciones de placebo como se indica en 5.2.5; luego se prepararon 2 soluciones de placebo cargado como se indica en 5.2.5.2; finalmente se prepararon 2 soluciones estándar como se indica en 5.2.3.2. Se analizaron cada solución por triplicado, con un volumen de inyección de 20 μ L.

Se compararon las señales obtenidas de la solución placebo y del placebo cargado con respecto al estándar.

5.4.1.5.2.1 Criterios de aceptación:

La señal obtenida para el placebo no debe interferir con la señal obtenida con el estándar.

La señal obtenida para el placebo cargado debe coincidir con la señal obtenida para el estándar.

5.4.1.5.3 Selectividad frente a productos de degradación

Se sometió a estrés una cantidad de estándar, muestra y placebo en las siguientes condiciones: Termólisis, Oxidación, Hidrólisis ácida e Hidrólisis alcalina.



5.4.1.5.3.1 Criterio de aceptación:

Los productos de degradación no deben presentar ninguna señal que interfiera con la señal obtenida para el estándar y la muestra sin someter a estrés.

5.4.1.5.4 Exactitud

La Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el registro de productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH) 24, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajó con tres niveles diferentes de concentración (80%, 100%, 120%) con tres soluciones de placebo cargado, aplicando el tipo de análisis: mezcla de excipientes, se prepararon las soluciones según inciso 5.2.5.1, 5.2.5.2, y 5.2.5.3 respectivamente.

Se realizaron lecturas por triplicado a cada nivel de concentración. Luego se tabuló y se procesó los resultados obtenidos determinando los parámetros según la tabla 5.4.1.5.4.1

5.4.1.5.4.1 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
% Promedio Recuperado	90.0 % - 110.0 %
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$
Test de t	$t_{exp} < t_{tab}$



5.5 Parámetros de validación del método para la cuantificación del activo Gabapentina en Gancel 300 mg cápsula

5.5.1 Linealidad del método

5.5.1.1 Procedimiento:

Se prepararon 5 muestras independientes de Gabapentina 300 mg Cápsula como se indica en el inciso 5.2.4.2, se analizó por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración.

Se tabularon y procesaron los resultados obtenidos haciendo uso del programa EXCEL para determinar los parámetros estadísticos y criterios de aceptación mostrados en la tabla 5.5.1.1.1.

5.5.1.1.1 Parámetros estadísticos y criterio de aceptación de la linealidad

Parámetros estadísticos	Criterios de aceptación
✓ Coeficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 3.0 \%$
✓ Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.9900$
✓ Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
✓ Intercepto	Aproximadamente 1
✓ Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero
✓ Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$
✓ 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	$t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$
✓ Coeficiente de variación	$CV \leq 2\%$
✓ Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$
✓ Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.



5.5.2 Precisión del método

5.5.2.1 Repetibilidad del método

5.5.2.1.1- Procedimiento:

Se prepararon cinco soluciones de muestra al 100 %, según como se indica en el inciso 5.2.4.2 y se analizaron por triplicado. Se tabularon los resultados obtenidos y se realizó el procesamiento estadístico de los resultados determinando los parámetros estadísticos y criterios de aceptación según la tabla 5.5.2.1.1.1.

5.5.2.1.1.1 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación	$\leq 2.0 \%$

5.5.2.2 Precisión intermedia

5.5.2.2.1 Procedimiento:

La precisión intermedia fue realizada por dos analistas en dos días diferentes. Por cada analista se prepararon 3 soluciones de muestras independientes al 100 %, según como se indica en el inciso 5.2.4.1 y se analizó cada muestra por triplicado. Repitiéndose este procedimiento por dos días consecutivos.

5.5.2.2.1.1 Criterio de aceptación de la precisión intermedia

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación	$\leq 2\%$
Coeficiente de variación global	$\leq 2\%$
Análisis de varianza con el test de Fisher	$F_{exp} < F_{tab}$
Factor de cola	< 2
Número de platos teóricos	$> 2000.$



5.5.3 Robustez

La evaluación de la robustez se realizó con pequeñas modificaciones a las condiciones normales de trabajo:

Condiciones normales de trabajo	Modificaciones
Flujo 1.0 mL / min	Cambio del flujo de: a) 1.0 mL/min a 0.9 mL/min b) 1.0 mL/min a 1.1 mL/min
Longitud de onda 210 nm	Cambiando de longitud de onda de: a) 210 nm a 207 nm b) 210 nm a 213 nm
Fase móvil Buffer pH 2.5 : Metanol (65:35)	Cambio de proporciones de Fase móvil: Solución amortiguadora pH 2.5: Metanol (50:50)

Para este parámetro se procedió a preparar una solución estándar al 100 % siguiendo el procedimiento escrito en 5.2.3.2 y se realizaron lecturas por triplicado, y se determinaron el porcentaje promedio recuperado, el coeficiente de variación, el factor de capacidad, número de platos teóricos, el factor de cola y la diferencia absoluta para cada cambio en el solvente y longitud de onda.

5.5.3.1 Criterios de aceptación

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación para cada cambio/condición	$CV \leq 3 \%$
Factor de capacidad (K')	$K' > 1$
Número de platos teóricos (N)	$N > 2000$
Factor de cola	< 2



5.6 Estabilidad

5.6.1 Estabilidad de la solución analítica

5.6.1.1 Procedimiento:

Se prepararon 3 soluciones de muestra según como se indica en el inciso 5.2.6 Posteriormente se determinó el factor I para cada intervalo de tiempo y para cada condición de almacenamiento.

5.6.1.1.1 Criterio de aceptación:

La muestra es estable en la condición de almacenamiento evaluada si el valor de la media para el factor I se encuentra dentro del rango: 90.0% -110.0%.

5.7 Test de disolución

Prueba física en la cual se mide la capacidad que tiene tanto el fármaco puro (disolución intrínseca), como el que está contenido en una forma farmacéutica sólida, para disolverse en un medio determinado y bajo condiciones experimentales controladas.

Para la prueba de disolución se prepararon las condiciones del método como se indica en el inciso 5.1.2, luego se programó el equipo como indica el inciso 5.1.2.1, posteriormente se procedió a preparar el medio de disolución como indica el inciso 5.3.1, seguidamente se realizó la preparación de la muestra según el inciso 5.3.2.

5.7.1 Parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Valor de Q para 20 minutos	Q no debe ser menos del 80 % en 20 minutos.
Coeficiente de variación	$\leq 5.00\%$



5.8 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES

REACTIVOS

No	Nombres	Formula Química	Marca	Grado	Lote	Procedencia	Fecha de Vencimiento
1	Agua Destilada	H ₂ O	-	HPLC	MP12078	Laboratorio Ceguel	-
2	Ácido Fosfórico 85%	H ₃ PO ₄	J.T.Baker	ACS	Mp2114	Productos el sol	07- 2014
3	Hidróxido de Sodio	NaOH	J.T.Baker	ACS	J41D51	Productos el sol	7-2015
4	Peróxido de Hidrógeno 3%,	H ₂ O ₂	Fischer Scientific	ACS	076878	Productos el sol	12-2015
5	Fosfato Monobásico de Amonio	(NH ₄) H ₂ PO ₄	Baker Analyzed	HPLC	G50472	Productos el sol	12-2014
6	Metanol	CH ₃ OH	J.T.Baker	HPLC	M22C18	Productos el sol	02- 2016



EQUIPOS

N°	Nombres	Marca	Modelo	N° Serie	Muestra de verificación de Calibración.
1	Agitador Ultrasónico	Fisher Scientific	FS - 30	RTA 12015907 5	10-2013
2	Bomba al Vacío	WELCH LIMVAC	WO187H	11708741	-
3	Agitador magnético y cocina	Corning stirrer/hot plate	PC-620	37080402 8265	-
4	Balanza Analítica	Mettler Toledo	XS104	11272208 04	10-12-2013
5	Computadora	IBM	6332 – PHN	VR53133	-
6	Disolutor	Varian	VK 7000	1-0585- 0907	10-12-2013
7	Cromatógrafo líquido de alta precisión.	Agilent	1100	70239	10-12-2013
8	Horno	VWR	1327F	11020706	-
9	pH – metro	Sartorius	PB-11	12 VDC	28-11-2013



MATERIALES

Cantidad	Materiales	Capacidad	Marca	Clase/ Tolerancia
1	Balde graduado plástico	12 L	-	-
5	Balón aforado	1000 mL	Pyrex	A/ ± 0.400 mL
2	Balón aforado	100 mL	Pyrex	A/ ± 0.1 mL
5	Balón aforado	50 mL	Pyrex	A/ ± 0.060 mL
12	Balón aforado	25 mL	Pyrex	A/ ±0.040 mL
6	Beaker	100 mL	Pyrex	A
6	Beaker	50 mL	Pyrex	A
1	Bureta	10 mL	Pyrex	A
1	Calculadora científica		Casio fx- 95MS	-
1	Columna Zorbax Eclipse Plus C18	Agilent Extend C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm	Agilent	-
40	Econofiltro 0.22 nylon		Fisher Scientific	-
2	Espátula		Fisherbrand	-
15	Filtro para disolutor		Varian	-
1	Kit de microfiltración		SIBATA	
1	Micropipeta	10 mL	Thermo Scientific	F1
1	Micropipeta	1000 µL	Thermo Scientific	F1
3	Pipeta volumétrica	25 mL	Fisherbrand	A
3	Pipeta volumétrica	10 mL	Fisherbrand	A
3	Pipeta volumétrica	5 mL	Fisherbrand	A/± 0.015 mL
1	Probeta	50 mL	Pyrex	A
1	Probeta	1000 mL	Pyrex	A
1	Termómetro (-20°C +110°C)		Fisherbrand	-

Apartado VI:
RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN DE RESULTADOS



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Técnica Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con una bomba Isocrática.

Todos los parámetros se evaluaron con un nivel de confianza de 95%.

6.1.1 Adecuación del sistema

Se verificó la adecuación del sistema analítico observando la capacidad de éste, de detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias químicas diferentes que pueden estar presentes en una misma muestra.

Para comprobar la adecuación del sistema, se preparó una solución estándar al 100 % y se realizaron 10 lecturas a 210 nm. El tiempo de retención obtenido fue de 4.3 minutos para la muestra anteriormente mencionada. Los estudios de adecuación demostraron que el sistema cumple con las especificaciones para la que se ha establecido y validado dicho método, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 6.1.1.1: Tratamiento estadístico de la adecuación del sistema

Concentración (%)	Tiempo de retención	Área (mAu) Variable y	Altura	Número de platos Teóricos	Factor de cola
100	4.409	156.710	11.750	2655	0.511
100	4.424	157.799	11.730	2600	0.527
100	4.396	156.512	11.690	2624	0.540
100	4.387	157.920	11.590	2622	0.526
100	4.380	157.715	11.550	2618	0.516
100	4.385	156.471	11.600	2633	0.519
100	4.385	156.190	11.330	2631	0.515
100	4.388	156.706	11.620	2628	0.534
100	4.387	156.547	11.410	2635	0.521
100	4.397	156.332	11.780	2704	0.522
Promedio	4.394	156.890	11.605	2635	0.523
DS	0.013	0.656	0.146	27.956	8.90E-03
CV	0.306	0.418	1.257	1.061	1.700

Fuente: Software Chemstation Agilent 1100 series y Programa Microsoft Excel 2010



El ensayo de adecuación del sistema cumple con las especificaciones establecidas, debido que los cromatogramas registraron un coeficiente de variación menor al 2 %, la eficiencia de la columna determinada a partir del pico del analito no es menor de 2000 platos teóricos; el factor de cola para el pico de analito no es mayor de 2 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más del 2 %.

El sistema no reportó variabilidad significativa entre los resultados obtenidos en una serie de análisis efectuados bajo las mismas condiciones operativas (mismo analista, equipo, reactivos y laboratorio) en un período de tiempo corto.



6.1.2 Linealidad del sistema (Gabapentina)

Para la determinación de la linealidad se prepararon 5 soluciones estándares a concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, como se indica en el inciso 5.2.3. Se realizaron análisis por triplicado de cada solución a una longitud de onda de 210 nm y los resultados obtenidos son los siguientes:

TABLA N° 6.1.2.1. Evaluación de la curva de calibración en CLAR

N° Muestras	Concentración (%) Variable x	Área (mAU) Variable y	Platos teóricos (N)	Tiempo muerto (t _m)	Tiempo retención (t _r)	Factor de capacidad k'	Factor de Cola
1	80	124.773	2652.000	2.147	4.566	2.419	0.447
	80	124.269	2652.000	2.147	4.566	2.419	0.477
	80	124.300	2946.000	2.138	4.477	2.339	0.437
2	90	140.700	2644.000	2.127	4.400	2.249	0.414
	90	140.900	2689.000	2.125	4.384	2.259	0.413
	90	140.700	2680.000	2.125	4.376	2.259	0.413
3	100	155.200	2546.000	2.136	4.370	2.234	0.383
	100	155.400	2482.000	2.119	4.417	2.298	0.396
	100	155.600	2465.000	2.136	4.453	2.234	0.383
4	110	171.000	2323.000	2.133	4.473	2.347	0.380
	110	171.020	2384.000	2.128	4.480	2.355	0.396
	110	171.065	2283.000	2.128	4.483	2.355	0.396
5	120	186.164	2174.000	2.139	4.471	2.350	0.401
	120	186.702	2521.000	2.139	4.503	2350	0.401
	120	186.297	2145.000	2.140	4.489	2.339	0.401
Pendiente (b)				1.5414			
Intercepto (a)				1.4629			
Coeficiente de correlación(r)				0.9999			
Coeficiente de determinación (r ²)				0.9997			

Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series y Programa Microsoft Excel 2010



En la tabla 6.1.2.1 reflejan los datos proporcionado por el software ChemStation de Agilent 1100 series, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r^2).

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} = 0.9999 \quad (\text{Ecuación 5})$$

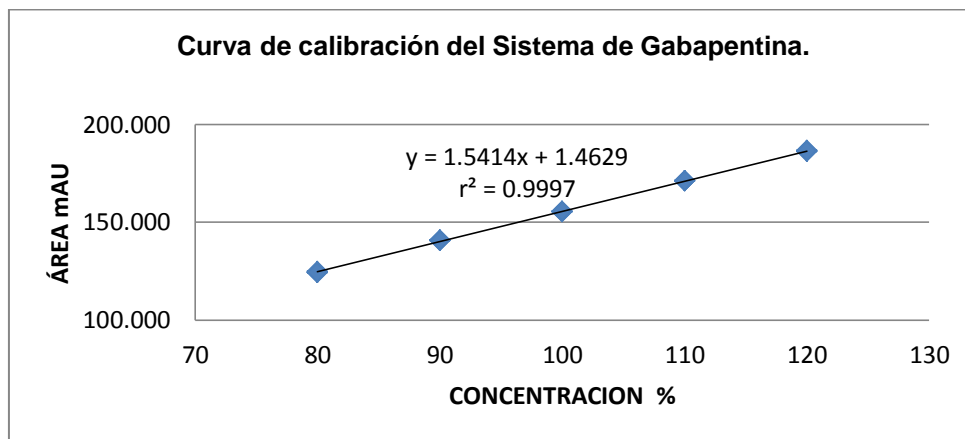
Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = 0.9999^2 = 0.9997 \quad (\text{Ecuación 6})$$

A continuación se presenta el calibrado y la ecuación de la recta, en ella se observa una proporcionalidad entre concentración y respuesta cromatográfica.

GRAFICO N°6.1.2.1.1

Curva de calibración en área de Gabapentina en CLAR



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series y Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según $y = 1.5414x + 1.4629$ con $r = 0.9999$ y $r^2 = 0.9997$



6.1.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad del sistema CLAR

La mayoría de los métodos analíticos se basan en una curva de calibración en la que una cantidad medida “y” se representa en función de la concentración conocida “x” de una serie de patrones. (Skoog, 2003)

La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = bx + a$, donde “b” es la pendiente, “x” es la concentración de analito y “a” la ordenada en el origen, obtenida por un método de ajuste (AEFI, 2001).

Se utilizó el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Skoog, 2003)

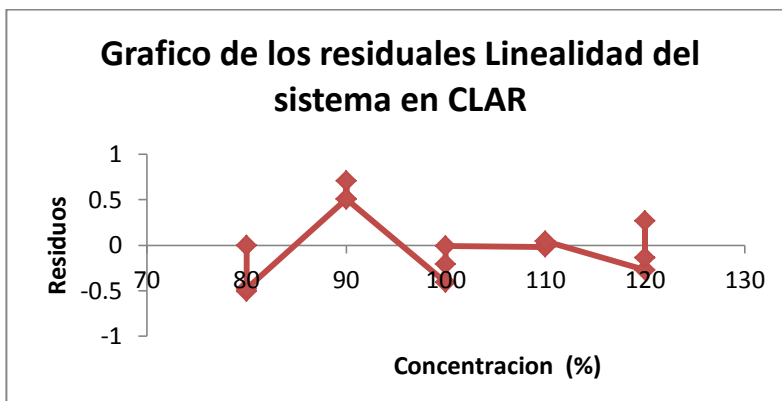
**TABLA N°6.1.2.2.1****Análisis de mínimos cuadrados en los datos de la Linealidad del sistema en CLAR**

Conc. (%) Valores x	Área Valores y	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	$\sum x_i^2$	$\hat{Y} = b \cdot x + a$	$e_i = (\hat{y} - y)$ residuales
80.000	124.773	-20.000	400.000	-30.8334	950.701	616.669	6400	124.777	0.004
80.000	124.269	-20.000	400.000	-31.3370	982.009	626.740	6400	124.777	
80.000	124.300	-20.000	400.000	-31.3060	980.067	626.120	6400	124.777	
90.000	140.700	-10.000	100.000	-14.9060	222.189	149.060	8100	140.192	-0.508
90.000	140.900	-10.000	100.000	-14.7060	216.267	147.060	8100	140.192	
90.000	140.700	-10.000	100.000	-14.9060	222.189	149.060	8100	140.192	
100.000	155.200	0.000	0.000	-0.4060	0.164	0.000	10000	155.606	0.406
100.000	155.400	0.000	0.000	-0.2060	0.042	0.000	10000	155.606	
100.000	155.600	0.000	0.000	-0.0060	0.000	0.000	10000	155.606	
110.000	171.000	10.000	100.000	15.394	236.974	153.939	12100	171.020	0.020
110.000	171.020	10.000	100.000	15.414	237.590	154.139	12100	171.020	
110.000	171.065	10.000	100.000	15.454	238.980	154.589	12100	171.020	
120.000	186.164	20.000	400.000	30.558	933.813	611.167	14400	186.435	0.270
120.000	186.702	20.000	400.000	31.096	966.982	621.926	14400	186.435	
120.000	186.297	20.000	400.000	30.691	941.936	613.819	14400	186.435	
$\Sigma = 1500.000$	$\Sigma = 2334.090$	0.000	$\Sigma = 3000.000$	0.000	$\Sigma = 7129.909$	$\Sigma = 4624.294$	$\Sigma = 153000$		
$\bar{X} = 100.000$	155.606	0.000	200.000	0.000	475.327	308.286			

Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series y Programa Microsoft Excel 2010



Gráfico 6.1.2.2.1.1 Análisis de Residuales de la Linealidad del Sistema



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia demostrándose la ausencia de error sistemático, observando los residuales se aprecia que para el método analítico en CLAR el modelo se ajusta bien a los datos, ya que la distribución de los residuos es aleatoria, por tanto, el sistema es válido.

