

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA (UNAN- Managua)

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA – FARMACÉUTICA



MONOGRAFÍA PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA  
FARMACÉUTICA

*Validación de un método espectrofotométrico UV-VIS para la determinación de Ciprofloxacina en formulaciones sólidas producidas por Laboratorios Bengoechea de Managua (Realizada de agosto 2008 a febrero 2008).*

**AUTORES:**

Gisela Mariana García Taleno  
Bianka Alicia Gutiérrez Obando

Tutor: Ph.D. Eudoro Trejos Espinoza



## NDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁG.
Agradecimientos.	
Dedicatorias.	
Resumen.	
<b>I. APARTADO</b>	
Introducción.....	9
Objetivos.....	10
Justificación.....	11
Antecedentes.....	12
<b>II. APARTADO</b>	
<b>2. Marco Teórico.....</b>	<b>13</b>
2.1 Preámbulo.....	13
2.2. Terminología asociada a la validación.....	14
2.3. Especificación y ámbito de la Validación.....	16
2.4. Alcance de la validación.....	16
2.5. Fuentes de error en los análisis.....	17
2.6. Documentación requerida por el MINSA para la validación de Métodos de Ensayos en Análisis Farmacéutico.....	17
2.6.1. ¿En qué consiste la validación analítica?.....	18
2.6.2. Evaluación de Métodos Analíticos.....	18
2.6.3. Presentación de datos sobre Procedimientos Analíticos para el registro de productos.....	21
2.6.4. Característica de los Procedimientos Analíticos.....	22
2.6.5. Características Analíticas aplicables en casos particulares.....	24
2.7. Espectro Electromagnético.....	26
2.7.1. Fundamentos de Espectrofotometría UV - Visible.....	27
2.7.2. Parámetros fundamentales de un espectro.....	28
2.7.3. Propiedades corpusculares de la Radiación electromagnética.....	28
2.7.4. Recipiente para la muestra en análisis por espectrofotometría UV – Visible.....	29
2.7.5. Detección de la Radiación.....	30
2.7.6. Procesador de señales e instrumentos de lectura.....	30
2.7.7. Aplicaciones de las mediciones de absorción de Radiación UV- Visible.....	30
2.7.7.1. Especies absorbentes.....	30
2.7.7.2. Explotación analítica.....	32
2.7.7.3. Técnicas Cualitativas.....	34



2.7.7.4. Análisis cuantitativo.....	34
2.7.7.5. Medidas Cuantitativas de la radiación: ley de Beer.....	34
2.7.7.6. Medición experimental de la absorción.....	35
2.7.7.7. Limitaciones a la aplicabilidad de la Ley de Beer.....	37
2.8. Propiedades del Principio Activo y de las Tabletas de Clorhidrato de Ciprofloxacina.....	39

### III. APARTADO

Hipótesis.....	41
----------------	----

### IV. APARTADO

4.1. Diseño metodológico.....	42
4.2. Operacionalización de las variables.....	43
4.3. Diseño Experimental. Metodología General.....	45
4.4. Materiales.....	48
4.5. Metodología Analítica.....	49
4.6. Resultados y su Discusión.....	51
4.6.1. Selectividad del Método.....	51
4.6.2. Linealidad del Método.....	52
4.6.3. Linealidad del Sistema.....	54
4.6.4. Exactitud.....	56
4.6.5. Precisión.....	58
4.6.6. Reproducibilidad.....	59
4.6.7. Precisión Intermedia.....	61
4.6.8. Limite de Detección y de Cuantificación.....	63
4.6.9. Robustez del Método.....	64
4.6.10. Resumen de Resultados.....	68
4.7. Conclusiones.....	69
4.8. Recomendaciones.....	71
4.9. Bibliografía.....	72

### ANEXOS

- Anexo A. Procedimiento de Control de Calidad de la Ciprofloxacina, 500 mg/Tab.
- Anexo B. Definiciones Estadísticas.
- Anexo C. Resultados originales del Trabajo Experimental.



## **AGRADECIMIENTOS**

### **AGRADECIMIENTO DE BIANKA GUTIERREZ**

Antes que todo quiero dar gracias a Dios por iluminar mi vida y colmarme de muchas bendiciones en todos estos años.

A dos de los seres mas maravillosos que Dios me ha dado: Mis padres Pedro Pablo Gutiérrez Tablada y Juana Alicia Obando López por brindarme todo el amor y cariño que un hijo puede imaginar, por tener fe y confianza en mi siempre, por ser incondicionales y apoyarme durante todo este camino y el que me falta por recorrer.