La ecuación utilizada para \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 7})$$

Según, Skoog (2003), la línea generada por el método de mínimos cuadrados es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuos de todos los puntos. Además de aportar el mejor ajuste entre los puntos experimentales y la línea recta, el método proporciona la desviación estándar de la pendiente (b) y el intercepto (a).

Conviene calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las variables de S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} y de forma siguiente encontrar la pendiente y el intercepto:



- 1. S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.**

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

x_i = pares de datos individuales de x

\bar{x} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{xx} = 3000.000$$

- 2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.**

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 7129.909$$

- 3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.**

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} = 4624.294$$



Para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$b = \frac{4624.294}{3000.000} = 1.5414$$

Dónde:

S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x

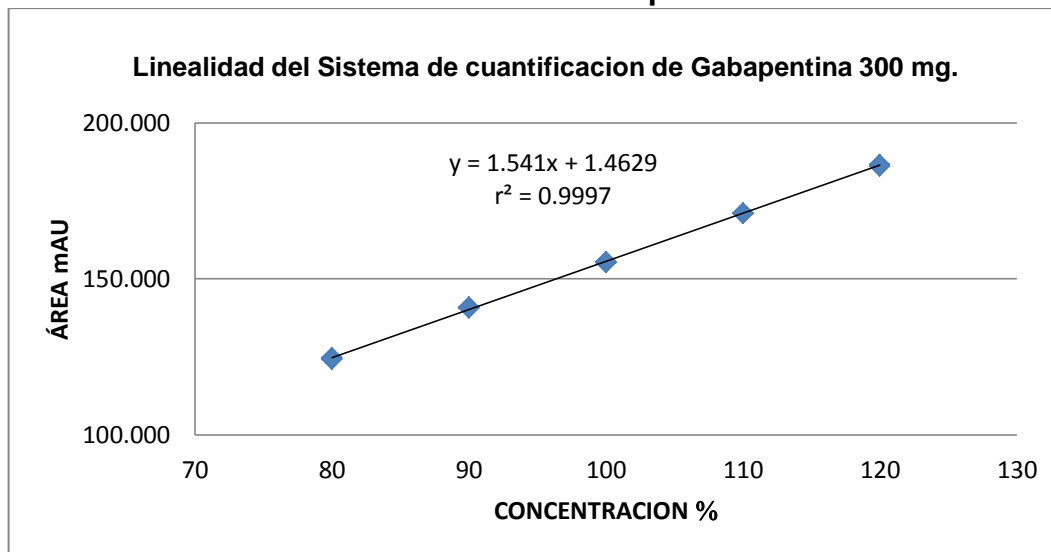
Ecuación del intercepto (a):

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$a = 155.606 - (1.541 * 100.000) = 1.4629$$

GRAFICO N° 6.1.2.2.1.2

Linealidad del sistema de Gabapentina en CLAR



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 series y programa Microsoft Excel 2010



Según, Skoog (2003), la pendiente es un factor que limita la sensibilidad, siendo el valor de la pendiente de 1.5414 y el sesgo es de 1.463 indicado por el valor del intercepto.

6.1.2.3 Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en CLAR

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student. Para calcular el t_{exp} de dos cola, para $n-2$ grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha=0.05$ ($\alpha/2= t_{0.975, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp}(b) = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Para encontrar el t_{exp} es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r) para obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{7129.9086 - ((1.5414312)^2 * 3000.000)}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{7129.9086 - 7128.0304}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{1.8782}{13}} = \sqrt{0.1445} = 0.3801$$



Desviación estándar de la pendiente (S_b)

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$;

$$\begin{aligned} \text{Hipótesis } H_0: \mu_1 &= \mu_2 \\ H_1: \mu_1 &\neq \mu_2 \end{aligned}$$

$$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 15})$$
$$S_b = \sqrt{(0.3801)^2 / 3000.0000} = \sqrt{4.8159E - 05} = 0.00694$$

Se obtiene:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{1.54143}{0.00694} = 222.1080$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{1.54143}{0.00694} = 222.1081$$

Al comparar el valor t_{exp} con el t_{tab} , se demostró que existen diferencias significativas, siendo $t_{\text{exp}} 222.1081 > t_{\text{tab}} 2.160$, comprobando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero.

Intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calculó:

$$\begin{aligned} b \pm t * S_b &= 1.54143 \pm 2.16 * 0.00694 \\ &1.54143 \pm 0.01499 \\ &[1.52644 \text{ a } 1.55642] \end{aligned}$$



6.1.2.4 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en CLAR

Mediante este test se evaluó que la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando que la variable independiente (x) es significativamente distinta de cero.

Cabe mencionar, en el inciso 2.3 el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} < t_{tab}$:

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación 16})$$

|a| = valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto

Para encontrar el t_{exp} para el intercepto es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r), la cual fue calculada en el inciso 6.1.2.3 con la ecuación 14, siendo éste un valor de 0.3801 y por ende obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar del intercepto (S_a)

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$S_a = 0.3801 * \sqrt{\frac{1}{15 - \left(\frac{2250,000}{153,000} \right)}}$$



$$S_a = 0.3801 * \sqrt{\frac{1}{15 - 14.7059}}$$

$$S_a = 0.3801 * \sqrt{\frac{1}{0.2941}}$$

$$S_a = 0.3801 * \sqrt{3.4002} = 0.3801 * 1.8440 = 0.7009$$

$$S_a = 0.7009$$

$$t_{\text{exp}(a)} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{1.4629}{0.7009} = 2.0872$$

Se cumplió que $t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$. Para calcular el t_{tab} de dos cola, para n-2 grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.95, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160, siendo $t_{\text{exp}(a)} 2.0872 < t_{\text{tab}} 2.160$; se comprueba que la variable x es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calculó:

$$a \pm t * S_a = 1.4629 \pm 2.16 * 0.7009$$

$$1.4629 \pm 1.5139$$

$$[-0.0510 \text{ a } 2.9768]$$

6.1.2.5 Test G de Cochran

La prueba de Cochran se realizó para determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas.

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2_{\text{máxima}}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Dónde:

s^2 máxima: varianza máxima de los grupos

$\sum s_i^2$: sumatoria de la varianza de cada grupo



El valor crítico de Cochran se determina $C = (K, v, \alpha)$

Dónde:

K: es el número de grupo de datos o números de réplicas

U: es el número de grado de libertad definido como $n_{\max} - 1$, donde n_{\max} es el mayor de los tamaños de la muestra y α el nivel de significancia usualmente 0.05.

El criterio de aceptación: si el $G_{exp} < G_{tab}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influyen estadísticamente en la variabilidad de los resultados.

Prueba de homogeneidad de varianzas

TABLA N° 6.1.2.5.1

Test de G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR

N°	Concentración % X	Área (mAu) Y	Factor de respuesta F = Y/X	Promedio de F = Y/X	Desviación Estándar de F = Y/X	Varianza (S ²) de F = Y/X
1	80	124.773	1.560	1.55559	0.00352771	0.0000124
	80	124.269	1.553			
	80	124.300	1.554			
2	90	140.700	1.563	1.56407	0.00128300	0.0000016
	90	140.900	1.566			
	90	140.700	1.563			
3	100	155.200	1.552	1.55267	0.00115470	0.0000013
	100	155.400	1.552			
	100	155.600	1.554			
4	110	171.000	1.555	1.55480	0.00030265	0.0000001
	110	171.020	1.555			
	110	171.065	1.555			
5	120	186.164	1.551	1.55323	0.00233563	0.0000055
	120	186.702	1.556			
	120	186.297	1.552			
Promedio (\bar{x})			1.556	ΣS_i^2 0.0000210		
Desviación Estándar (S)			0.005			
CV (%)			0.321			

Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 v programa Microsoft Excel 2010



La hipótesis es:

$$H_0 = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

$$G_{exp} = \frac{0.0000124}{0.0000210} = 0.593$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis nula donde se comprueba que **X** o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de $f(y/x)$ G_{exp} $0.593 < G_{tab} (\alpha = 0.05, K = 5, n = 3) = 0.683$.

6.1.2.6 Coeficientes de variación de los factores de respuestas

Esta prueba permitió relacionar la lectura o respuesta en área y la concentración. Se recomienda obtener valores menores al 2 % para ello se aplicó la siguiente ecuación: (AEFI, 2001).

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Dónde:

S = desviación estándar

\bar{X} = media de los resultados

Según en la tabla N° 6.1.2.5.1 test G de Cochran, varianza de los factores de respuesta en CLAR, la desviación estándar global del factor respuesta es de: 0.005 y el promedio global es de 1.556 por tanto:

$$CV = \frac{0.005}{1.556} * 100 = 0.321 \%$$



Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta (CV.) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV = 0.321 \% < 2 \%$ demostrándose la adecuada linealidad del sistema.

6.1.2.7 Análisis de varianza en CLAR

El análisis de la varianza de la regresión (ANOVA) es un método que se emplea para comparar resultados obtenidos por distintos métodos, laboratorios, analistas, etc., cuando el número de medias obtenidas es superior a dos. También permite separar las contribuciones de uno o más factores a la varianza global del sistema (AEFI, 2001).



Tabla N° 6.1.2.7.1

Análisis de varianza en CLAR

Análisis de Varianza		Análisis de Residual			Análisis de la Regresion	
Concentración (%) X	Área (mAu) Y	$\hat{y} = b * x + a$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
80	124.800	125.5695	-0.7969	0.6350	-30.0366	902.1952
80	124.300	125.5695	-1.3005	1.6912	-30.0366	902.1952
80	124.300	125.5695	-1.2695	1.6115	-30.0366	902.1952
90	140.700	140.9838	-0.2838	0.0805	-14.6223	213.8103
90	140.900	140.9838	-0.0838	0.0070	-14.6223	213.8103
90	140.700	140.9838	-0.2838	0.0805	-14.6223	213.8103
100	155.200	156.3981	-1.1981	1.4354	0.7921	0.6274
100	155.400	156.3981	-0.9981	0.9962	0.7921	0.6274
100	155.600	156.3981	-0.7981	0.6369	0.7921	0.6274
110	171.000	171.8124	-0.8124	0.6600	16.2064	262.6465
110	171.000	171.8124	-0.7924	0.6279	16.2064	262.6465
110	171.100	171.8124	-0.7474	0.5586	16.2064	262.6465
120	186.200	187.2267	-1.0623	1.1285	31.6207	999.8676
120	186.700	187.2267	-0.5243	0.2749	31.6207	999.8676
120	186.300	187.2267	-0.9297	0.8643	31.6207	999.8676
$\bar{X} = 100.000$	155.600	156.3981	SC_{RES} = 11.2886		SC_{REG} = 7137.4408	
	$\Sigma = 2334.100$					

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a$$

(Ecuación 7)



Según AEFI (2001), el análisis de la varianza se fundamentó en la suma de cuadrados totales la cual se descompone en dos componentes, la suma de cuadrados de los residuales y la regresión: $SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$

Según la ecuación reflejada en AEFI (2001), se calculó la varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

Varianza Residual:

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \quad (\text{ecuacion 20})$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{11.2886}{13} = 0.8684$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = 0.8684$$

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SC_T = 11.2886 + 7137.4408 = 7148.7294$$

$$SC_T = 7148.7294$$

Varianza de la Regresión:

$$S^2_{y^*} = \sum \frac{(y_i^* - \bar{y})^2}{N} \quad (\text{Ecuacion 22})$$

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{7137.4408}{15} = 475.8294$$

Una vez realizados los cálculos de las varianzas y de los residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), el cual es una prueba estadística que sirve para comparar varianzas, donde se cumple el criterio que $F_{exp} > F_{tab}$.



La hipótesis es:

$$H_0 = F_{exp} > F_{tab}$$

$$H_1 = F_{exp} < F_{tab}$$

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad (\text{Ecuación 23})$$

Dónde:

SC_{REG}: suma de cuadrados de la regresión

V_{RES}: 0.8684

V_{REG}: 475.8294 para un grado de libertad

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} = \frac{475.8294}{0.8684} = 547.9380$$

Por lo tanto Fisher será: $547.9380 > F_{tab} (0.05, 1, n-2) = 4.667$ cumpliendo el criterio de aceptación, por lo que se acepta $H_0 = F_{exp} > F_{tab}$ demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.

Se validó la linealidad de la metodología del sistema, para lo cual se partió de una solución concentrada de estándar gabapentina, se preparó una curva de calibración, con 5 niveles de concentración del analito en el rango de trabajo de 80 % a 120% de concentración teórica.

La evaluación de los coeficientes de determinación r^2 y de correlación r , en el sistema demostraron correlación entre la concentración (%) y la respuesta (área), y que los cambios en la respuesta (variable dependiente) son debidos a variación en la concentración (variable independiente) (AEFI, 2001).



Se aplicaron diferentes test estadísticos para demostrar la linealidad del sistema, como: el ajuste de la curva de calibración por mínimos cuadrados, obteniéndose los valores de la pendiente y el intercepto con sus respectivas desviaciones estándares, aplicándose el t de Student para demostrar que existe diferencia significativa.

Con la aplicación del test de Cochran se demostró la homogeneidad de varianza. Se realizó el análisis de varianza de la regresión ANOVA, se evaluaron los residuos y se determinó que estos son independientes y tienen distribución normal, presentado Homocedasticidad y que la relación entre concentración y área es lineal.

Ver anexo 5 (gráfica de residuales), también se aplicó el test estadístico F de Fisher para verificar la linealidad. Bajo la evidencia muestral y con un nivel de confianza del 95%, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de los niveles estudiados, obteniendo un valor f de Fisher experimental mayor que el valor de f tabulado, indicando regresión.

6.1.3 Precisión del sistema en CLAR

Para evaluar la precisión se trabajó con muestras de estándar secundario de Gabapentina con un grado de pureza de 100.70 %. El estudio de la precisión se realizó mediante la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia del sistema.

6.1.3.1 Repetibilidad del sistema en CLAR

La repetibilidad se analizó mediante la evaluación de 10 determinaciones, se trabajó con la concentración media de trabajo de 100 %; se determinaron los valores medios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación en función al factor de respuesta.

**TABLA N°6.1.3.1.1****Evaluación de Repetibilidad del sistema en CLAR**

Número de lecturas	Concentración (%) Variable x	Área (mAU) Variable y	Factor Respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)		T _r	N
				Media	Desviación estándar (S)		
1	100	156.400	1.564	1.547	0.013	4.356	2430.000
2	100	153.800	1.538			4.372	2432.000
3	100	152.400	1.524			4.382	2443.000
4	100	153.700	1.537			4.383	2423.000
5	100	155.300	1.553			4.392	2431.000
6	100	154.443	1.544			4.398	2450.000
7	100	156.420	1.564			4.395	2447.000
8	100	154.200	1.542			4.394	2463.000
9	100	155.700	1.557			4.391	2443.000
10	100	155.100	1.551			4.380	2451.000
Coefficiente de Variación CV, %			0.840 %	Cumple			
Criterio de aceptación CV (%) ≤ 2%			Conclusión				

Fuente: Software ChemStation y Programa Microsoft Excel 2010.



6.1.3.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema en CLAR

Los datos obtenidos se evaluaron con un tratamiento estadístico, con las siguientes especificaciones:

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$\bar{x} = 1.547$$

➤ **Desviación estándar (s)**

En la precisión en condiciones de Repetibilidad en función del factor de respuesta se obtuvo una desviación estándar pequeña con un valor de 0.013 indicando la buena precisión del sistema donde demuestra que no se observó una diferencia significativa.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$s = 0.013$$

➤ **Coefficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación (CV), nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media. Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor de unidad de medida (Skoog, 2003).

El coeficiente de variación entre los datos se calcula utilizando la siguiente ecuación 19.

$$CV = \frac{0.013}{1.547} * 100 = 0.840$$



Se aprecia en la tabla 6.1.3.1.1, que el CV % está por debajo de 2 % obteniéndose un valor de 0.840 %, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la vez aceptable.

6.1.3.2 Limite detección (LOD)

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

$$LOD = \frac{3.3 \times 0.013}{1.541} = \frac{0.0429}{1.541} = 0.0278$$

$$LOD = 0.0278 \mu\text{g/mL}$$

6.1.3.3 Límite de cuantificación (LOQ)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

$$LOQ = \frac{10 \times 0.013}{1.541} = 0.0843$$

$$LOQ = 0.0843 \mu\text{g/mL}$$



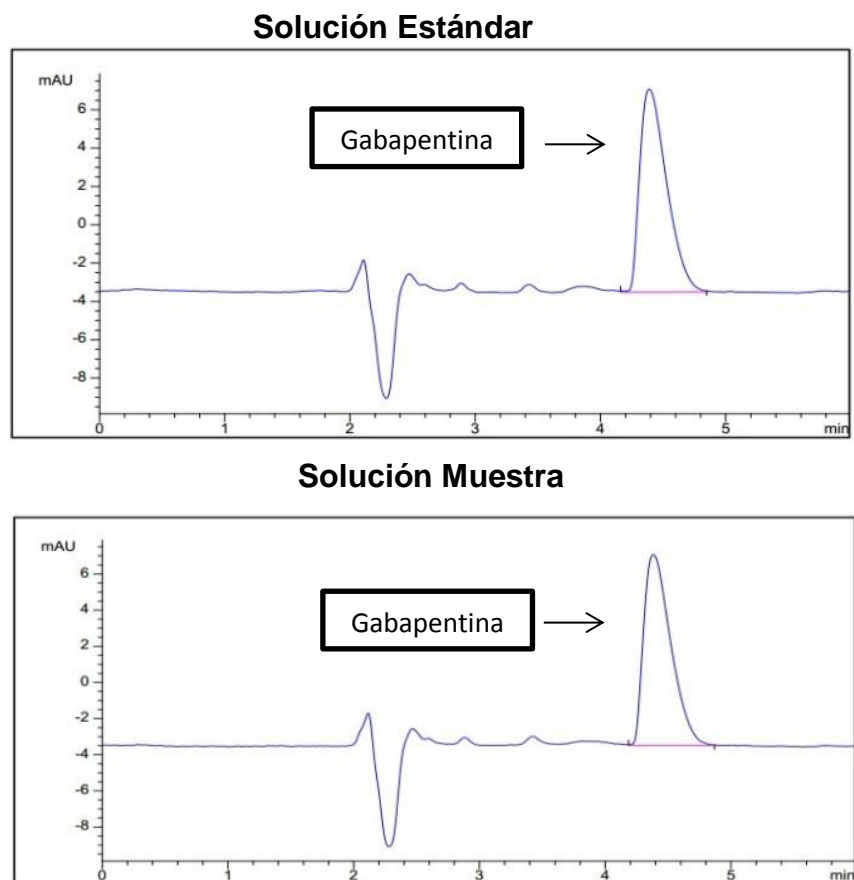
6.1.4 Selectividad (Gabapentina)

El parámetro de selectividad se evaluó con respecto a los excipientes y a los productos generados por la degradación forzada por el activo, los excipientes que forman parte de la matriz se sometieron a degradación forzada por medio de termólisis, hidrólisis en medio ácido y básico, también se sometieron a oxidación con peróxido de hidrogeno.