A mis amigos Hazzel Fernández Fernández, Justany Aburto Manzanares, Oscar Fernández y Gisela García Taleno compañera de tesis monográfica, por compartir a lo largo de estos cinco años alegrías, tristezas y muchos logros pero sobre todo por brindarme su amistad sincera.

A todos y cada uno de aquellos docentes que fueron parte fundamental en mi formación como profesional por compartir sus enseñanzas y conocimientos y sobre todo por enseñarnos a amar lo que hacemos.

A mi tutor, el doctor Eudoro Trejos Espinoza, por tener la paciencia y disposición de guiarnos y orientarnos durante el desarrollo del trabajo gracias porque sin usted éste no se hubiese podido realizar con éxito.



## AGRADECIMIENTO DE GISELA GARCIA TALENO

Tengo el honor de agradecerle al **Dr. Eudoro Trejos Espinoza** por el resultado de este largo trabajo ya que nos permitió trabajar a su lado y enseñarnos sus experiencias, darnos su apoyo y disposición sin escatimar tiempo disponiendo de sus mejores esfuerzos

Mi gratitud a la **Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua**, por ser la Alma Mater donde adquirimos todos los conocimientos científicos para enfrentar la vida y sus desafíos.

Agradecemos a **Laboratorios Bengoechea S.A.** por darnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo monografía y brindarnos todo su apoyo a través de su personal técnico y los medios facilitados, sin los cuales no hubiésemos podido darle feliz cumplimiento a este trabajo.



## **DEDICATORIAS**

### **DEDICATORIA DE BIANKA GUTIERREZ**

Esta tesis monográfica la dedico a mis padres. Pedro Pablo Gutiérrez Tablada y Juana Alicia Obando López quienes han sido y seguirán siendo mi fuente de inspiración y superación pero sobre todo porque a ellos debo lo que soy para ustedes padres con todo mi amor.



## DEDICATORIA DE GISELA GARCIA TALENO

A Dios señor supremo de todo lo que nos rodea, gracias por permitir mi existencia y guiarme en mi vida y protegerme siempre.

A mis padres **José Esteban García Fernández** y **Mariana de Jesús Taleno García** por su apoyo y amor que me han ofrecido incondicionalmente siempre; fuente de mi inspiración.

A mis hermanos: **Evelio José, Ana Cecilia, Léster Miguel** por enseñarme de su experiencia y brindarme su apoyo.

A mis amigos (as) como son: **Bianka Gutiérrez, Justany Aburto, Hazzel Fernández, Marbelia Taisigue, Oscar Fernández**, ellos son parte de mi formación.

A la familia **Novoa Gómez** por permitirme ser un miembro más de su familia.

A **Adriano García** por haberme brindado su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi formación profesional.



## RESUMEN

**Palabras claves:** Validación, metodología, calidad, parámetros, proceso, protocolo, matriz, selectividad, precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez.

En el presente trabajo se implementó el método espectrofotométrico para la determinación de Ciprofloxacina de 500 mg, para esto fue necesario sentar las bases de un sistema de validación de tabletas que ayuda a la obtención de un producto de alta calidad y bajo costo en función de satisfacer las necesidades del usuario final. Para tal efecto fue necesaria la aplicación de una metodología analítica que se realizó en diferentes etapas experimentales desde la preparación de la muestra hasta el análisis estadístico de los datos que nos proporcionaron los experimentos del método validado.

Como resultado del trabajo se Validaron los parámetros básicos de desempeño del Método para la Determinación de Ciprofloxacina en tabletas de 500 mg, producidas en Laboratorios Bengoechea, S.A, asegurando así un método confiable y seguro con una adecuada selectividad ya que hay una total correspondencia en la zona de máxima absorción sin evidencia de influencia de la matriz en el espectro de absorción de la muestra.

Se afirma que método es lineal con un valor de  $r = 0,9999$  y  $R^2 = 0,999989$  presenta una exactitud considerada la cual se evaluó por medio de recuperación. Aplicando el ensayo de hipótesis de t de student se obtuvo un valor de 1,19 el cual nos indica que no hay diferencia significativa.

Los coeficientes de variación (CV) obtenidos están por debajo del 5% tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia, demostrando que el método presenta una muy buena precisión.

La evaluación tanto del límite de detección como del de cuantificación se realizó usando las condiciones básicas de la regresión lineal obteniendo una pendiente de 0,09685, un intercepto de 0,01696 y una varianza residual de 0,0004 afirmando que el método es suficientemente sensible.

El método analítico desarrollado y validado es adecuado para la determinación de Ciprofloxacina en tabletas de 500 mg, producidas en Laboratorios Bengoechea, S.A.



## I. APARTADO

### INTRODUCCION

Como bien es sabido en el entorno de la industria farmacéutica, la validación de todas las operaciones que en ella se realizan es una tarea obligada y necesaria para asegurar la calidad. Dentro de los laboratorios de control de calidad los profesionales necesitan, entre otras cosas, disponer de métodos de análisis validados con el fin de poder verificar que dichos métodos son fiables para la cuantificación de determinadas sustancias en sus respectivas matrices.

Por esta razón y de acuerdo a la realidad nacional se debe garantizar el aseguramiento de la calidad, tanto de los medicamentos fabricados en el país como los que se compran en el extranjero. Para esto, los laboratorios de control de calidad de las instituciones regulatorias y de la industria farmacéutica deben contar con técnicas analíticas versátiles, confiables y reproducibles para el análisis y control de las drogas consumidas en el país.

La falta de métodos oficiales implementables en las condiciones disponibles por la industria farmacéutica nacional ha obligado a ésta a desarrollar métodos analíticos que permiten velar por la calidad de sus productos

Dada la situación antes mencionada, el presente trabajo fue elaborado con el objetivo de determinar Ciprofloxacina, como principio activo, en tabletas de 500 mg, utilizando espectrofotometría UV-Visible, empleando un instrumento AGILENT, MODEL 8453 con arreglo de diodos, realizando la validación de los diferentes criterios y parámetros que son fundamentales para garantizar la confiabilidad de un método de análisis como:

**Especificidad o selectividad:** Es el grado en que un método puede cuantificar un analito en presencia de interferencias.

**Precisión:** Grado de concordancia entre una serie de medidas individuales.

**Límite de detección y cuantificación:** Representan una medida de la sensibilidad del método.

**Exactitud:** Cercanía del valor experimental encontrado a un valor de referencia.

**Linealidad:** Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- 1 Validar el método espectrofotométrico UV-visible para la determinación de Ciprofloxacina, como principio activo, en tabletas conteniendo 500 mg, producidas por Laboratorios Bengoechea, S.A. (Realizada de agosto 2008 a Febrero 2009)

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- 1 Establecer las condiciones óptimas para la determinación de Ciprofloxacina utilizando Espectrofotometría UV-Visible.
- 2 Validar experimentalmente los parámetros de desempeño analíticos del método: Selectividad, linealidad exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y robustez.
- 3 Procesar estadísticamente los datos obtenidos durante el proceso de validación.



## JUSTIFICACION

La validación de métodos es una de las medidas mundialmente reconocidas como parte necesaria de un sistema completo de garantía de la calidad. Día a día en Nicaragua los laboratorios farmacéuticos tratan de sobresalir y abrirse campo a nivel internacional así como obtener una mayor demanda de sus productos en el mercado nacional. La competencia por ofertar producto de mejor calidad y eficacia así como mantener la vigencia en el mercado es un proceso continuo.

Sin embargo, esto implica costo y tecnología de punta y aunque se puede afirmar que el campo farmacéutico en el país ha avanzado; en cuanto al mejoramiento de calidad de los productos que ofrecen aun es preciso adaptar métodos de análisis a las condiciones que presentan esto conlleva a validar los métodos utilizados para control de calidad, garantizando, así, la eficacia, seguridad y calidad de los productos que llegan al mercado.

La validación, es la herramienta que permite obtener pruebas documentadas para demostrar que el método es adecuado al análisis propuesto en las condiciones descritas; es trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo que implica minimizar el número de ensayo y repeticiones, permitiendo un importante ahorro de costo y a la vez cumpliendo con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las buenas prácticas del laboratorio.

Para realizar la validación de un método se debe considerar los parámetros de selectividad, precisión, exactitud, linealidad, límite de detección y cuantificación, así como de robustez, ya que estos garantizan el buen funcionamiento y aplicabilidad del método y es en donde se centra la investigación.

Se seleccionó este tema porque la validación de métodos de análisis en nuestro campo laboral es fundamental. Los (as) farmacéuticos (as) tienen que ser versátiles en el área de la investigación analítica y la industria; este tema será de gran aporte a las diferentes industrias farmacéuticas del país, el cual continua en vía de desarrollo y no se cuenta con todos los recursos ni la tecnología necesaria para implementar todos los métodos de análisis en estricto apego a la Farmacopea. Con la validación que fue realizada se adaptaron procesos de identificación y cuantificación requeridos en la farmacopea a las condiciones con las cuales cuenta el Laboratorio.



## ANTECEDENTES

En 1989 un grupo de profesionales integrantes de la sección catalana de AEFI (asociación de farmacéuticos de la industria) preparó una monografía de método analíticos para aquella época el tema era de gran actualidad pero estaba lejos de su regulación; existían muchas opiniones divergentes acerca de sus necesidades y su aplicación<sup>1</sup>.