6.1.4.1 Prueba de identificación del activo

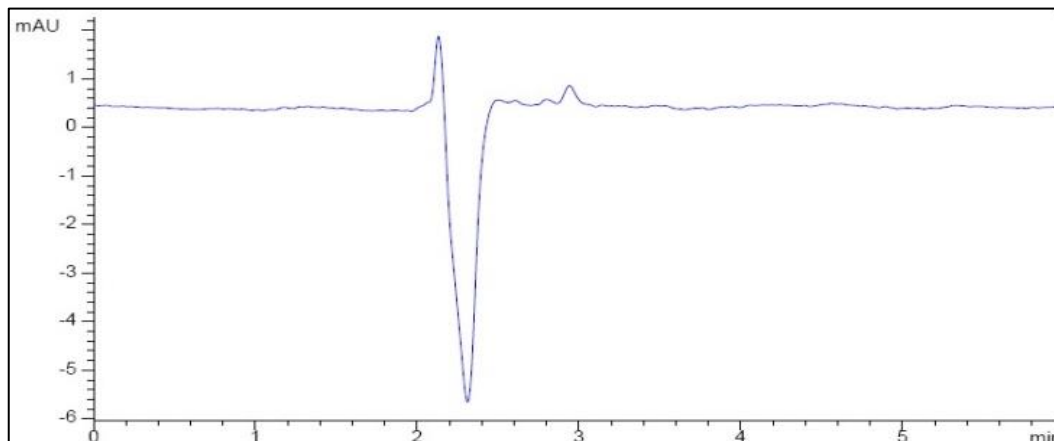
Al analizar por duplicado una solución muestra, una solución placebo y una solución estándar, preparadas todas ellas al 100%, los resultados obtenidos son los siguientes:

Figura 3: Cromatogramas obtenidos de las soluciones para la prueba de identificación del activo.





Solución placebo



Al comparar la señal obtenida de la muestra con la señal obtenida con el estándar a 210 nm se obtienen cromatogramas semejantes, por tanto, se obtiene Identificación positiva.

Al comparar la señal obtenida del placebo con la señal del estándar, no se observa interferencia significativa en la señal del placebo, por lo que la Identificación es negativa y cumple con el ensayo.

6.1.4.2 Pruebas cuantitativas del contenido del activo

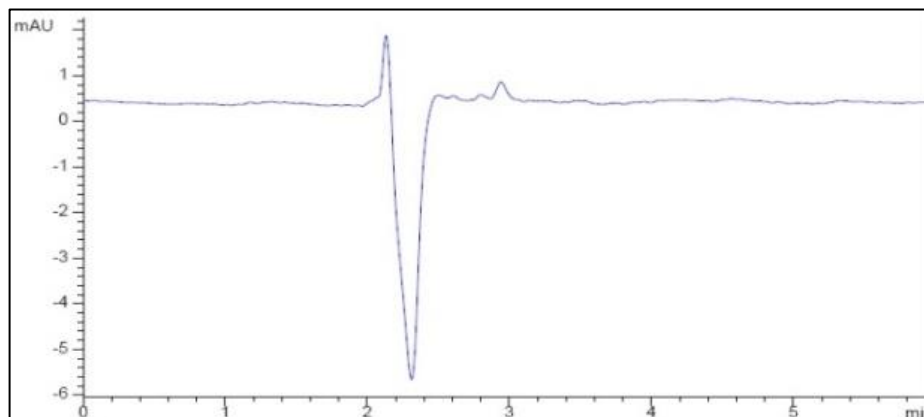
6.1.4.2.1 Selectividad frente a excipientes

Se prepararon 2 soluciones placebo, 2 soluciones placebo cargado y 2 soluciones estándar y se realizaron lecturas por triplicado a 210 nm de cada solución y se compararon las señales obtenidas de la solución placebo y del placebo cargado con respecto al estándar obteniéndose los siguientes resultados:

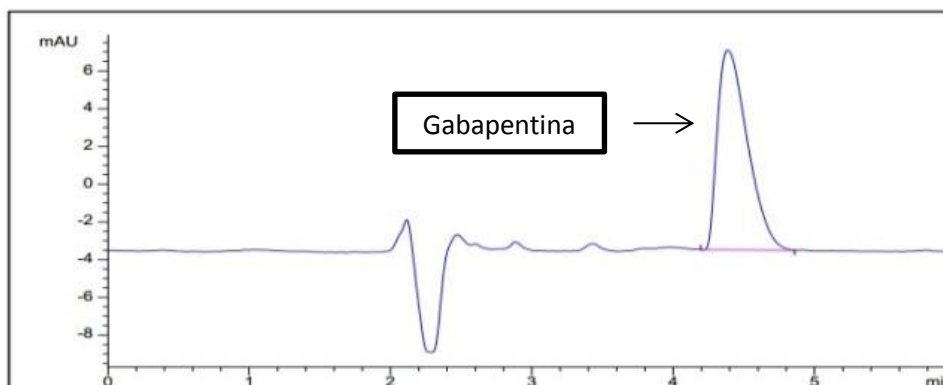


Figura 4: Cromatogramas obtenidos de las soluciones de selectividad frente a excipientes.

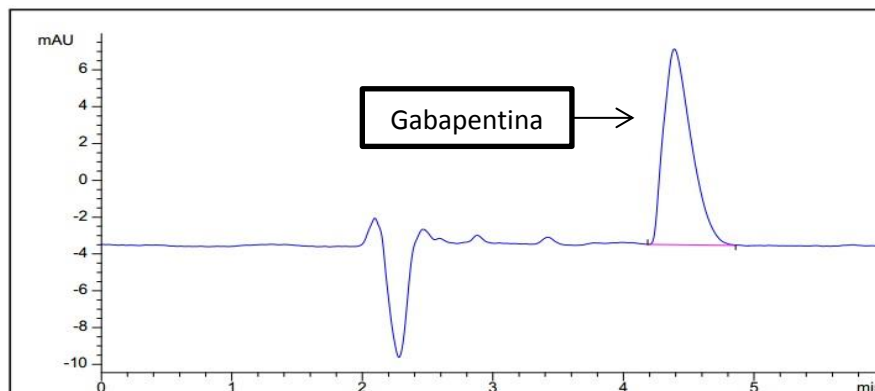
Solución placebo



Solución estándar



Solución placebo cargado





En la comparación de las señales obtenidas de las muestras inyectadas, se observa que no existen interferencias con las diferentes señales, al comparar el placebo cargado con el estándar coincide, demostrando la selectividad frente a excipientes.

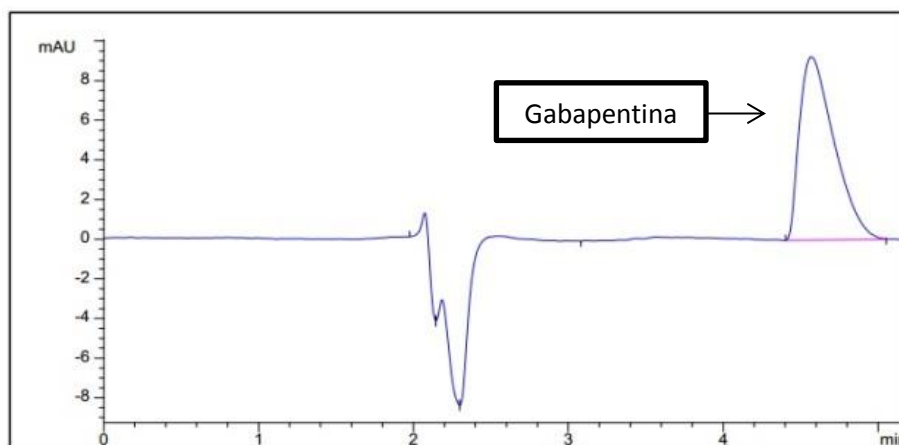
6.1.4.3 Selectividad frente a productos de Degradación.

Las soluciones placebo, muestra y estándar se sometieron a condiciones de estrés, las cuales se analizaron por triplicado a una longitud de onda de 210 nm, los cromatogramas obtenidos se compararon con los resultados de las soluciones placebo, muestra y estándar sin someter a estrés.

6.1.4.3.1 Termólisis

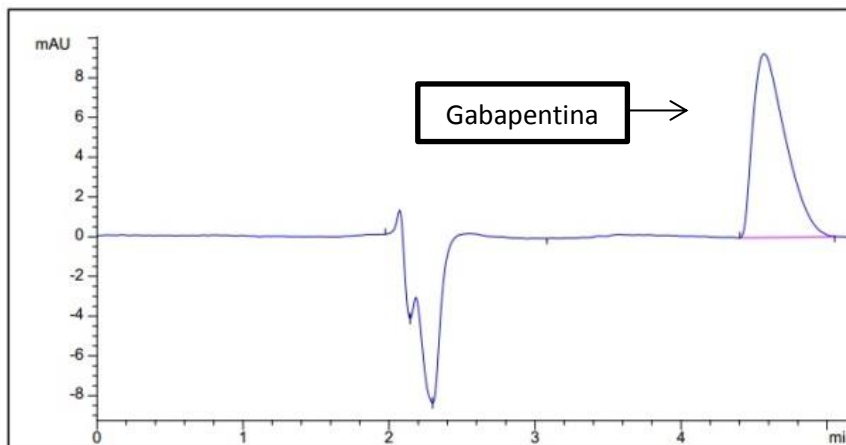
Se prepararon las soluciones estándar, muestra y placebo como se indica en los incisos 5.2.7.1.1, 5.2.7.1.2, 5.2.7.1.3 respectivamente, obteniéndose los siguientes resultados:

**Figura 5: Cromatogramas obtenidos de la soluciones sometida a la Termólisis
Estándar**

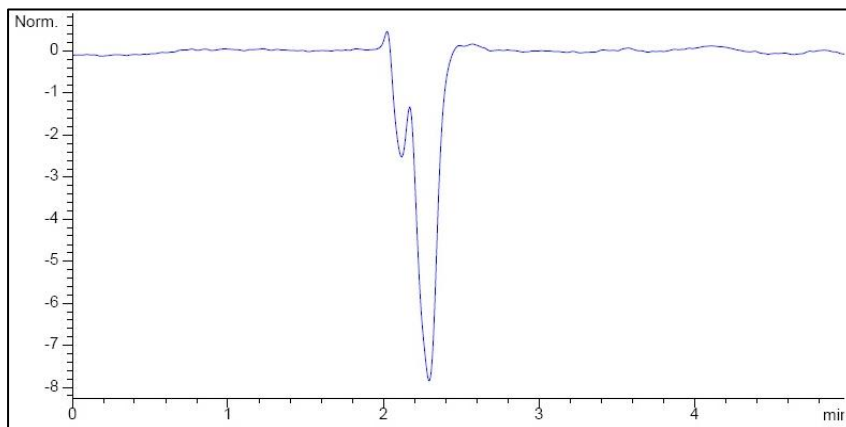




Muestra



Placebo

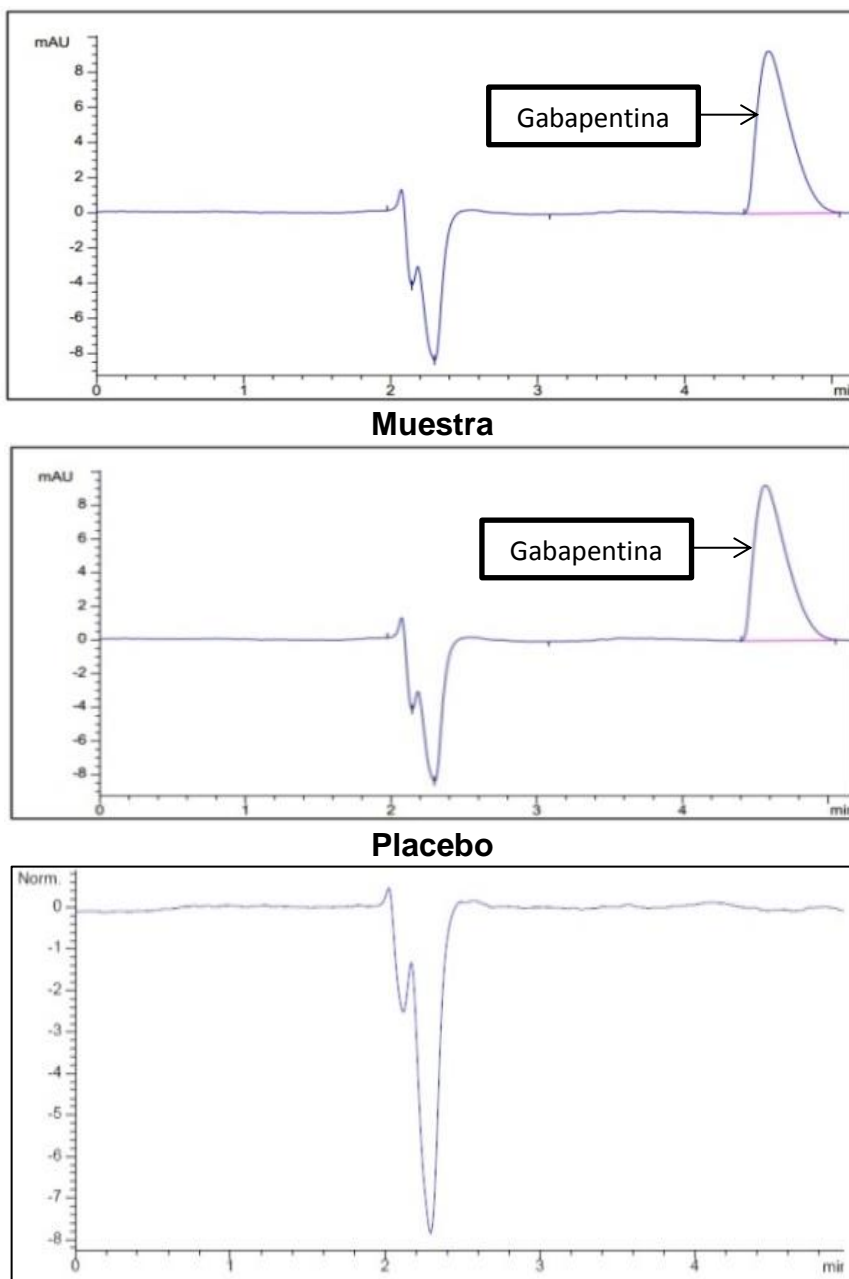




6.1.4.3.2 Oxidación

Se prepararon las soluciones estándar, muestra y placebo como se indica en los incisos 5.2.7.2.1, 5.2.7.2.2, 5.2.7.2.3 respectivamente, obteniéndose los siguientes resultados:

**Figura 6: Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a oxidación
Estándar**

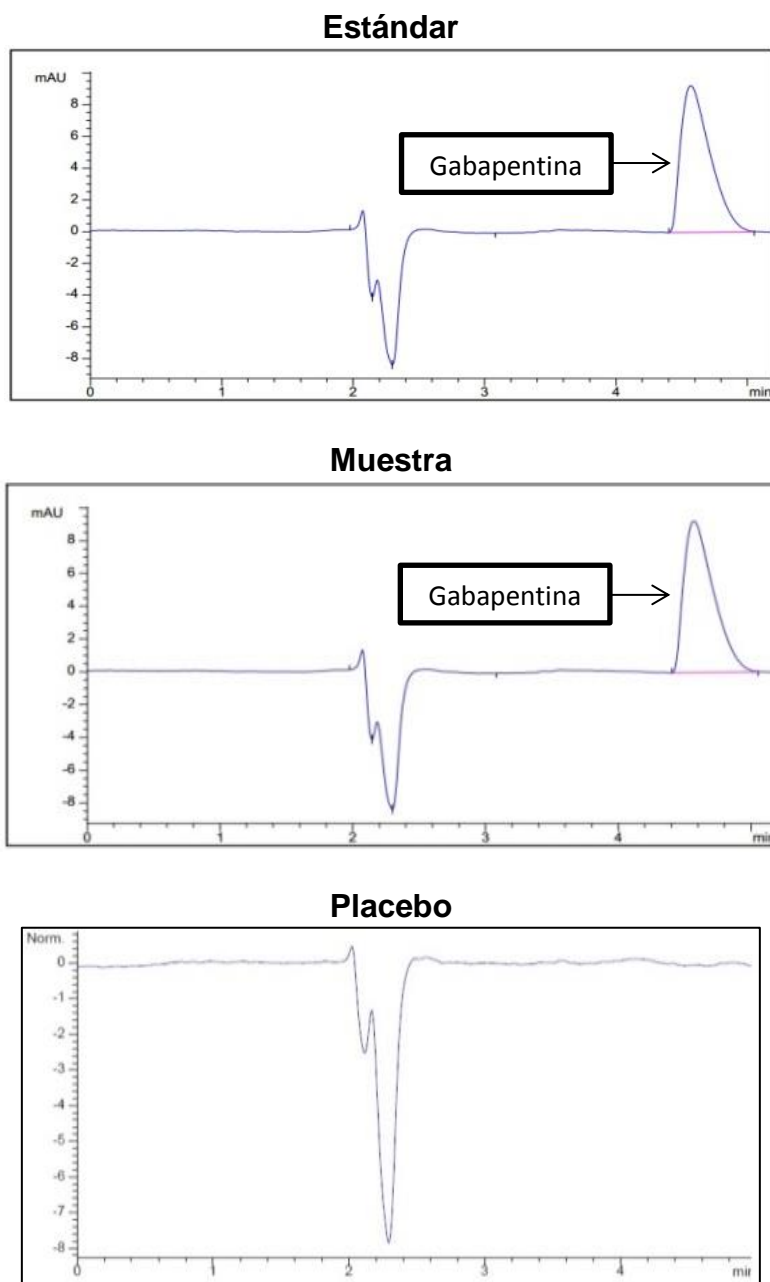




6.1.4.3.3 Hidrólisis Alcalina

Se prepararon las soluciones estándar, muestra y placebo como se indica en los incisos 5.2.7.3.1, 5.2.7.3.2, 5.2.7.3.3 respectivamente, obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 7: Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a hidrólisis alcalina