La concepción de la validación de método no era más que un trámite burocrático con poca o ninguna valoración por parte de los laboratorios, que bastaba con incluirlo en los dossier de registro.

El objetivo principal de éste fue aportar una visión global y sistematizada de la validación analítica y orientar a las técnicas de los laboratorios de control y desarrollo que se enfrentaban a la problemática. La aplicación del documento se dirigió principalmente a los métodos analíticos de tipo químico e instrumental de uso mas común: control de materia prima, productos terminados, estudio de estabilidad y desarrollo galénico; desde entonces hasta la actualidad la situación ha cambiado radicalmente, de tal forma que hoy en día no se concibe la idea que un laboratorio pueda utilizar un método analítico que no halla sido objeto previamente de algún tipo de validación o comprobación del método.

La validación de métodos analíticos también fue discutida en una consulta conjunta a expertos de la FAO/IAEA celebrada en diciembre de 1997 sobre la validación de métodos analíticos para el control de calidad. De igual manera la IUPAC, ISO y la AOAC internacional se reunieron para cooperar en la elaboración de protocolo y directrices sobre la realización e interpretación de estudios de la eficacia de los métodos en análisis químicos y sobre control interno de calidad en los laboratorios; todo esto se discutió durante el simposio sobre armonización de sistema de garantía de calidad en laboratorios químicos y cuyas actas han sido publicada por la Royal Society of Chemistry del Reino Unido en 1999

En Nicaragua no es la excepción ya que se han realizado monografías sobre el tema; realizada por estudiantes de la Licenciatura Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León, en los siguientes temas: “Validación del método analítico por espectrofotometría UV-visible para el ensayo de disolución de tabletas metocarbamol elaborados por el laboratorio Panzima” y “Desarrollo y validación de un método de análisis de tabletas de loratadina y clorhidrato de pseudoefedrina por espectrofotometría UV-visible respectivamente”.

---

<sup>1</sup> Coautores. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, Asociación Española Farmacéutica de la Industria (AEFI), Marzo 2001, pág. 3.



## II. APARTADO

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. PREÁMBULO

La validación de métodos analíticos es una de las medidas reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de garantía de la calidad en química analítica. Este consiste en comparar y cuantificar los métodos ya existentes en relación al método experimental; obteniendo pruebas que ofrecen seguridad, confianza, minimizando el número de errores, dando como resultado deducción de los costos de producción.

La validación se define como la obtención de pruebas con arreglo a la Norma de Correcta Fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto<sup>1</sup>.

En general, la validación debe comprobar que el método se comporta de forma adecuada para la finalidad perseguida en todo el rango de concentraciones de trabajo del analito y de materiales de ensayos a los que se aplican, con todos los criterios de aplicación de adecuación al propósito, los cuales deben especificarse en su totalidad antes de realizar la validación.

Los términos de cualificación y calibración tienen relación con la validación ya que facilita la comprobación de un equipo con respecto a sus resultados previstos en una serie de operaciones ya definidas.

Los aparatos involucrados (balanza analítica, espectrofotómetro, agitador magnético, cronómetro, computadora) en el proceso de validación juegan un papel fundamental para obtener resultados fiables así como los reactivos químicos y soluciones reactivas que sean preparadas como lo describe la farmacopea u otros procedimientos reconocidos; en caso de las muestras de ensayos deben ser representativas y obtenidas bajo normas.

Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es el material: la mayoría de los análisis se realizan en vidrios y éstos pueden influir en errores debido a contaminaciones cruzadas. Igualmente la exactitud de los materiales volumétricos tiene gran influencia en la determinación analítica.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> <sup>1</sup> Coautores. OP CIT.pag27



## 2.2. TERMINOLOGÍA ASOCIADA A LA VALIDACIÓN<sup>3</sup>

**TECNICA ANALITICA:** Principio científico que ha sido encontrado que es útil para proveer información sobre la composición de un determinado producto o material

**METODO ANALITICO:** Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

**PROCEDIMIENTO ANALITICO:** Se refiere a la manera en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no necesariamente los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

**PROCEDIMIENTO ANALITICO OFICIAL:** Procedimiento analítico estandarizado contenido en una farmacopea oficial o colección oficial de procedimientos analíticos. Se les supone validado y los laboratorios que los utilizan no están obligados a validar la exactitud y veracidad de los mismos, solamente demostrar su aptitud para aplicarlos.

**MATERIAL DE REFERENCIA:** Es un material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecida para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición o para asignarles valores a los materiales.

**MATERIAL ESTANDAR DE REFERENCIA:** Es un material emitido por la Oficina Nacional de Normas de Estados Unidos (U.S National Bureau of Standards) cuyo nombre fue cambiado recientemente a Instituto Nacional para Normas y Tecnología (National Institute for Standards and Technology, NIST).

**VALIDACIÓN:** Confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

**VALIDACION DE UN PROCEDIMIENTO ANALITICO:** Procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorios una base de datos que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Esto 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.

---

<sup>3</sup> Guía para la Validación de Métodos Analíticos. Entidad de Acreditación de Costa Rica, ECA, 2001.



**PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO:** Son las características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión y veracidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo de linealidad y robustez.

**SESGO:** Se usa en el sentido de exactitud de un promedio a largo plazo (valor esperado) de una serie de promedios, es la diferencia en el valor esperado (teóricamente igual al promedio de un número infinito de valores individuales independientes) del valor verdadero, correcto o asumido que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

**ERROR (de Medición):** 'El resultado de una medición menos el valor verdadero del mensurando.' Nota: Puesto que un valor verdadero no puede determinarse, en la práctica se utiliza un valor verdadero convencional. [VIM 1993] 'El valor de un resultado menos el valor verdadero.' [IUPAC Compendium of Chemical Technology, 1985]

**ERROR ALEATORIO:** Resultado de una medición menos la media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad. Nota: El error aleatorio es igual al error menos el error sistemático. Debido a que sólo puede realizarse un número finito de mediciones, es posible determinar sólo un estimado del error aleatorio.' [VIM 1993] 'La diferencia entre un valor observado ( $x_i$ ) y la media límite ( $\mu$ ); Es decir,  $= x_i - \mu$ . ' [IUPAC 'Orange' Book]

**ERROR SISTEMATICO:** Media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad menos un valor verdadero del mensurando.' Nota: El error sistemático es igual al error menos el error aleatorio. Como el valor verdadero, el error sistemático y sus causas no pueden ser conocidos.

**MEDICION:** Conjunto de operaciones que tienen por objeto determinar un valor de una magnitud'. [VIM 1993]

**PROCEDIMIENTO DE MEDICION:** Conjunto de operaciones, descritas específicamente, para realizar mediciones de acuerdo a un método determinado'. Nota: Un procedimiento de medición es usualmente descrito en un documento, llamado algunas veces "procedimiento" y que proporciona suficientes detalles para que un operador pueda realizar una medición sin necesitar más información. [VIM 1993]

**METODO DE MEDICION:** Secuencia lógica de operaciones, descrita genéricamente, utilizada en el desarrollo de las mediciones.' [VIM 1993]



**CALIDAD:** La totalidad de propiedades y características de un producto o servicio que se refieren a su capacidad para satisfacer necesidades declaradas o implícitas'. [ISO 8402:1994]

**ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD:** Todas aquellas actividades planeadas y sistemáticas implementadas dentro del sistema de calidad y demostradas como necesarias para proporcionar una confianza adecuada de que una entidad cumplirá sus requisitos de calidad.' [ISO 8402:1994]

**CONTROL DE CALIDAD:** Las técnicas y actividades operacionales que son usadas para satisfacer los requisitos de calidad.' [ISO 8402:1994]

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO:** Serie de procedimientos asumidos por el personal de un laboratorio para el continuo seguimiento de las operaciones y de los resultados de las mediciones con el fin de decidir si los resultados son lo suficientemente confiables como para ser emitidos'. [IUPAC 'Orange' Book]

**RECUPERACION (\*):** La fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis que es determinada efectivamente por el método; [AOAC-PVMC] (\*) Nota del traductor, definición corregida por el traductor.

**INTERVALO DE LINEALIDAD:** El ámbito de un procedimiento analítico es el intervalo entre las concentraciones de menor y mayor analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

## 2.3 ESPECIFICACION Y AMBITO DE LA VALIDACION<sup>4</sup>

La validación se aplica a un protocolo definido para determinar un analito específico y el rango de concentraciones en un equipo particular con propósito específico; este debe comprobar que dicho método se comporte de forma adecuada para la finalidad perseguida. Por consiguiente, estas características, junto con todos los criterios de adecuación, deben especificarse antes de realizar su validación.

## 2.4. ALCANCE DE LA VALIDACIÓN

Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios y las instalaciones de la Planta de Fabricación.

---

<sup>4 2</sup> Castellucci Federico. Resultado del simposio sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos.



Los estudios de validación verifican el sistema en estudio y en condiciones extremas de prueba, semejantes a las que cabría esperar durante el proceso, a fin de comprobar que dicho sistema está bajo control.