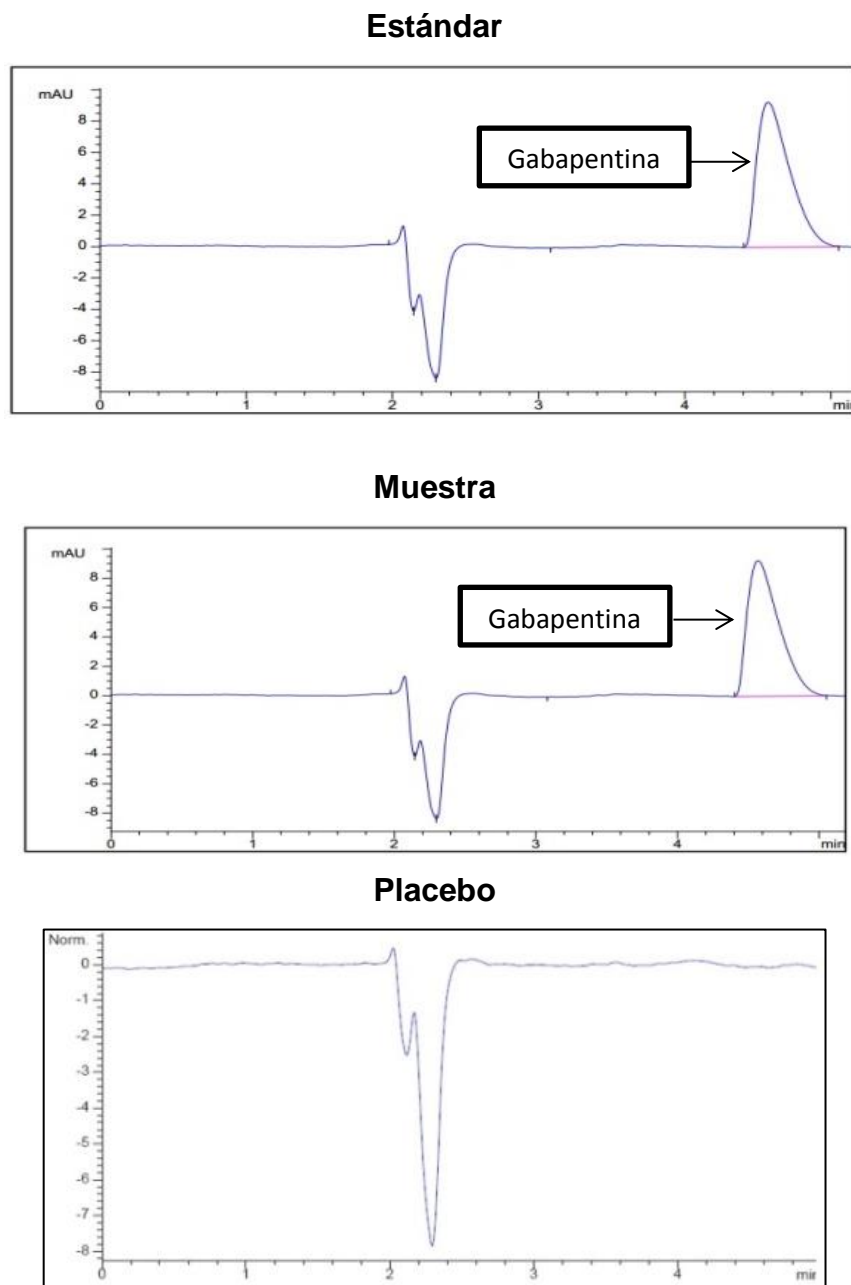




6.1.4.3.4 Hidrólisis ácida

Se prepararon una solución estándar, muestra y placebo como se indica en los incisos 5.2.7.4.1, 5.2.7.4.2, 5.2.7.4.3 respectivamente, obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 8: Cromatogramas obtenidos de las soluciones sometidas a hidrólisis ácida

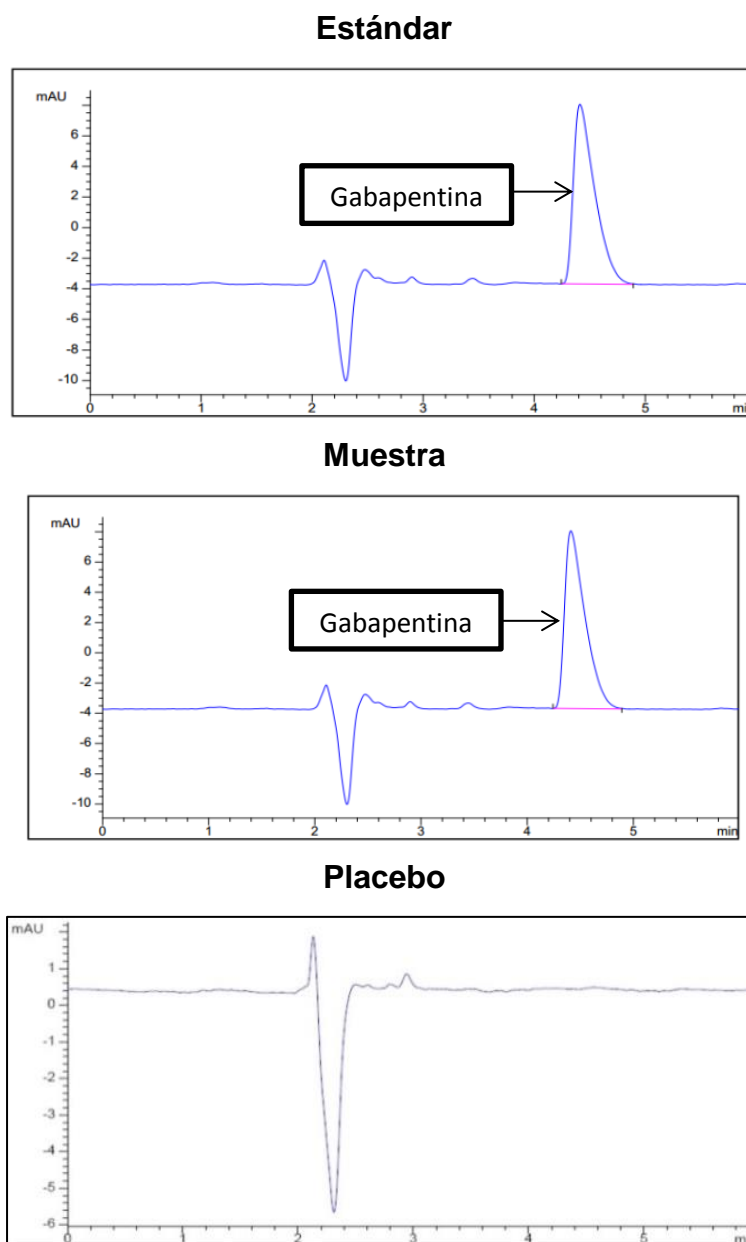




6.1.4.3.5 Sin estrés

Se prepararon una solución, estándar muestra y placebo al 100% como se indica en los incisos 5.2.3.2, 5.2.4.1, 5.2.5 respectivamente se analizaron por triplicado, se compararon los resultados obtenidos del estándar, muestra y placebo obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 9: Cromatogramas obtenidos de las soluciones sin someter a estrés





El método es selectivo frente a productos de degradación en todas las condiciones evaluadas, ya que los productos de degradación no presentan ninguna señal que interfiere con la señal obtenida para el estándar y la muestra.

6.1.5 Exactitud del sistema en CLAR

La exactitud del sistema se verificó a través de la prueba de estándar, mediante el análisis de un estándar secundario certificado, facilitado por Laboratorio Ceguel S.A.

Según las recomendaciones de la ICH (2002), se evaluó la exactitud a 3 concentraciones de trabajo de 80 %, 100 % y 120 % de Placebo Cargado de Gabapentina, los cuales corresponde al punto mínimo, medio y máximo de los valores de la curva de calibración reflejado en la tabla N° 6.1.5.1.

TABLA N° 6.1.5.1
Evaluación de la exactitud del sistema en CLAR

N° Lectura	Conc. (%) Variable x	Área (mAU) Variable y	Factor de repuesta F=Y/X	Promedio de F(Y/X)	Desviación estándar (S) de F(Y/X)	Varianza (s ²) de F(Y/X)
1	80	124.773	1.560	1.564	0.014	0.00019
2		124.269	1.553			
3		126.355	1.579			
4	100	156.260	1.563	1.551	0.017	0.00030
5		155.928	1.559			
6		153.085	1.531			
7	120	186.164	1.551	1.551	0.006	0.00003
8		186.702	1.556			
9		185.316	1.544			
Promedio \bar{x}			1.555	$\Sigma S_i^2 = 0.00052$		
Desviación Estándar (s)			0.013			
C.V _f %			0.853%			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



6.1.5.1.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en CLAR

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$\bar{x} = 1.555$$

➤ **Desviación estándar (s)**

$$S = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$S = 0.013$$

Test de proporcionalidad: G de Cochran

Donde: $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Dónde:

s^2 : máxima: varianza máxima de los grupos

$\sum s_i^2$: sumatoria de la varianza de cada grupo

$$G_{\text{exp}} = \frac{0.0003}{0.0005} = \mathbf{0.600}$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05 \%$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966.



Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple con el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.600 < 0.966$.

6.1.5.2 Exactitud en CLAR

Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de Gabapentina 300 mg, cápsula.

En el inciso 5.2.4.1 se indica cómo se prepararon las muestras para determinar el porcentaje de recuperación en capsulas.

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada cápsula (mg)	300 mg
Peso promedio de las capsulas (mg)	633 mg
Cantidad pesada del polvo homogéneo (mg)	537.386 mg
Cantidad de principio activo (p.a) en la muestra pesada (mg)	25 mg

Para realizar esta tabla se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{Cantidad de p. a en la muestra} = \frac{\text{Cantidad pesada} * \text{Peso promedio de la cápsula}}{\text{Declaración de p. a en la cápsula}}$$

$$\text{Cantidad de p. a en la muestra} = \frac{25 \text{ mg} * 537.386 \text{ mg}}{300 \text{ mg}} = 44.782 \text{ mg}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar} = \frac{\text{cantidad de p. a en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar de p. a} = \frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} * \frac{10 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} * 1000 = 400 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Concentración en } \mu\text{g/mL a inyectar de p. a} = 400 \mu\text{g/mL}$$

$$\mu\text{g/mL encontrado de p. a} = \frac{\text{Àrea de la muestra}}{\text{Àrea del estándar}} * \text{Concentraciòn del estándar}$$



$$\frac{\mu g}{mL} \text{ encontrado de p. a} = \frac{155.500}{155.428} * 400 = 400.185 \mu g/mL$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\mu g/mL \text{ encontrado}}{\mu g/mL \text{ que se inyectaron}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{400.185}{400.000} * 100 = 100.046 \%$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 100.046 % el cual está dentro de los valores orientativos para el formulado farmacéutico del 90.0 % - 110.0 % según la USP 36.



6.1.5.2.1 Exactitud del método de Gabapentina 300 mg, Capsula en CLAR

Tabla N° 6.1.5.2.1.1
Porcentaje de recuperación de Gabapentina Cápsula de 300 mg

Declara principio activo en Cáp/mg	Cantidad pesada mg de polvo (p.a + Excipiente) (mg)	Cantidad pesada principio activo (mg)	Concentración $\mu\text{g/mL}$ a inyectar	Área Estándar	Área Muestra	mg encontrado	% Recuperación
300	44.782	25	400	154.750	155.200	401.163	100.291
300	44.782	25	400	154.750	154.700	399.871	99.968
300	44.782	25	400	154.750	155.900	402.973	100.743
300	44.782	25	400	154.750	154.700	399.871	99.968
300	44.782	25	400	154.750	155.800	402.714	100.679
300	44.782	25	400	154.750	155.500	401.939	100.485
300	44.782	25	400	154.750	155.300	401.422	100.355
300	44.782	25	400	154.750	154.900	400.388	100.097
300	44.782	25	400	154.750	155.200	401.163	100.291
$\bar{X} = 300$	44.782	25	400	154.750	155.244	401.278	100.320

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

**TABLA N° 6.1.5.2.1.1.1****Test G de Cochran en CLAR****Porcentaje de recuperación de Gabapentina 300 mg Capsula.**

Nº Lectura	concentración (µg/mL)	Recuperación %	Promedio de % Recuperación	S	S _i ²
1	400	100.291	100.334	0.390	0.1517
2		99.968			
3		100.743			
4	400	99.968	100.377	0.367	0.1350
5		100.679			
6		100.485			
7	400	100.355	100.248	0.135	0.0181
8		100.097			
9		100.291			
Promedio \bar{x}		100.320	$\sum S_i^2 = 0.3048$		
Desviación estándar(S)		0.282			
CV %		0.281			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad: Test de Cochran

Donde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}xima}}{\sum S_i^2}$$

$$\frac{0.1517}{0.3048} = 0.498$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de respuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.498 < 0.966$.



Test de Student

Para esta prueba se utilizó el criterio que $t_{exp} < t_{tab}$ En la tabla de t de student n-1 grados de libertad y 0.05 grados de significación el de $t_{tab} = 4.303$

Para ello se utilizó la siguiente formula

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{x}| * \sqrt{n}}{CV}$$

Dónde:

X: media del porcentaje de recuperación

CV: coeficiente de variación del porcentaje de recuperación

N: número de muestras 3

$$t_{exp} = \frac{|100.00 - 100.320| * \sqrt{3}}{0.281}$$

$$t_{exp} \frac{0.319 * 1.732}{0.281} = \frac{0.552}{0.281}$$

$$t_{exp} = 1.970$$



6.2 Linealidad del Método (Gabapentina)

Para la determinación de la linealidad se prepararon 5 soluciones muestras a concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, como se indica en el inciso 5.2.4.2. Se realizaron análisis por triplicado de cada solución a una longitud de onda de 210 nm y los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla N° 6.2.1

Evaluación de la Linealidad del Método de Gabapentina 300 mg en CLAR

Concentración (%) X	Area (mAu) Y	Factor de Respuesta F = Y/X	Promedio	Desviación Estándar	Varianza	Varianza MAX	G _{EXP}
80	122.100	1.526	1.5329	1.15E-02	1.33E-04	0.00013	0.3888
80	122.100	1.526					
80	123.700	1.546					
90	137.000	1.522	1.5285	1.09E-02	1.19E-04		
90	137.000	1.522					
90	138.700	1.541					
100	153.700	1.537	1.5313	8.14E-03	6.63E-05		
100	152.200	1.522					
100	153.500	1.535					
110	168.500	1.532	1.5336	1.82E-03	3.31E-06		
110	168.700	1.534					
110	168.900	1.535					
120	184.100	1.534	1.5386	4.59E-03	2.11E-05		
120	185.200	1.543					
120	184.600	1.538					
Variabilidad o Parámetros Estadísticos							
						Pendiente (b)	1.5513
						Intercepto (a)	-1.8000
						Coefficiente de Correlación (r)	0.9995
						Coefficiente de Determinación (r ²)	0.9991

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



En la tabla 6.2.1 se refleja los resultados obtenidos de la linealidad del método, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r^2).

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}} = 0.9995 \quad (\text{Ecuación 5})$$

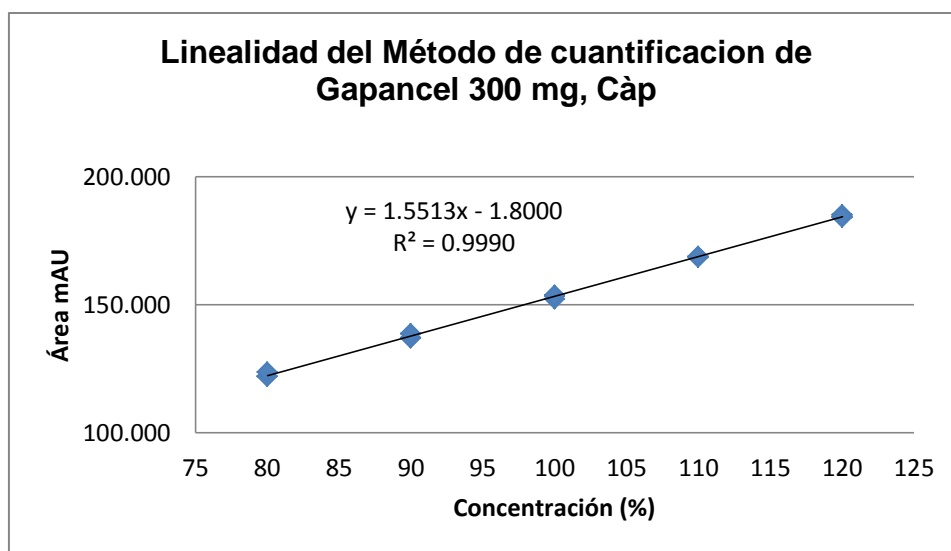
Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = 0.9995^2 = 0.9990 \quad (\text{Ecuación 6})$$

A continuación se presenta el calibrado y la ecuación de la recta, en ella se observa una proporcionalidad entre concentración y respuesta cromatográfica.

GRAFICO N° 6.2.1.1

Linealidad del método de Gabapentina cápsula de 300 mg en CLAR



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series y Programa Microsoft Excel 2010



La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa según $y = 1.5513x + -1.8000$ con $r = 0.9995$ y $r^2 = 0.9990$

6.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad del Metodo CLAR

Se utilizó el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Skoog, 2009)



TABLA N° 6.2.2.1

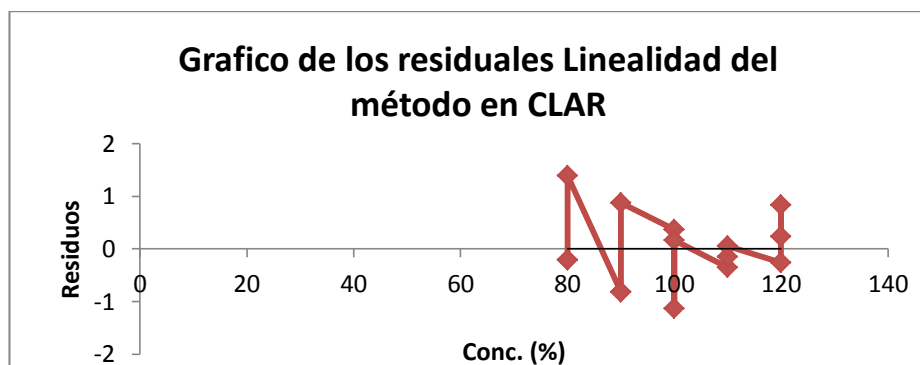
Análisis de mínimos cuadrados en los datos de linealidad del método en CLAR

Conc. (%) Valores x	Área Valores y	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	$\sum x_i^2$	$\hat{Y} = b^* x + a$	$e_i = (\hat{y} - y)$ residuales
80.000	122.100	-20.000	400.000	-31.233	975.521	624.667	6400.000	122.307	-0.327
80.000	122.100	-20.000	400.000	-31.233	975.521	624.667	6400.000	122.307	
80.000	123.700	-20.000	400.000	-29.633	878.134	592.667	6400.000	122.307	
90.000	137.000	-10.000	100.000	-16.333	266.778	163.333	8100.000	137.820	0.253
90.000	137.000	-10.000	100.000	-16.333	266.778	163.333	8100.000	137.820	
90.000	138.700	-10.000	100.000	-14.633	214.134	146.333	8100.000	137.820	
100.000	153.700	0.000	0.000	0.367	0.134	0.000	10000.000	153.333	0.200
100.000	152.200	0.000	0.000	-1.133	1.284	0.000	10000.000	153.333	
100.000	153.500	0.000	0.000	0.167	0.028	0.000	10000.000	153.333	
110.000	168.500	10.000	100.000	15.167	230.028	151.667	12100.000	168.847	0.147
110.000	168.700	10.000	100.000	15.367	236.134	153.667	12100.000	168.847	
110.000	168.900	10.000	100.000	15.567	242.321	155.667	12100.000	168.847	
120.000	184.100	20.000	400.000	30.767	946.588	615.333	14400.000	184.360	-0.273
120.000	185.200	20.000	400.000	31.867	1015.484	637.333	14400.000	184.360	
120.000	184.600	20.000	400.000	31.267	977.604	625.333	14400.000	184.360	
$\Sigma = 1500.000$	2300.000	0.000	$\Sigma = 3000.000$	0,0000	7226.473	4654.000	$\Sigma = 153000.000$		
$\bar{X} = 100.000$	153.333	0.000	200.000	0,0000	481.765	310.267			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



Gráfico 6.2.2.1.1
Análisis de Residuales de la Linealidad del método



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia demostrándose la ausencia de error sistemático, observando el gráfico 6.2.2.1.1 la distribución de los residuos es aleatoria, por tanto, el sistema es válido.