Una vez que el sistema o proceso se ha validado, cabe prever que permanezca bajo control, siempre y cuando no se hagan cambios sustanciales en el sistema. Si se producen modificaciones o surgen problemas, o si un equipo se sustituye o se cambia de ubicación, habrá que efectuar la revalidación. Los equipos y procesos de importancia crítica se revalidan en forma sistemática a intervalos adecuados a fin de demostrar que el proceso sigue bajo control.

## **2.5. FUENTES DE ERROR EN LOS ANALISIS**

Los errores en la medición provienen de diferentes fuentes y niveles de organización, tales como<sup>2</sup>:

1. Error aleatorio de medición (repetibilidad).
2. Sesgo de ejecución.
3. Sesgo de laboratorios.
4. Sesgos del método.
5. Efecto de variación de la matriz.

## **2.6. DOCUMENTACION REQUERIDA POR EL MINSA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO EN ANÁLISIS FARMACÉUTICO<sup>5</sup>**

La documentación es indispensable en los procedimientos de validación ya que permite la aplicabilidad del método sin error, esta puede, aunque no limitarse, a la siguiente:

- 1 Descripción detallada del procedimiento analítico.
- 2 Descripción de los parámetros evaluados.
- 3 Evaluación y cálculos estadísticos para la verificación de los parámetros de desempeño.
- 4 Datos instrumentales necesarios para la justificación de los resultados (tablas y gráficos).
- 5 Resumen de los resultados de la validación.
- 6 Certificado de calibración o calificación de los equipos.
- 7 Certificado de los análisis de los estándares patrones o material de referencia

---

<sup>5</sup> Manual de Procedimientos para el registro y Renovación de Productos Farmacéuticos e Inscripción Sanitaria y Renovación de Productos Cosméticos e Higiénicos.



### **2.6.1. ¿En qué consiste la validación analítica?**

El control analítico de un producto farmacéutico, o de los ingredientes específicos del producto, es necesario para asegurar la inocuidad y eficacia del producto durante todas las fases de su período de actividad, incluyendo el almacenamiento, la distribución y el uso. Idealmente, dicha vigilancia debe efectuarse de conformidad con especificaciones establecidas y comprobadas durante la elaboración del producto.

Con esto se asegura que las especificaciones de calidad sean aplicables al material farmacéutico usado para establecer las características biológicas de las sustancias activas, como también a las formas farmacéuticas comercializadas. Cuando se completa la evaluación biomédica del producto, la aceptabilidad de todos los lotes subsiguientes será juzgada exclusivamente sobre la base de esas especificaciones.

El objetivo principal de la validación analítica es el de asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. De ahí que sea necesario definir debidamente tanto las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse como el objetivo previsto para el mismo. Estos principios se aplican a todos los procedimientos descritos en la farmacopea y también a los procedimientos no incluidos en la farmacopea pero que se utilizan en una fábrica.

Si bien estas pautas son aplicables a los procedimientos usados para examinar atributos químicos y físico-químicos, muchas de ellas son igualmente aplicables a los procedimientos microbiológicos y biológicos.

### **2.6.2. Evaluación de Métodos Analíticos**

Existen diversos procedimientos para evaluar métodos analíticos que dependen también de los objetivos concretos perseguidos.

El término validación se ha utilizado en Química Analítica con diferentes significados. Desde el punto de vista de Control de Calidad se emplea para indicar el proceso empleado para establecer la calidad de un método y autorizar su uso en el laboratorio.

Validar un método de análisis es verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a unos determinados requisitos establecidos por el usuario o por Normas Internacionales de Calidad.

Los parámetros de calidad que más comúnmente se toman en cuenta son:

- Estadísticos: Incertidumbre o precisión, trazabilidad o exactitud, selectividad, límite de detección, intervalo dinámico y robustez.



- Operativos: rapidez, requerimiento energético, capacidad de trabajo de campo, complejidad en la preparación de la muestra analítica, capacidad para el microanálisis, etc.
- Económicos: Inversión inicial, costo de mantenimiento, preparación del personal, etc.

Para realizar la validación de un método el usuario debe definir previamente los parámetros de calidad en los que está interesado. Dado que es prácticamente imposible lograr valores elevados para todos ellos simultáneamente, debe llegarse a un equilibrio o compromiso entre los mismos. Así por ejemplo, la exactitud y la precisión son parámetros muy apreciados, pero el analista debe estar dispuesto a sacrificar hasta cierto punto su valor numérico en aras de la rapidez, la sencillez o el costo, si se requiere, en circunstancias determinadas.