La ecuación utilizada para \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 7})$$

Conviene calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las variables de S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} y de forma siguiente encontrar la pendiente y el intercepto:

- S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.**

$$S_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

x_i = pares de datos individuales de x

\bar{x} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2 = 3000.000$$



2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 7226.473$$

3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} = 4654.000$$

Como se explicó anteriormente, para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$b = \frac{4654.000}{3000.000} = 1.5513$$

Donde:

S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.



S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x

Ecuación del intercepto (a):

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$a = 153.333 - (1.5513 * 100.000) = -1.8000$$

La pendiente es un factor que limita la sensibilidad, siendo el valor de la pendiente de 1.5513 y el sesgo es de -1.8000 indicado por el valor del intercepto.

6.2.3. Test de linealidad: test de Student para la pendiente (b) en CLAR

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp}(b) = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{7226.473 - ((1.5513)^2 * 3000.000)}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{7226.473 - 7219.905}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{6.568}{13}} = \sqrt{0.50523} = 0.7108$$



Desviación estándar de la pendiente (S_b)

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

$$\begin{aligned} \text{Hipótesis} \quad & H_0: \mu_1 = \mu_2 \\ & H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \end{aligned}$$

$$S_b = \sqrt{Sr^2 / S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 15})$$
$$S_b = \sqrt{(0.7108)^2 / 3000.000} = \sqrt{1.6841E - 04} = 0.0130$$

Se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{1.5513}{0.0130} = 119.330$$

Al comparar el valor t_{exp} con el t_{tab} , se demostró que existen diferencias significativas, siendo $t_{exp} 119.330 > t_{tab} 2,160$, comprobando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero.

Intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calculó:

$$\begin{aligned} b \pm t * S_b &= 1.5513 \pm 2.16 * 0.0130 \\ &1.5513 \pm 0.0280 \\ &[1.5233 \text{ a } 1.5793] \end{aligned}$$



6.2.4 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en CLAR

Para esta prueba debe de cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} < t_{tab}$;

Hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$
 $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$|a|$ = valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto

Para encontrar el t_{exp} para el intercepto, es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r), la cual fue calculada en el inciso 6.2.3. Con la ecuación 14, siendo éste un valor de 0.7108 y por ende obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar del intercepto (S_a)

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$S_a = 0.7108 * \sqrt{\frac{1}{15 - \frac{(2250000.000)}{153000.000}}} = 1.3106$$

$$t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{-1.8000}{1.3106} = -1.3734$$



Se cumplió que $t_{exp(a)} < t_{tab}$. Para calcular el t_{tab} de dos cola, para $n-2$ grados de libertad =13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha= 0.05$ ($\alpha/2= t_{0.95, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160, siendo $t_{exp(a)} -1.3734 < t_{tab} 2.160$; se comprueba que la variable x es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calculó:

$$a \pm t * S_a = -1.8000 \pm 2.16 * 1.3106$$
$$-1.8000 \pm 2.8310$$
$$[-4.6310a 1.0310]$$

6.2.5 Test G de Cochran

La prueba de Cochran nos indica, determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas.

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}xima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde:

s^2 : máxima: varianza máxima de los grupos

$\sum s_i^2$: sumatoria de la varianza de cada grupo

El valor crítico de Cochran se determina $C= (K, u, \alpha)$

Donde

K: es el número de grupo de datos o números de réplicas

U: es el número de grado de libertad definido como $n_{max} -1$, donde n_{max} es el mayor de los tamaños de la muestra y α el nivel de significancia usualmente 0.05.

El criterio de aceptación: si el $G_{exp} < G_{tab}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influyen estadísticamente en la variabilidad de los resultados.



Prueba de homogeneidad de varianzas

TABLA N° 6.2.5.1

Test de G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR

N°	Concentración % X	Área (mAu) Y	Factor de respuesta F = Y/X	Promedio F = Y/X	Desviación Estándar F = Y/X	Varianza (S ²) F = Y/X
1	80	122.100	1.526	1.5329	1.15E-02	1.33E-04
	80	122.100	1.526			
	80	123.700	1.546			
2	90	137.000	1.522	1.5285	1.09E-02	1.19E-04
	90	137.000	1.522			
	90	138.700	1.541			
3	100	153.700	1.537	1.5313	8.14E-03	6.63E-05
	100	152.200	1.522			
	100	153.500	1.535			
4	110	168.500	1.532	1.5336	1.82E-03	3.31E-06
	110	168.700	1.534			
	110	168.900	1.535			
5	120	184.100	1.534	1.5386	4.59E-03	2.11E-05
	120	185.200	1.543			
	120	184.600	1.538			
Promedio (\bar{x})		1.533		$\sum S_i^2$ 0.000343		
Desviación Estándar (S)		0.008				

Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 y programa Microsoft Excel 2010

La hipótesis es:

$$H_o = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

$$G_{exp} = \frac{0.000133}{0.000343} = 0.389$$



Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis nula donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}} (\alpha = 0.05, K = 5, n = 3) = 0.683$.

6.2.6 Coeficientes de variación de los factores respuestas

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Donde:

S = desviación estándar

\bar{X} = media de los resultados

Según en la tabla N° 6.2.5.1 test G de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR, la desviación estándar global del factor respuesta es de 0.008 y el promedio global es de 1.533 por tanto:

$$CV = \frac{0.008}{1.533} * 100 = \mathbf{0.522 \%}$$

Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta (C.V._f) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV_f = 0.522 \% < 2 \%$ demostrándose la adecuada linealidad del sistema.



6.2.7 Análisis de varianza en CLAR

Tabla N° 6.2.7.1						
Análisis de varianza en CLAR						
Análisis de Varianza		Análisis de Residual			Análisis de la Regresion	
Concentración (%) X	Área (mAu) Y	$\hat{y} = b * x + a$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
80	122.100	121.314	0.786	0.617	-32.019	1025.221
80	122.100	121.314	0.786	0.617	-32.019	1025.221
80	123.700	121.314	2.386	5.692	-32.019	1025.221
90	137.000	136.828	0.172	0.030	-16.506	272.439
90	137.000	136.828	0.172	0.030	-16.506	272.439
90	138.700	136.828	1.872	3.506	-16.506	272.439
100	153.700	152.341	1.359	1.847	-0.992	0.985
100	152.200	152.341	-0.141	0.020	-0.992	0.985
100	153.500	152.341	1.159	1.343	-0.992	0.985
110	168.500	167.854	0.646	0.417	14.521	210.858
110	168.700	167.854	0.846	0.715	14.521	210.858
110	168.900	167.854	1.046	1.094	14.521	210.858
120	184.100	183.368	0.732	0.536	30.034	902.057
120	185.200	183.368	1.832	3.358	30.034	902.057
120	184.600	183.368	1.232	1.519	30.034	902.057
$\bar{X} = 100.000$	153.333	152.341	SC_{RES} = 21.341		SC_{REG} =	7234.678
	$\Sigma = 2300.000$					

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente:

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 7})$$

Se calculó la varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

Varianza de Residual

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \quad (\text{ecuacion 20})$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{21.341}{13} = 1.642$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = 1.642$$

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SC_T = 21.341 + 7234.6782 = 7256.019$$

$$SC_T = 7256.019$$

Varianza de Regresión

$$S^2_{y^*} = \sum \frac{(y_i^* - \bar{Y})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{7234.678}{15} = 482.312$$

Una vez realizados los cálculos de las varianzas y de los residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), donde se cumple el criterio que $F_{exp} > F_{tab}$.

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad (\text{Ecuación 23})$$

La hipótesis es:

$$H_0 = F_{exp} > F_{tab}$$

$$H_1 = F_{exp} < F_{tab}$$



Dónde:

SC_{REG}: suma de cuadrados de la regresión

V_{RES}: 1.642

V_{REG}: 482.312, para un grado de libertad

$$F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} = \frac{482.312}{1.642} = 293.734$$

Por lo tanto Fisher será: $293.734 > F_{tab}(0.05, 1, n-2) = 4.667$ cumpliendo el criterio de aceptación, demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.

Se validó la linealidad de la metodología del Método, para lo cual se partió de una solución muestra al 100% de gabapentina (Gapancel 300 mg Cápsula), con 5 niveles de concentración del analito en el rango de trabajo de 80 % a 120 % de concentración teórica.

La evaluación de los coeficientes de determinación r^2 y de correlación r , en el sistema demostraron correlación entre la concentración (%) y la respuesta (área) y que los cambios en la respuesta (variable dependiente) son debidos a variación en la concentración (variable independiente) (AEFI, 2001).

Se aplicaron diferentes test estadísticos para demostrar la linealidad del método, como: el ajuste de la curva de calibración por mínimos cuadrados, obteniéndose los valores de la pendiente y el intercepto con sus respectivas desviaciones estándares, aplicándose el t de Student para demostrar que existe diferencia significativas.



Con la aplicación del test de Cochran se demostró la homogeneidad de varianza. Se realizó el análisis de varianza de la regresión ANOVA, se evaluaron los residuos y se determinó que estos son independientes y tienen distribución normal, presentado homocedasticidad y que la relación entre concentración y área es lineal. Ver anexo 5 (gráfica de residuales), también se aplicó el test estadístico F de Fisher para verificar la linealidad. Bajo la evidencia muestral y con un nivel de confianza del 95%, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de los niveles estudiados, obteniendo un valor f de Fisher experimental mayor que el valor de f tabulado, indicando regresión.

6.2.8 Repetibilidad del Método en CLAR

La Repetibilidad se analizó mediante la evaluación de 10 determinaciones, se trabajó con la concentración media de trabajo de 100 %; se determinaron los valores medios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación en función al factor de respuesta.

**TABLA N°6.2.8.1****Evaluación de Repetibilidad del método en CLAR**

Número de lecturas	Concentración (%) Variable X	Área (mAU) Variable y	Factor Respuesta f(y/x)	Datos de Factor Respuesta f(y/x)		T _r	N
				Media	Desviación estándar (s)		
1	100	155.200	1.552	1.552	0.004	4.518	2041.000
2	100	154.700	1.547			4.527	2071.000
3	100	155.900	1.559			4.486	2143.000
4	100	154.700	1.547			4.528	2183.000
5	100	155.800	1.558			4.530	2185.000
6	100	155.500	1.555			4.538	2147.000
7	100	155.300	1.553			4.490	2241.000
8	100	154.900	1.549			4.550	2252.000
9	100	155.100	1.551			4.559	2213.000
10	100	155.200	1.552			4.554	2208.000
Coefficiente de Variación CV, %			0.267 %	Cumple			
Criterio de aceptación CV (%) ≤ 2%			Conclusión				

Fuente: Software ChemStation 1100 series y Programa Microsoft Excel 2010.



6.2.8.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del método en CLAR

Los datos obtenidos se evaluaron con un tratamiento estadísticos con las siguientes especificaciones:

➤ **Media**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$\bar{x} = 1.552$$

➤ **Desviación estándar (s)**

En la precisión en condiciones de Repetibilidad en función del factor de respuesta se obtuvo una desviación estándar pequeña con un valor de 0.004 indicando la buena precisión del sistema donde demuestra que no se observó una diferencia significativa.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$s = 0.004$$

➤ **Coefficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación entre los datos se calcula utilizando la ecuación 19.

$$CV = \frac{0.004}{1.552} * 100 = 0.267 \%$$

Se aprecia en la tabla 6.2.8.1, que el CV % está por debajo de 2 % obteniéndose un valor de 0.267 %, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la vez aceptable.



6.2.9 Precisión Intermedia del método en CLAR

El estudio de precisión intermedia se realizó para evaluar las fuentes de variación en el análisis inter analistas e inter día, se trabajó con concentraciones al 100% (400 µg/mL) los dos días.

Se aplicó el estadístico de *t* de Student y la prueba de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados analíticos obtenidos por ambos analistas.

Los datos obtenidos están representados en función del factor de respuesta para determinar si el factor de concentración influye en la variabilidad de los resultados. Las respuestas obtenidas de la precisión intermedia de cada analista y en días diferentes están reflejadas en el anexo 10 y 11.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N°6.2.9.1
Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR

Conc. 100 %	ANALISTA: A		ANALISTA: B		Fórmula
	1er Día	2do Día	1er Día	2do Día	
	Factor de Respuesta		Factor de Respuesta		
100	1.536	1.551	1.520	1.534	Coeficiente de variación $CV \% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$
100	1.524	1.532	1.539	1.537	
100	1.534	1.545	1.534	1.529	
100	1.535	1.554	1.527	1.530	
100	1.558	1.535	1.509	1.536	
100	1.551	1.559	1.529	1.532	
100	1.540	1.532	1.542	1.545	
100	1.558	1.536	1.526	1.552	
100	1.531	1.533	1.530	1.549	
Media	1.541	1.542	1.528	1.538	
S	0.012	0.011	0.010	0.008	
CV (%)	0.787	0.684	0.649	0.548	
CV _{global}		0.667			
Criterio de aceptación		CV _{global} (%) ≤ 2%		Conclusión	Cumple

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



En la tabla N° 6.2.9.1, se aprecia que los coeficientes de variación experimentales en los dos analistas y en diferentes días están por debajo del 2%, cumpliendo el criterio de aceptación ($CV \leq 2\%$) según lo establecido por la USP 36 y según RTCA 11:03:39:06.

TABLA N° 6.2.9.1.1

Evaluación estadística para la precisión intermedia en CLAR

Análisis de Varianza 100 %						
Resumen						
Grupos	cuenta	suma	promedio	Varianza		
Analista1	2	3.083	1.542	5.00E-07		
Analista2	2	3.066	1.533	5.00E-05		
Día1	2	3.069	1.535	8.45E-05		
Día2	2	3.080	1.540	8.00E-06		
Origen de la variación	ΣSC	Grados de libertad	Promedio ΣSC	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	4.7525	1	4.7525	0.5023	0.310	161.447
Días	4.7094	1	4.7094	0.4977	0.437	161.447
Error	-4.4618	1	-9.4618			
total	0.0001	3				

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Se realizó un análisis de varianza de los datos aplicándose el test Fisher. Los valores obtenidos demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0.05 % ya que el valor de F_{exp} es menor que F_{tab} . (Inter analista $F_{exp} = 0.5023 < F_{tab} = 161.4476$; inter día $F_{exp} = 0.4977 < F_{tab} = 161.4476$).



TABLA N°6.2.9.2

Precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR

t estadígrafo Student

Analista: A		Analista: B	Analista: A vs. B		fórmula
			1er día	2do día	
t _{exp}	0.592	0.364	0.330	0.613	$t_{exp} = \frac{\bar{x}}{(s\sqrt{n})}$
t _{tab}	2.306	2.306	2.306	2.306	
T _{exp} < t _{tab} . No existe diferencias significativas					

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Al realizar la prueba de Student para ambos analistas, el valor experimental resultó ser menor que el tabulado, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un 5 %.

6.2.10 Robustez

Se realizó el estudio de Robustez del método para evaluar la capacidad del mismo para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones, como cambio de flujo, longitud de onda y proporción de la fase móvil.

Se prepararon soluciones de la muestra al 100% y se realizaron lecturas por triplicado en las condiciones reflejadas en la tabla 6.2.10.1. determinando el porcentaje promedio recuperado, el coeficiente de variación, el factor de capacidad, número de Platos teóricos, el factor de coleo, la diferencia absoluta para cada cambio en el solvente y longitud de onda. Los datos representados en la tabla demuestran que el método es robusto en todos los cambios realizados.

**TABLA N° 6.2.10.1****Evaluación de la Robustez en CLAR**

Condiciones	Réplica	N	Factor de cola(T)	Factor de capacidad(K')	Área	Promedio área	Desviación estándar	Coefficiente de variación	% Recuperación
Control Flujo 1.0 mL/min 210 nm	1	2230	0.449	1.968	155.500	154.767	1.358	0.877	100.485
	2	2232	0.449	1.955	155.600				100.549
	3	2234	0.449	1.968	153.200				98.998
Cambio de longitud de onda de 210 a 207 nm	1	2213	0.441	1.964	153.900	154.733	0.723	0.468	99.451
	2	2215	0.434	1.961	155.200				100.291
	3	2225	0.448	1.963	155.100				100.226
Cambio de longitud de onda de 210 a 213 nm	1	2218	0.483	1.971	155.400	155.333	1.201	0.773	100.420
	2	2292	0.439	1.973	156.500				101.131
	3	2243	0.455	1.914	154.100				99.580
Cambio de flujo de 1.0 mL/min a 0.9 mL/min	1	2395	0.437	1.935	156.800	156.567	0.493	0.315	101.325
	2	2353	0.432	1.953	156.900				101.389
	3	2352	0.442	1.933	156.000				100.808
Cambio de flujo de 1.0mL/min a 1.1 mL/min	1	2231	0.485	1.938	152.700	153.067	0.404	0.264	98.675
	2	2229	0.479	1.920	153.000				98.869
	3	2228	0.475	1.930	153.500				99.192
Fase móvil 50:50 Buffer / Metanol	1	2295	0.432	1.922	151.900	151.933	0.153	0.101	98.158
	2	2217	0.437	1.932	151.800				98.094
	3	2214	0.438	1.930	152.100				98.288
Promedio (\bar{x})								0.466	99.774

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



El método es robusto en todos los cambios realizados, ya que el porcentaje promedio recuperado está entre 90.0% - 110.0%, el coeficiente de variación es menor del 3.00 % y la diferencia absoluta entre los resultados de la condición control y la condición de variación es $0.466 < 3.00\%$.

6.2.11 Estabilidad de la solución analítica (gabapentina)

Este ensayo se llevó a cabo preparando las soluciones como se indica en el inciso 5.2.6, se determinó el factor I y se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 6.2.11.1

Porcentaje recuperado en la cuantificación de soluciones muestras

CONDICIÓN	Réplica	Inicial	2hrs	4 hrs	6 hrs	8 hrs
Temperatura ambiente	1	99.64	98.55	99.52	99.32	99.84
	2	100.36	99.26	99.06	98.68	98.55
	3	98.61	99.06	100.42	99.71	99.19
Refrigeración	1	100.68	99.00	98.42	98.93	100.03
	2	100.10	98.87	99.71	99.26	100.94
	3	99.19	99.52	99.58	99.58	98.93
Protegido de la luz	1	100.23	99.71	98.48	98.93	100.03
	2	100.16	100.87	99.39	99.97	98.93
	3	100.87	98.55	98.74	100.10	98.74

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



TABLA N° 6.2.11.2

Valor de i para cada condición/tiempo

CONDICIÓN	2hrs	4 hrs	6 hrs	8 hrs
Temperatura ambiente	98.90	99.87	99.68	100.19
	98.91	98.71	98.33	98.20
	100.46	101.83	101.11	100.59
Refrigeración	98.33	97.75	98.27	99.36
	98.77	99.61	99.16	100.84
	100.33	100.39	100.39	99.74
Protegido de la luz	99.48	98.26	98.71	99.81
	100.71	99.23	99.81	98.77
	98.45	97.89	99.23	97.89

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Ejemplo de la fórmula utilizada para determinar el valor de i:

Valor de i para la condición de Temperatura ambiente después de 2 horas de preparada la muestra: $i = S/T \cdot 100$

$$i = 98.55/99.64 \cdot 100 = \mathbf{98.90}$$

TABLA N° 6.2.11.3

Valor del factor I

CONDICIÓN	2hrs	4 hrs	6 hrs	8 hrs
Temperatura ambiente	99.42	100.12	99.69	99.65
Refrigeración	99.14	99.24	99.50	100.26
Protegido de la luz	99.54	98.45	99.42	100.13

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

La solución muestra es estable en las tres condiciones de almacenamiento durante el tiempo evaluado (8 horas) ya que el valor de la media para el factor I se encuentra dentro del rango de aceptación 90.00% -110.00%.



6.2.12 Test de Disolución

Se realizó el test de Disolución según el inciso 5.7 para comprobar la cantidad de fármaco que se libera por unidad de tiempo y evaluar la calidad del producto. Una vez concluido el tiempo programado para tomar las muestras de las seis estaciones, se realizaron lecturas por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 6.2.12.1
Evaluación del test de Disolución de Gabapentina Cápsula de 300 mg.

Estaciones	% Concentración	Área muestra	Área estándar	% Recuperado
Vaso 1	100	128.600	127.95	100.51
Vaso 1	100	128.900	127.95	100.75
Vaso 1	100	128.300	127.95	100.28
Vaso 2	100	130.000	127.95	101.60
Vaso 2	100	130.800	127.95	102.23
Vaso 2	100	129.200	127.95	100.98
Vaso 3	100	129.600	127.95	101.29
Vaso 3	100	127.500	127.95	99.65
Vaso 3	100	128.400	127.95	100.35
Vaso 4	100	130.600	127.95	102.07
Vaso 4	100	128.500	127.95	100.43
Vaso 4	100	129.500	127.95	101.21
Vaso 5	100	128.600	127.95	100.51
Vaso 5	100	128.700	127.95	100.59
Vaso 5	100	128.600	127.95	100.51
Vaso 6	100	129.000	127.95	100.82
Vaso 6	100	128.700	127.95	100.59
Vaso 6	100	129.300	127.95	101.06
PROMEDIO				100.86
D.ESTANDAR				0.644
C.V (%)				0.638

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

El test de disolución cumple con el criterio de aceptación, siendo el valor obtenido de $Q = 100.86\%$ ($Q > 80\%$) y un coeficiente de variación de $0.638 (\leq 5.000\%)$.



TABLA N° 6.3

RESUMEN DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN EN CLAR			
Principio Activo: Gabapentina	Tipo de Validación	Resultados	
Ensayos	Prospectiva	Validación	
	Especificaciones	Sistema	Método
1. Especificidad			
- Interferencia de excipientes	No debe presentar interferencia de excipientes	Cumple	Cumple
- Coeficiente de variación C V	CV ≤ 2%		
- Número de platos teóricos N	> 2000		
- Factor de cola	≤ 2 %		
2. Linealidad			
- Coeficiente de variación C V	CV ≤ 2%	Cumple	Cumple
- Coeficiente de correlación r	≥ 0.99		
- Coeficiente de determinación r ²	≥ 0.98		
- Intercepto (a)	1.466		
- Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero		
- Test de t para evaluar la significación estadística de desviación estándar del intercepto	t _{exp} < t _{tab} (t _{tab} =2.16)		
- Valor de la pendiente (b)	1.5414		
- Intervalo de confianza de la pendiente	Aproximadamente a 1		
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero		
- Test de Cochran	t _{exp} > t _{tab} (t _{tab} = 2.16)		
	G _{exp} < G _{tab} (G _{tab} = 0.683)		
- Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.		
3. Precisión			
- Repetibilidad	CV ≤ 2 %	Cumple	Cumple
4. Exactitud			
- % Recuperado promedio	90.0 % - 110.0 %	Cumple	Cumple
- Test de Cochran	G _{exp} < G _{tab} (G _{tab} = 0.966)		
- Test de Student	t _{exp} < t _{tab} (t _{tab} = 4.303)		

Apartado VII:
CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

Se ha demostrado la validez de la Metodología Analítica para la Cuantificación de Gabapentina Cápsula de 300 mg (Gapancel), verificándose los parámetros de aceptabilidad planteados por la USP – 36, y RTCA 11:03:39:06, los resultados obtenidos corresponden a los objetivos inicialmente planteados.

1. Se comprobó la idoneidad del Método Analítico, siendo idóneo y específico detectando el analito Gabapentina de manera inequívoca sin interferencias, por la técnica Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), cumpliendo con los criterios de aceptación teniendo como resultado un CV $\leq 2\%$, el Factor de Cola $< 2\%$, Numero de Platos Teóricos $> 2,000$.
2. La técnica analítica validada para la Cuantificación de la Gabapentina demostró ser lineal, precisa, exacta específica y robusta en el rango de aceptaciones estudiadas, por lo cual puede ser utilizado para control de calidad de dicho producto.
3. El test de Disolución cumple con los criterios establecidos, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 100.86 %, con un coeficiente de variación de 0.638 %, proporcionando resultados que comprueban que el producto es confiable para el consumo humano.

Apartado VIII:
RECOMENDACIONES



8. RECOMENDACIONES

Se recomienda a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – Managua, incorporar dentro del programa de la asignatura de Control de calidad de medicamentos la utilización e importancia de los protocolos y directrices de validación de métodos e incertidumbres, principalmente por parte de AOAC INTERNATIONAL, la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), en documentos del Eurachem, RCTA y Farmacopeas.

Solicitar a organizaciones nacionales e internacionales que tienen convenios con la universidad, gestiones para la adquisición de equipos de laboratorio y reactivos necesarios para que los estudiantes de la carrera Química Farmacéutica puedan desarrollar estudios experimentales y por ende adquirir las destrezas y habilidades ineludibles para laborar en la industria farmacéutica.

Enviar una copia de la tesis a la jefatura del departamento de la dirección General de Servicio de Salud y a la Revista Universidad y Ciencia de la UNAN-Managua para brindar información accesible de consultas sobre el tema, debido que Laboratorio CEGUEL S.A es el primer laboratorio nacional en fabricar Gabapentina cápsula de 300 mg.

Apartado IX:
BIBLIOGRAFIA



9 BIBLIOGRAFÍA

- 1 AEFI. (2001). Validación de Metodos Analíticos. *Asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI 2001)*.
- 2 Agilent Technologies. (2014). Guia para la seleccion de Columnas Agilet ZORBAX para HPLC. *Guia para la seleccion de Columnas Agilet ZORBAX para HPLC* (pág. 12).
- 3 CEGUEL, Laboratorio. (2007). *Guía para la validación de documentos analíticos, < AC - 017> Departamento de Validación*. Granada.
- 4 Galichet, L. (2003) (3^{ra} Edición) *Clarke´s Analysis of Drugs and Poisons*. (Pág. 332 - 339)
- 5 ICH. (2002). *Validación de Metodos Analíticos, Buenas Practicas para Laboratorios Nacionales de Control Farmaceutico*.
- 6 Informe 32 OMS Anexo 5. (2006). *Validacion de Procedimientos Analíticos empleados en el examen de los materiales farmaceuticos*.
- 7 RTCA 11.01.04:05. *Productos Farmaceuticos, Estudio de Estabilidad de Medicamentos para uso humano*.
- 8 Skoog. (2003). Evaluación Estadística de Datos. *Fundamentos de Química Analítica* (pág. 37 - 60). Barcelona: Editorial Reverté S.A
- 9 Trejos, D.E. (2011). *Principios Basicos de Cromatografía*. 1 - 14.
- 10 Union Aduanera. (2004). *Guia de Validacion de Metodos Analíticos*. Guatemala.
- 11 USP 36 <621>. (2013). Cromatografía. *Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional USP36 NF-31* (pág. 290 - 296).
- 12 USP 36 <1225>. (2013). Validcion de Procedimientos Farmaceuticos. *Farmacopea de los Estados Unidos de America* (pág. 1095).
- 13 USP 36 NF 31. (711). Disolucion. *Farmacopea de los Estado Unidos de America* (pág. 332 - 339).
- 14 Velázquez, L. et. (2008). Fármacos anticonvulsivantes y antiepilépticos. *Farmacología Básica y Clínica* (pág. 255 - 256). Panamericana.



Online

- 1 Agilent. (2009-2010). *Catálogo de instrumentos y accesorios de Agilent Technologies*. Obtenido de:
<http://www.chem.agilent.com/Library/catalogs/Public/5990-3699ES.pdf>
- 2 Anónimo (2014). Las pruebas oficiales de disolución. Obtenido de:
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmac_euticas/arancibiaa02/02a.html
- 3 FDA (2010). Guía para la industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata:
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>



GLOSARIO

Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Autoridad reguladora: Ente responsable de Registro Sanitario y/o vigilancia Sanitaria de cada Estado Parte.

Diplopía: Es una enfermedad en la que las imágenes que perciben el ojo izquierdo y el derecho no se procesan en el cerebro formando una única imagen espacial. La consecuencia es la visión doble.

Dolor neuropático: Es un trastorno neurológico en el que las personas experimentan dolor crónico intenso debido a un nervio dañado.

Especificaciones: Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Especificidad o selectividad: Capacidad de evaluar, medir e identificar simultáneamente o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes y otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.

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

Gradiente: El gradiente es una operación vectorial que opera sobre una función escalar, para producir un vector cuya magnitud es la máxima razón de cambio de la función en el punto del gradiente.



Homocedasticidad: Multivariable estadística que considera la varianza de la variable error constante. La Homocedasticidad es que la varianza de los residuos es constante y no varía en los diferentes niveles del factor.

Impurezas: Sustancias ajenas a la fórmula cuali-cuantitativa que pueden provenir de los procesos de fabricación y de almacenamiento, incluyendo la degradación de las materias primas (principios activos y productos farmacéuticos auxiliares) y formas de dosificación.

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

Límite de cuantificación: Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable.

Límite de detección: Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

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

Lote piloto: Lote producido para fines experimentales, generalmente de menor tamaño que el lote de producción. Un lote piloto puede elaborarse para destinarlo a estudios de estabilidad, estudios de formulación, estudios clínicos.

Matriz: Está conformado por el principio activo y los excipientes que dependerá del preparado farmacéutico.



Método Analítico: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.

Mioclónia: Se considera un espasmo muscular involuntario, como un relámpago abrupto instantáneo, no asociado a pérdida de conciencia y cuyo origen, por definición, se encuentra en el sistema nervioso central.

Monoterapia: Tratamiento con un solo medicamento. Terapia única.

Muestra: Porción del material a evaluar.

Neuralgia postherpética: Se define como dolor en el curso de un trayecto nervioso que persiste, es una de las complicaciones más temidas del herpes Zóster ya que puede causar dolores invalidantes.

Nistagmo: Es el movimiento involuntario de los ojos, por lo general los movimientos rítmicos oscilatorios de los ojos se llaman nistagmos, el movimiento de vaivén es generalmente involuntario.

Parámetros de desempeño analítico, parámetros de mérito o elementos requeridos para el ensayo de validación: Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.

Placebo analítico: Muestra que contiene todo los componentes de un producto a excepción del analito.



Precisión Intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Precisión: Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Procedimiento analítico: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Solución patrón secundario: El patrón secundario es llamado también disolución valorante o estándar secundario. Su nombre se debe a que en la mayoría de los casos se necesita del patrón primario para conocer su concentración exacta.

Sui generis: es una locución adverbial procedente del latín que significa de su propio género o especie, y que se usa en castellano para denotar que aquello a lo que se aplica es de un género o especie muy singular y excepcional.

Validación de un procedimiento analítico: Procedimientos para establecer pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuados para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.



Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Validación: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.



ABREVIATURAS

%: Porcentaje o recobro

\bar{x} : Media aritmética de x

\bar{y} : Media aritmética de y

\hat{y} : y ponderada

a: Intercepto

AOAC: Asociación de Comunidades Analíticas

b: Pendiente

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

COMEICO: Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica

CV: Coeficiente de variación o desviación estándar relativa

CV_{y/x}: Coeficiente de variación de regresión

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

IC: Intervalos de confianza

ICH: Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano.

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

mg: Miligramos

MINSA: Ministerio de Salud

mL: Mililitro

N: Numero de platos teóricos en una columna cromatográfica

nm: Nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

p.a: Principio activo

ppm: Parte por millón

r: Coeficiente de correlación

R: Resolución



r^2 : Coeficiente de determinación

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

S: Desviación estándar

S²: Varianza

SCT: Suma de cuadrados total

SCE: Suma de cuadrados residual

SCREG: Suma de cuadrados de la regresión

SDR: Desviación estándar relativa

UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

USP: Farmacopea de los Estados Unidos de América

UV/VIS: Ultra violeta visible

UV: Ultra violeta

µg/mL: Microgramo por mililitro

µg: Microgramo

T_r: Tiempo de retención

T: Factor de cola

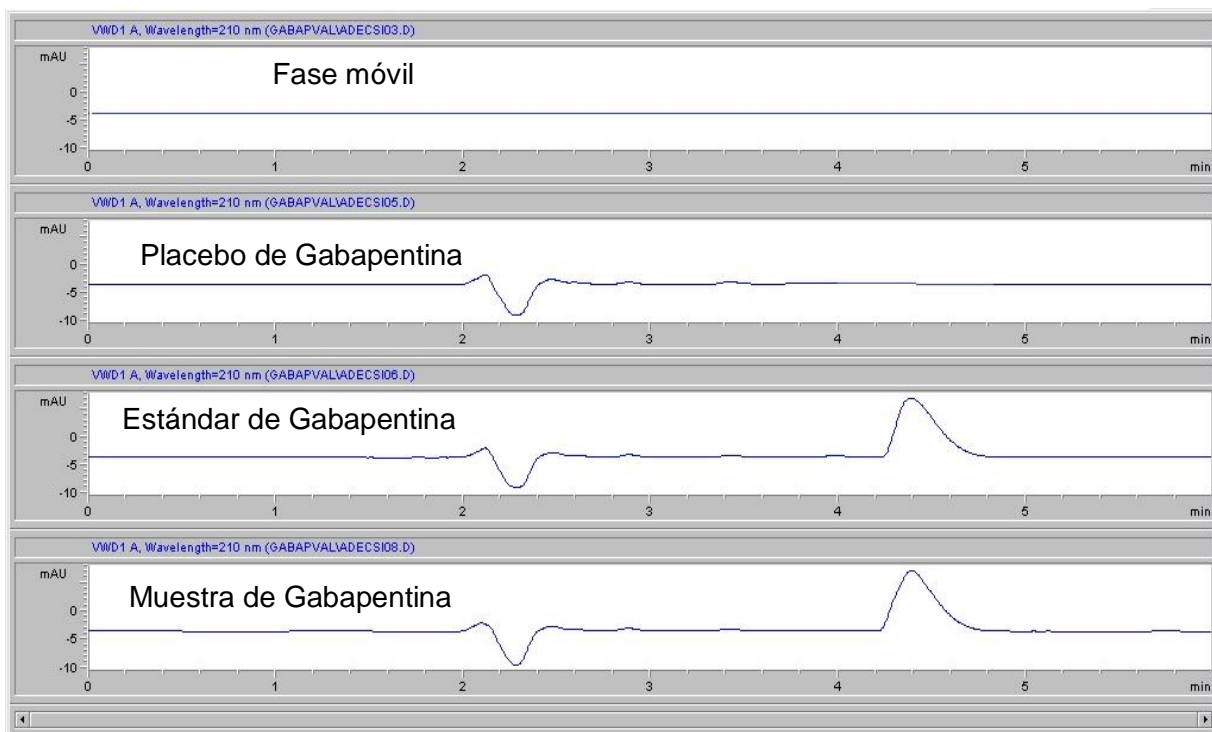
K': Factor de capacidad

ANEXOS

1. IDONEIDAD DEL METODO EN CLAR

FIGURA N° 1.1

Idoneidad del método para la cuantificación de Gabapentina 300 mg Cápsula (Gapancel).

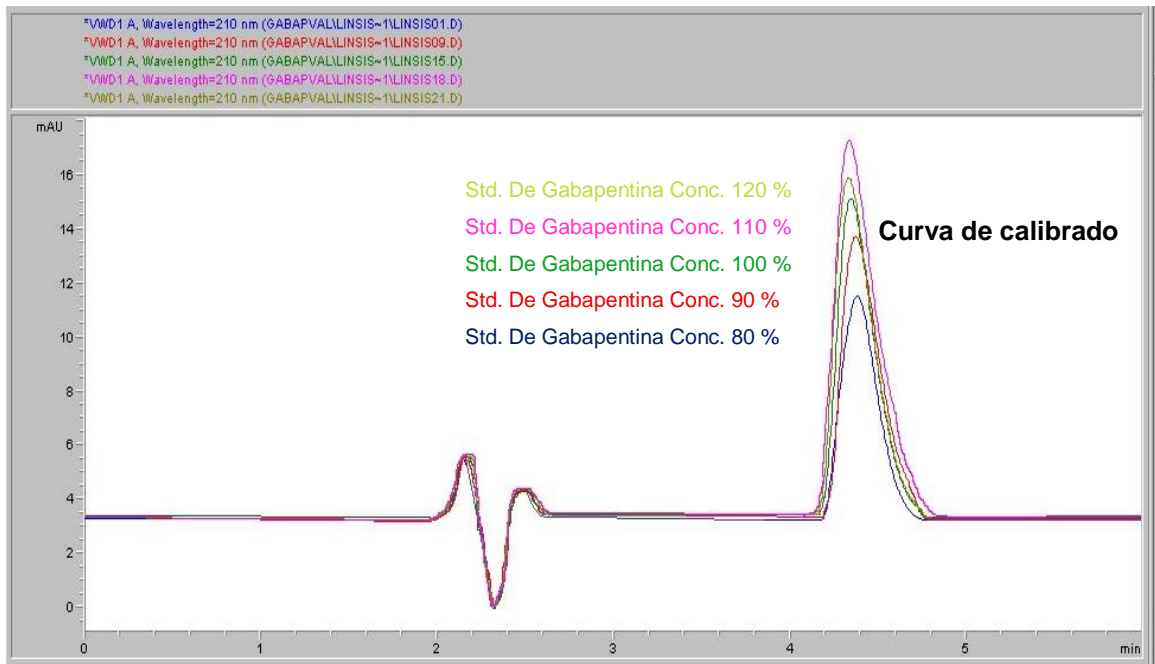


Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

2. CALIBRADO DEL SISTEMA EN CLAR

Figura N° 2.1

Calibrado del sistema en área, estándar secundario de gabapentina.