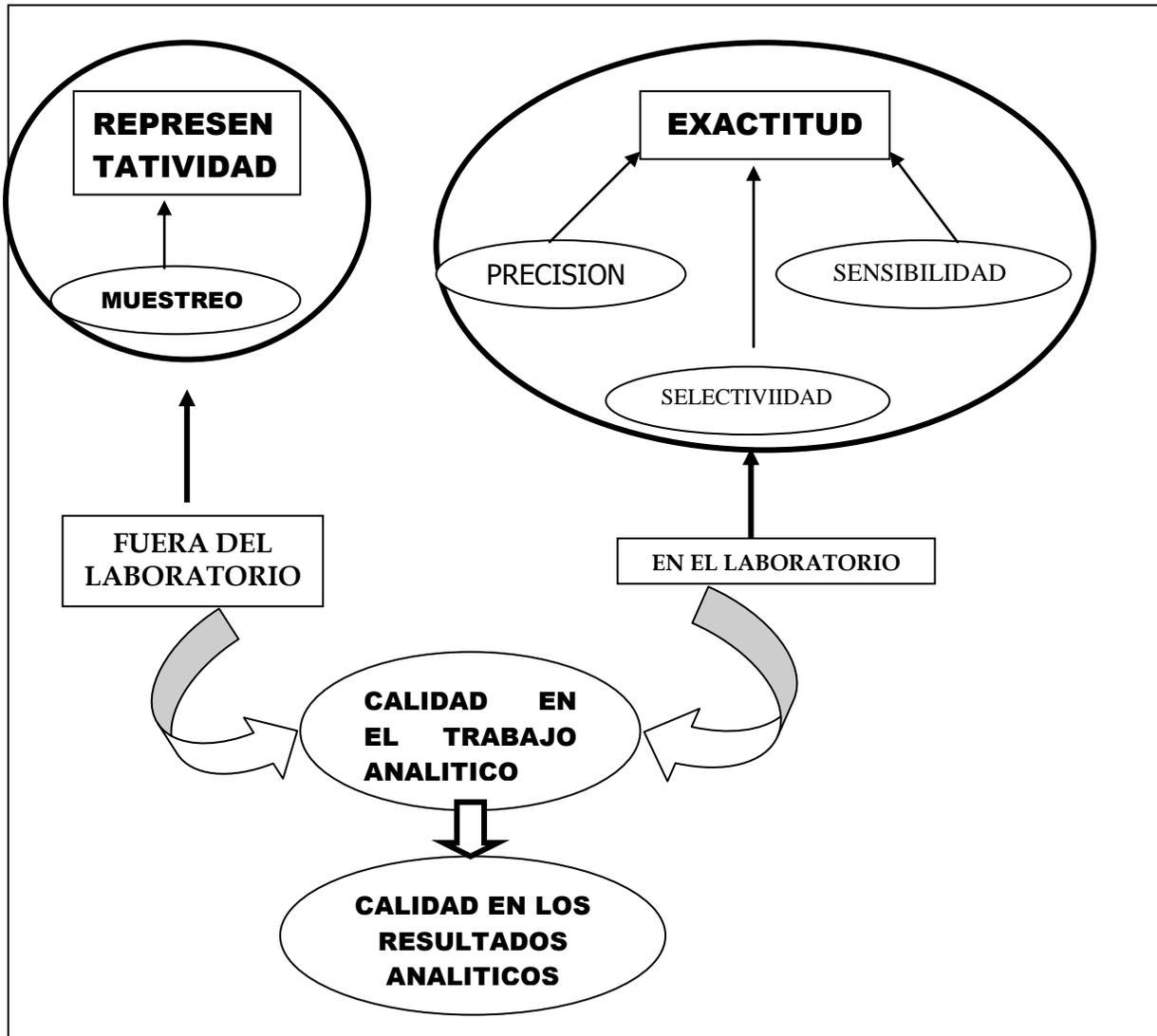
Las propiedades analíticas pueden considerarse divididas en dos grupos según su importancia relativa: las denominadas básicas como exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad y rapidez; y las complementarias tales como coste, grado de participación humana (automatización), robustez-transferibilidad, seguridad para el personal, etc.

Desde la perspectiva de la calidad de los resultados son dos las propiedades básicas que la definen de manera práctica e inequívoca: la exactitud (grado de concordancia entre el resultado y el verdadero valor o valor garantizado al máximo) y la representatividad (grado de concordancia entre la muestra tomada y la definición del problema analítico a resolver).

Tal como puede apreciarse en la Figura 2. 1 estas propiedades definitorias de la calidad están a su vez sustentadas por otras propiedades analíticas relacionadas con el proceso analítico y en definitiva con la calidad del trabajo dentro del laboratorio. La representatividad se basa en un muestreo adecuado fundamentado en una buena definición de los objetivos, la existencia de un plan de muestreo y un control estadístico "ad hoc" (Ver Fig. 2.1.).