Fuente: Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

2.2 Cálculos para las concentraciones

$$400 \mu\text{g}/\text{mL} \longrightarrow 100 \%$$

300 mg declara la cápsula, para obtener una concentración que se ajuste bien a la curva de calibración se parte de una concentración 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se toma una alícuota de 10 mL para obtener esta concentración con el siguiente calculo.

44.782 mg Gabapentina = 25 mg transferidos en un matraz aforado de 25 mL multiplicado por el volumen tomado 10 mL entre el volumen del material volumétrico 25 mL por 1000.

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} * \frac{10 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} * 1000 = 400 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Para obtener las concentraciones de la curva de calibración partimos de la concentración al 100 % utilizando una regla de tres.

$$\begin{array}{ll} 100 \% & 400 \mu\text{g}/\text{mL} \\ 80 \% & X \\ X = 80 * 400 / 100 = 320 \mu\text{g}/\text{mL} \end{array}$$

Para obtener el volumen tomado para llegar a las concentraciones deseadas de igual manera se parte del volumen del 100 % utilizando una regla de tres.

$$\begin{array}{ll} 400 \mu\text{g}/\text{mL} & 10 \text{ mL} \\ 320 \mu\text{g}/\text{mL} & X \\ X = 320 * 10 / 400 = 8 \text{ mL} \end{array}$$

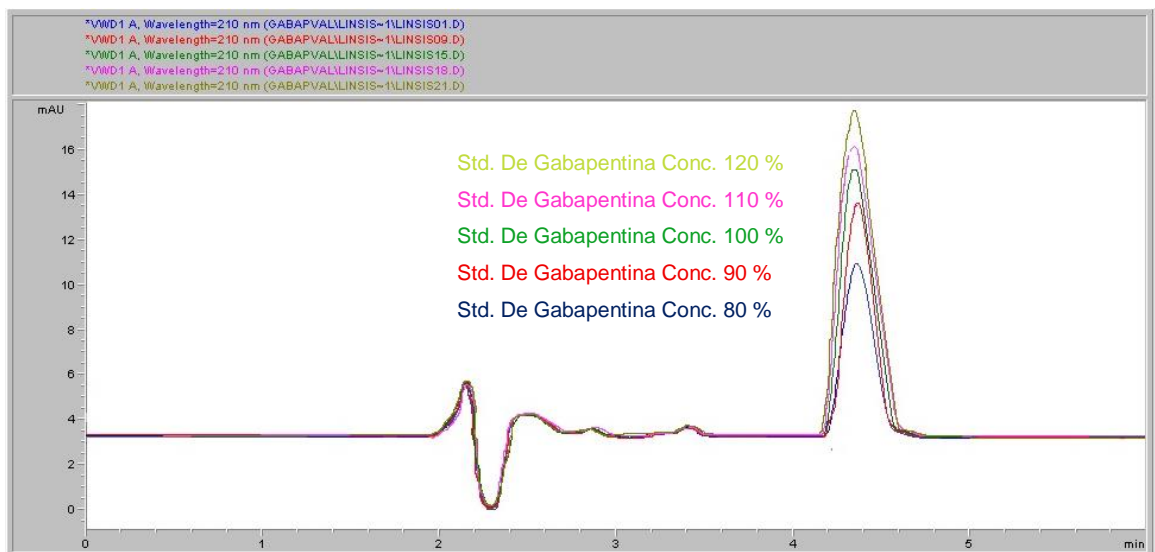
Así respectivamente se realizaron los cálculos para cada concentración para realizar la curva de calibrado, la linealidad del sistema, linealidad del método y para las tres concentraciones de la exactitud.

3. LINEALIDAD EN CLAR

3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

FIGURA N° 3.1.1

Linealidad del sistema en área estándar de Gabapentina.

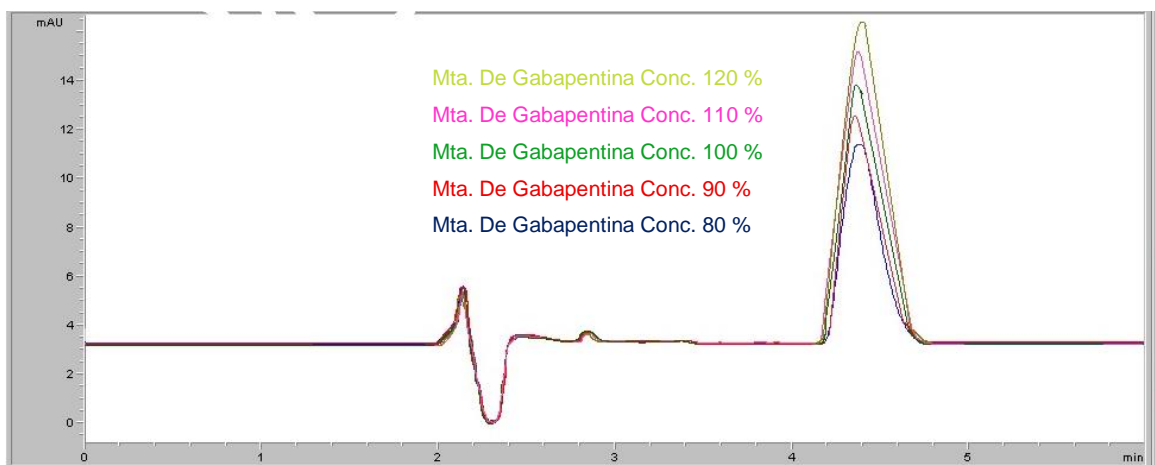


Fuente: Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

3.2 LINEALIDAD DEL METODO

FIGURA N° 3.2.1

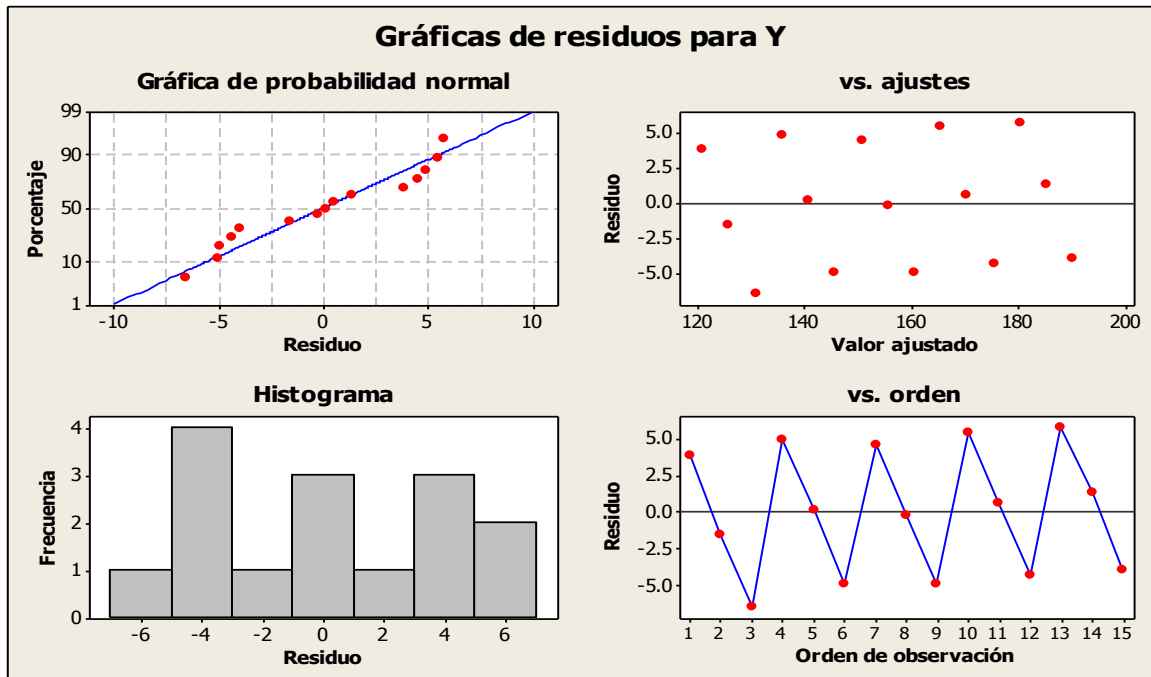
Linealidad del método en área muestra de Gabapentina 300 mg cápsula.



Fuente: Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

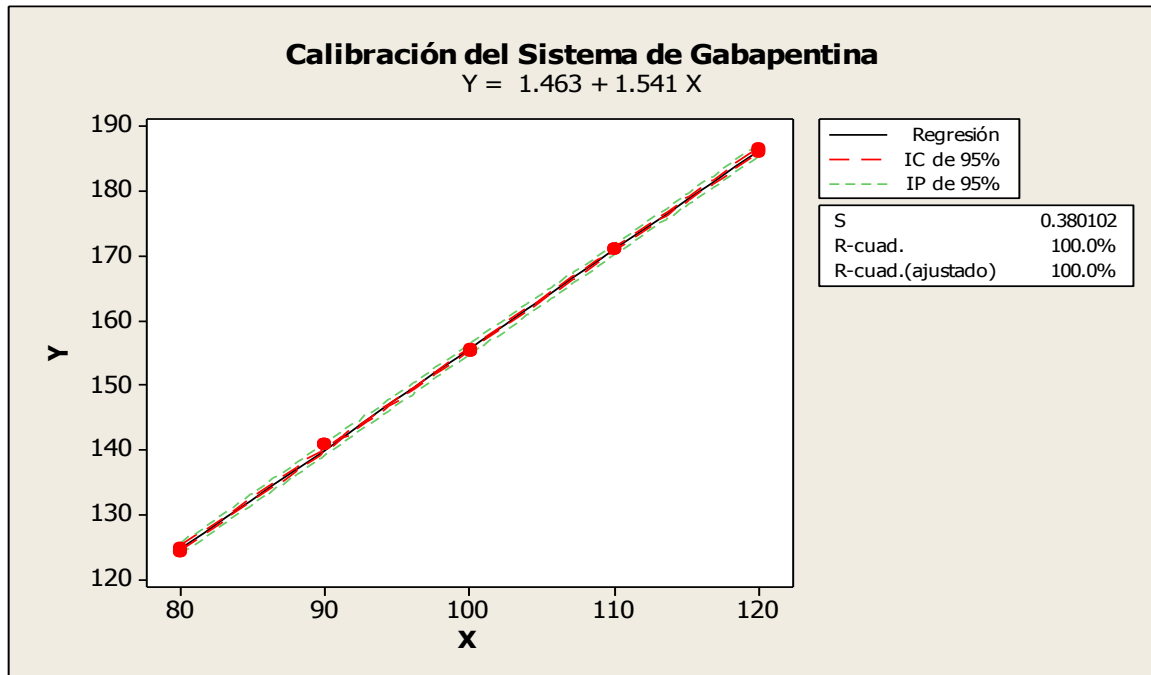
GRÁFICO DE RESIDUALES PARA LA LINEALIDAD EN CLAR

FIGURA N° 3.3



Fuente: Minitab 16

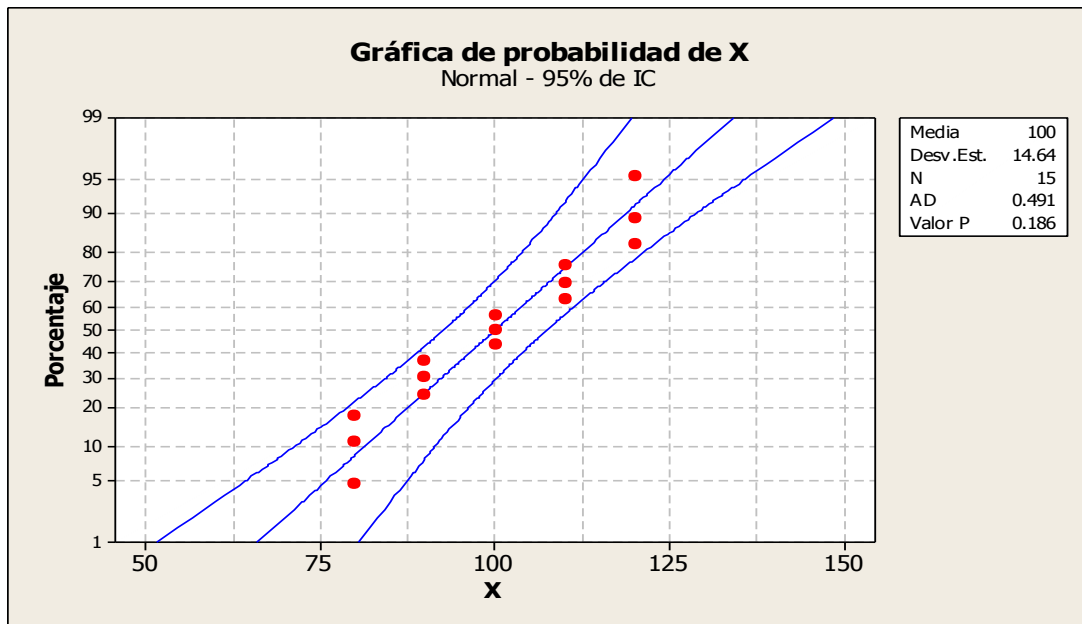
Figura N° 3.4



Fuente: Minitab 16

4. INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA VARIABLE Y

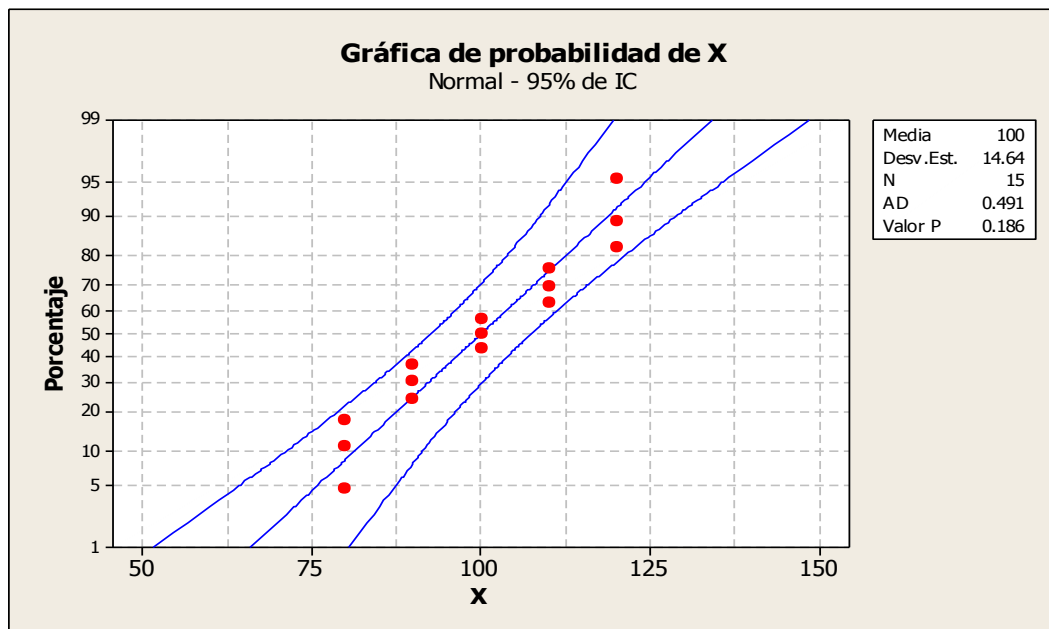
FIGURA N° 4.1



Fuente: Minitab 16

4.2 INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA VARIABLE X

FIGURA N° 4.2.1



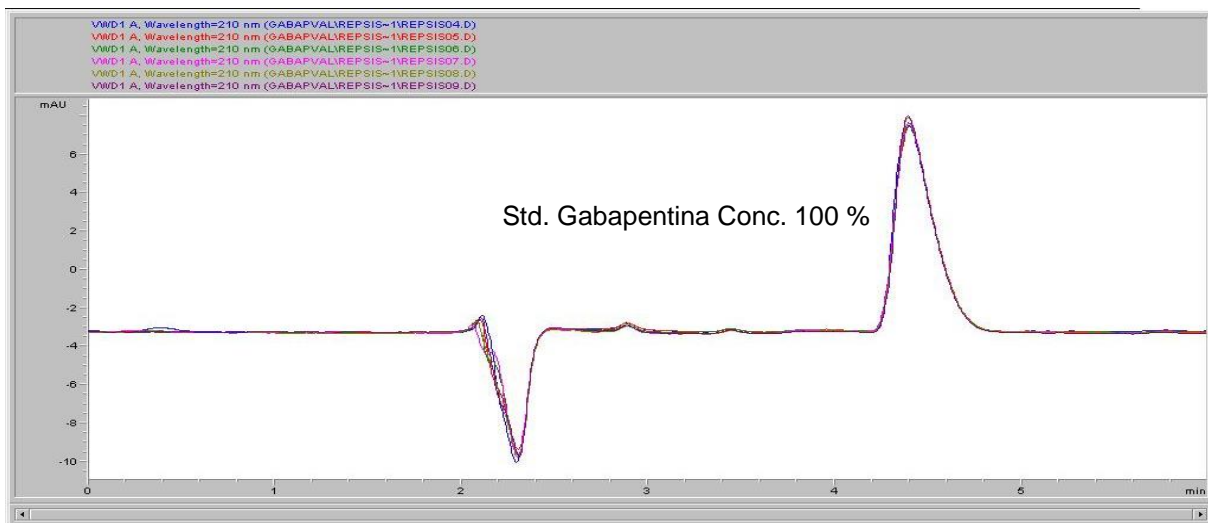
Fuente: Minitab 16

5. PRECISIÓN DEL SISTEMA EN CLAR

5.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

FIGURA N° 5.1.1

Repetibilidad del sistema en área, estándar de gabapentina.

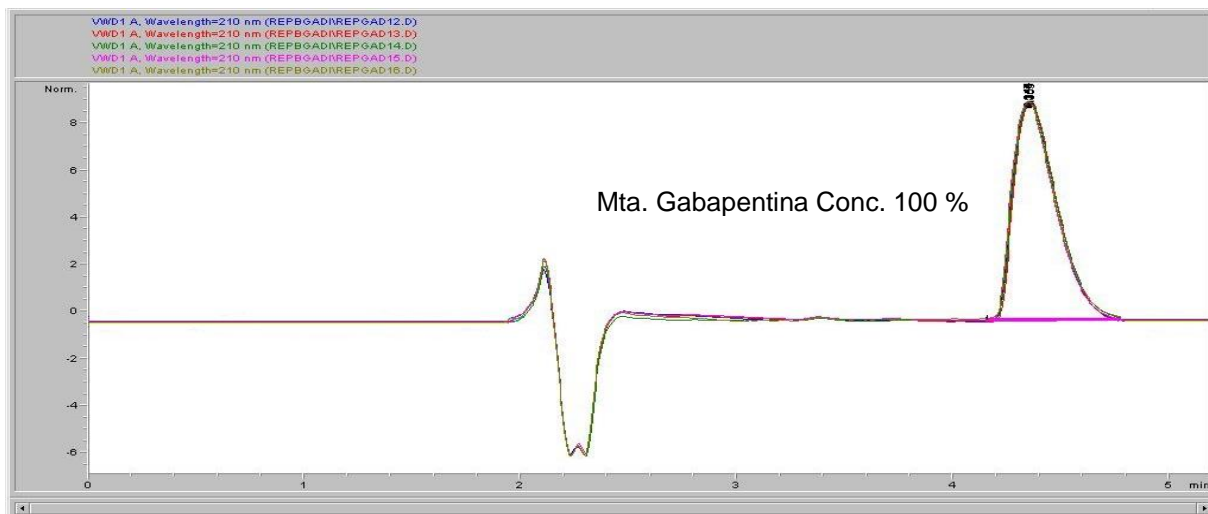


Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

5.2 REPETIBILIDAD DEL METODO

FIGURA N° 5.1.2

Repetibilidad del método en área, muestra de gabapentina 300 mg cápsula.

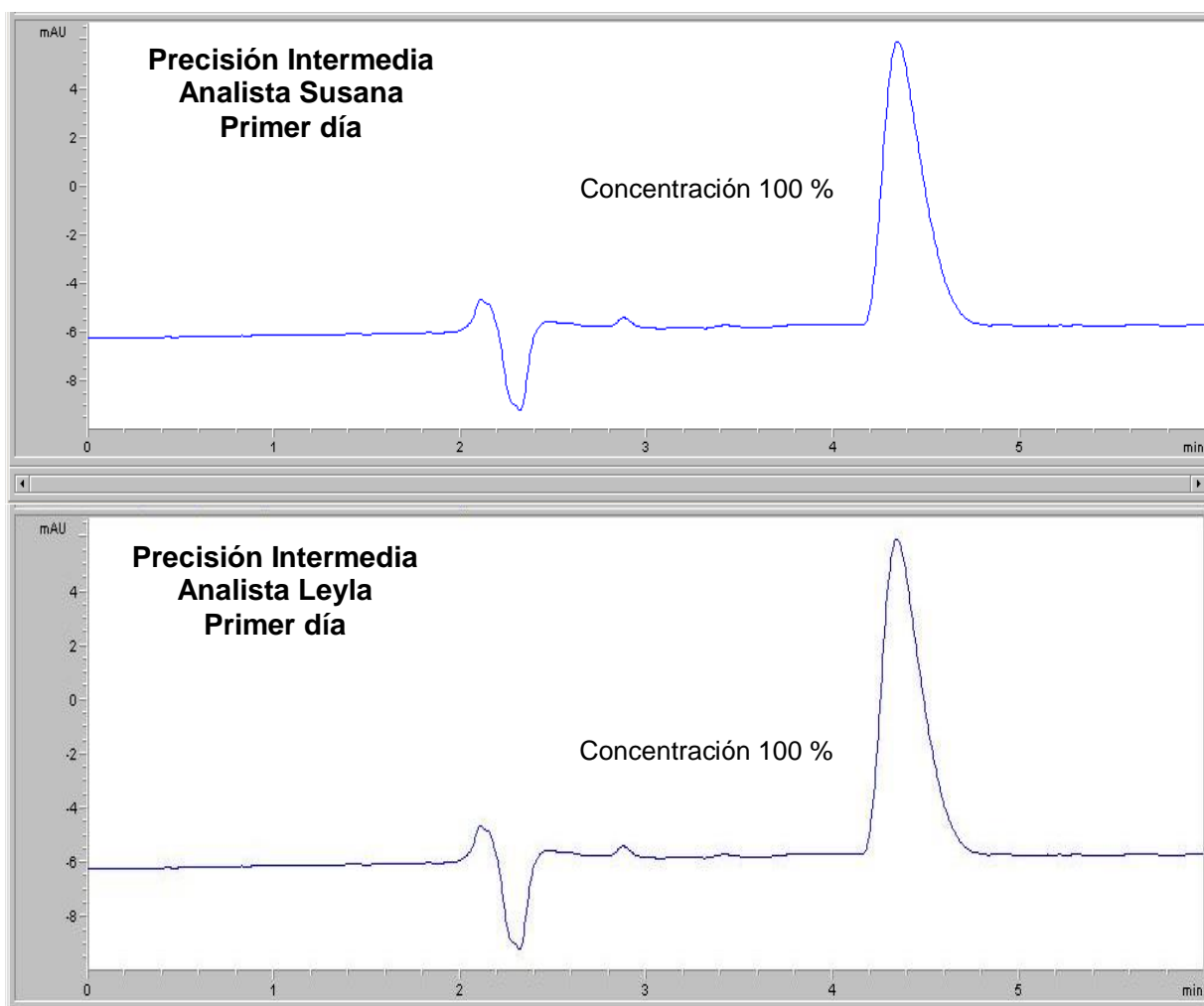


Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

5.3 PRECISION INTERMEDIA DEL METODO EN AREA DE MUESTRA DE GABAPENTINA 300 MG CAPSULA.

FIGURA N° 5.3.1

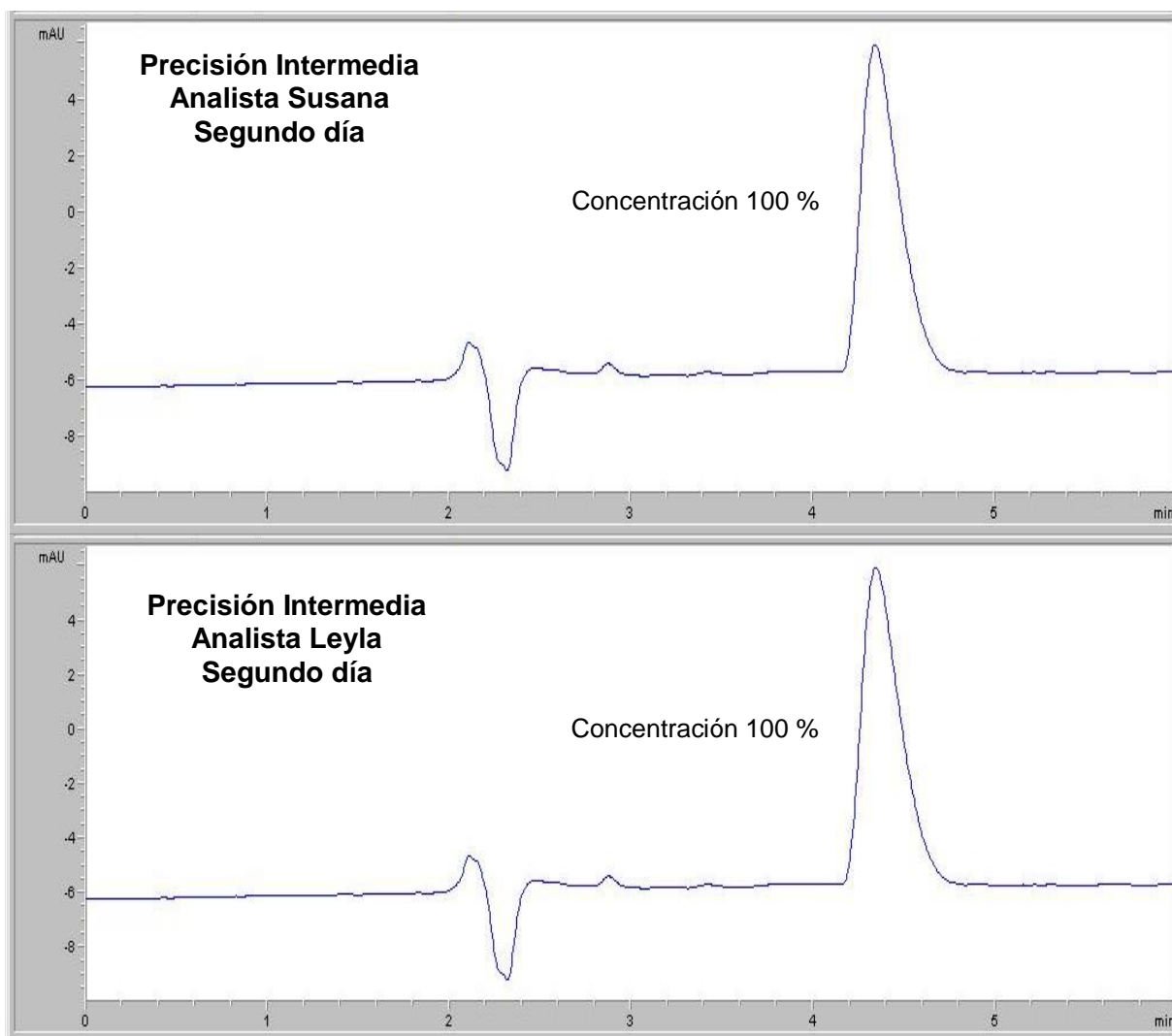
Precisión intermedia INTER-ANALISTA DIA 1



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

FIGURA N° 5.3.2

Precisión intermedia INTER-ANALISTA DIA 2



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

**RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISION INTERMEDIA INTER ANALISTA
E INTER DIA EN CLAR.**

PRECISIÓN INTERMEDIA EN CLAR						
Concentración (%)	ANALISTA: 1 DÍA: 1			ANALISTA: 1 DÍA: 2		
	Área	Área Media	F=Y/X (Área)	Área	Área Media	F=Y/X (Área)
100.000	153.600	153.133	1.536	155.100	154.267	1.551
100.000	152.400		1.524	153.200		1.532
100.000	153.400		1.534	154.500		1.545
100.000	153.500	154.800	1.535	155.400	154.933	1.554
100.000	155.800		1.558	153.500		1.535
100.000	155.100		1.551	155.900		1.559
100.000	154.000	154.300	1.540	153.200	153.367	1.532
100.000	155.800		1.558	153.600		1.536
100.000	153.100		1.531	153.300		1.533
		Media	1.541		Media	1.542
		S	0.012		S	0.011
		CV %	0.787		CV%	0.684

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

RESPUESTAS OBTENIDAS DE LA PRECISION INTERMEDIA INTER ANALISTA INTER DIA.

PRECISIÓN INTERMEDIA EN CLAR						
Concentración (%)	ANALISTA: 2 DÍA: 1			ANALISTA: 2 DÍA: 2		
	Área	Área Media	F=Y/X (Área)	Área	Área Media	F=Y/X (Área)
100.000	152.000	153.100	1.520	153.400	153.333	1.534
100.000	153.900		1.539	153.700		1.537
100.000	153.400		1.534	152.900		1.529
100.000	152.700	152.167	1.527	153.000	153.267	1.530
100.000	150.900		1.509	153.600		1.536
100.000	152.900		1.529	153.200		1.532
100.000	154.200	153.267	1.542	154.500	154.867	1.545
100.000	152.600		1.526	155.200		1.552
100.000	153.000		1.530	154.900		1.549
		Media	1.528		Media	1.538
		S	0.010		S	0.008
		CV %	0.649		CV%	0.548

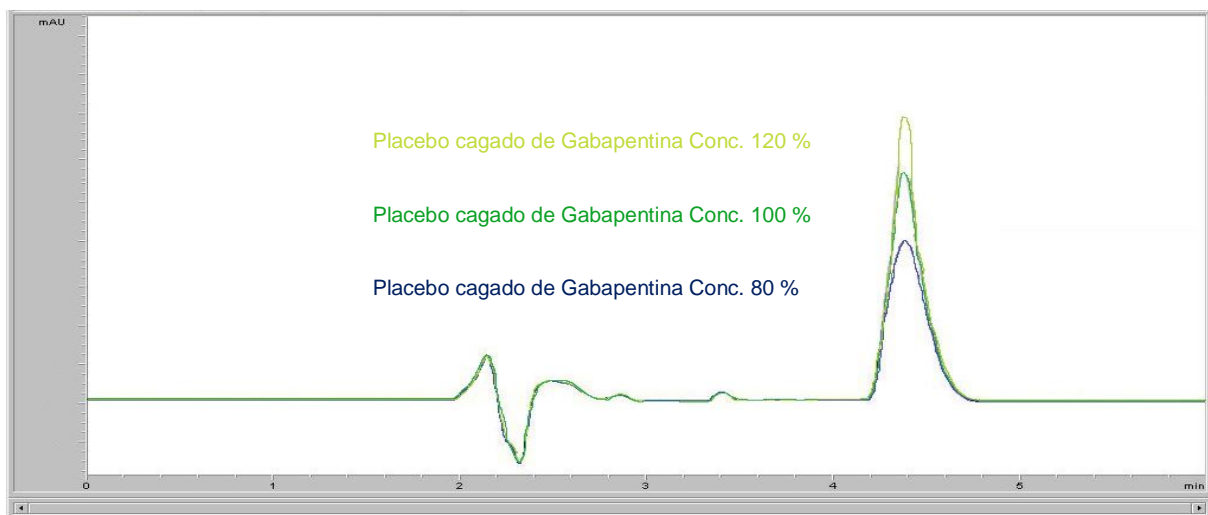
Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

6 EXACTITUD EN CLAR

6.1 EXACTITUD DEL SISTEMA

FIGURA N° 6.1.1

Exactitud del sistema en área placebo cargado de Gabapentina 300 mg Cápsula.

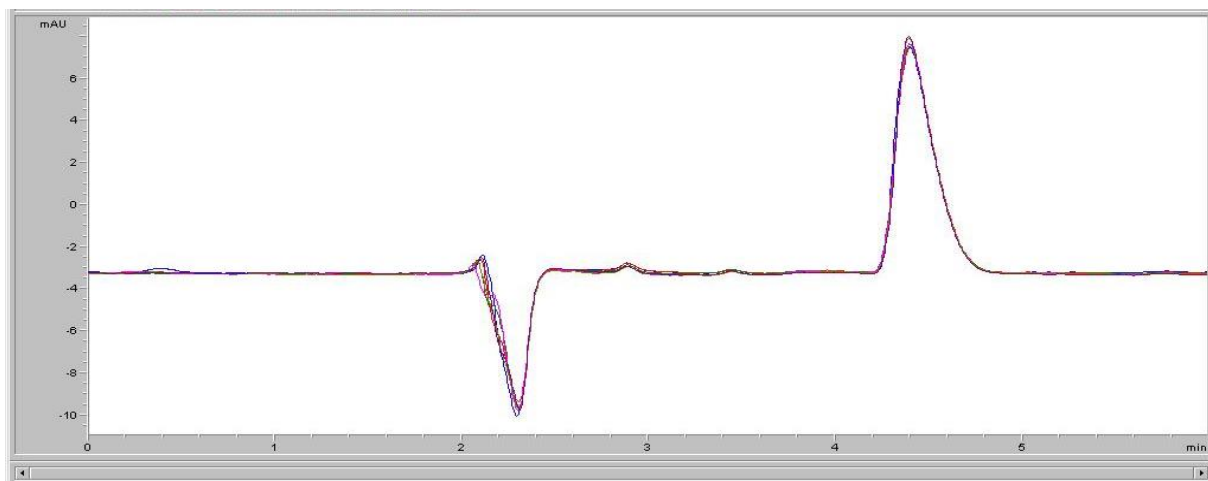


Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Series

6.2 EXACTITUD DEL METODO

FIGURA 6.2.1

Porcentaje de recuperación de gabapentina 300 mg cápsula.



Fuente: Software ChemStation Agilent 1100 Serie

7. Pesos de las cápsulas de gabapentina para la preparación de las muestras.

Numero de cápsulas	Cápsula llena	Cápsula Vacía	Principio activo. + Excipiente Contenido	Cantidad Gabapentina en mg
1	633.240	96.100	537.140	299.863
2	631.214	95.500	535.714	299.066
3	634.310	97.310	537.000	299.784
4	632.100	95.700	536.400	299.449
5	636.110	96.501	539.609	301.241
6	630.910	99.101	531.809	296.886
7	633.500	97.310	536.190	299.332
8	638.100	96.210	541.890	302.514
9	631.450	95.510	535.940	299.193
10	637.150	94.980	542.170	302.671
Promedio	633.808	96.422	537.386	300.000

Peso promedio del polvo = 537.386 mg

Declara = 300.000 mg

Cantidad p.a.= 25.000 mg

A pesar de polvo = 44.782 mg

Se pesaron individualmente las cápsulas de GAPANCEL, luego se sacó cuidadosamente el contenido de cada una, se limpió con isopo las cápsulas vacías y de igual manera se pesaron.

Para calcular la cantidad de gabapentina presente en la cápsula se realizó la siguiente operación.

$$537.140 \text{ mg} * 300 \text{ mg} / 537.386 \text{ mg} = 299.863 \text{ mg de gabapentina}$$

Así sucesivamente se realizaron los cálculos para cada cápsula y obtener la cantidad real de concentración de gabapentina.

8. Pesos de las cápsulas de gabapentina 300 mg para la Disolución.

Numero de cápsulas	Cápsula Llena	Cápsula Vacía	Principio activo. + Excipiente Contenido	Cantidad Gabapentina en mg
1	633.240	96.422	536.818	300.006
2	630.910	96.422	534.488	298.704
3	634.310	96.422	537.888	300.604
4	633.100	96.422	536.678	299.927
5	633.506	96.422	537.084	300.154
6	634.310	96.422	537.888	300.604
Promedio	633.229	96.422	536.807	300.000

8.1 Cálculos para las obtener las concentraciones para cada cápsula en la disolución.

$$\frac{300 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 333.33 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración nominal}$$

$$\frac{300.006 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 333.34 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración real}$$

$$\frac{298.704 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 331.89 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración real}$$

$$\frac{300.604 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 334.00 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración real}$$

$$\frac{299.927 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 333.25 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración real}$$

$$\frac{300.154 \text{ mg}}{900 \text{ ml}} * 1000 = 333.50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad \text{concentración real}$$

PARTES DEL DISOLUTOR VARIAN VK 7000