**Figura 2.1. Relaciones entre calidad de los resultados y las propiedades analíticas básicas**



Fuente: Trejos E. Control de Calidad en el Laboratorio Analítico, UNAN, León, 1994.



No puede concebirse la exactitud sin un nivel adecuado de precisión (grado de concordancia entre un resultado y un conjunto de ellos, obtenidos aplicando el mismo proceso analítico a la misma muestra en circunstancias idénticas (Repetibilidad) y/o algo muy diferentes (Reproducibilidad).

No podrá alcanzarse el verdadero valor si no se garantiza la ausencia de todo tipo de interferencias (selectividad) y sin que se alcance el nivel de sensibilidad adecuado a la concentración de los analitos.

En resumen, la exactitud y la representatividad respecto al problema analítico son las propiedades analíticas definitorias de la calidad de los resultados y en definitiva de la calidad de los resultados analíticos.

### **2.6.3. Presentación de datos sobre procedimientos analíticos para el registro de productos<sup>6</sup>**

Todos los datos referentes a los procedimientos analíticos presentados en apoyo de una especificación propuesta para un ingrediente determinado (sustancia farmacéutica o excipiente) o formas farmacéuticas deben ser suministrados bajo tres titulares principales, a saber:

**1. Justificación del procedimiento de análisis propuesto.** En comparación con otros procedimientos posibles. Cuando se propone un procedimiento inusual, debe describirse su base científica. Cuando se propone un procedimiento en reemplazo de uno existente, deben suministrarse datos comparativos.

**2. Descripción del procedimiento.** Suministrando tantos detalles como se crea necesario para que trabajadores capacitados puedan ponerlo en práctica en forma confiable. Deben definirse los reactivos requeridos (ya sea detalladamente o haciendo referencia a textos publicados a los que se tenga fácil acceso) y proveerse los detalles concernientes a la disponibilidad de las sustancias de referencia requeridas.

Si el procedimiento se basa en la aplicación de principios bien establecidos de química analítica, no será necesario suministrar fórmulas para el cálculo de los resultados. Sin embargo, si el método es complejo debe incluirse una fórmula completa para el cálculo de los resultados, definiendo todos los términos.

**3. Datos de la comprobación.** Cada característica de un procedimiento analítico aplicable al procedimiento que se haya definido (véase la sección 2.6.4) debe ser descrita y deben presentarse datos experimentales que la apoyen. Cuando los datos

---

<sup>6</sup> Manual de Procedimientos para el registro y Renovación de Productos Farmacéuticos e Inscripción Sanitaria y Renovación de Productos Cosméticos e Higiénicos.



presentados con fines de registro se basan en métodos bien establecidos de la farmacopea,

Entonces puede reducirse considerablemente la necesidad de contar con datos de apoyo para la comprobación, pues se presume que los procedimientos de la farmacopea ya han sido debidamente comprobados. No obstante, podría muy bien ser necesario presentar pruebas de que los procedimientos de la farmacopea son aplicables al material sometido a análisis, especialmente cuando se trate de formas farmacéuticas.

#### 2.6.4. Características de los procedimientos analíticos<sup>7</sup>

A continuación se definen las características que tal vez sea preciso especificar con respecto a los procedimientos analíticos, con indicación de cómo pueden ser determinadas.

No todas las características son aplicables a cada procedimiento analítico o a cada material. Ello depende en gran medida del propósito al cual se desea aplicar el procedimiento.

**Exactitud.** La exactitud del procedimiento empleado consiste en la proximidad de los resultados obtenidos al valor real. La exactitud puede determinarse aplicando el procedimiento a las muestras del material a examinarse, cuando han sido preparadas con exactitud cuantitativa. Siempre que sea posible, esas muestras deben contener todos los componentes del material, incluyendo el analito. Deben prepararse también muestras en las que el analito haya sido incorporado en cantidades de aproximadamente 10% por encima y por debajo de la gama de valores prevista. También es posible determinar la exactitud comparando los resultados con los obtenidos empleando. Otro procedimiento ya comprobado.

**Precisión.** La precisión del procedimiento es el grado de concordancia entre los resultados de los análisis individuales. Se mide por la dispersión de los resultados individuales de la media, y usualmente se expresa como una desviación patrón o como el coeficiente de variación (desviación patrón relativa) cuando el procedimiento completo se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

**Repetibilidad** (variación dentro del laboratorio). Es la precisión del procedimiento cuando es repetido por el mismo analista bajo el mismo conjunto de condiciones (los mismos reactivos, equipos, graduaciones, y laboratorio) y dentro de un lapso breve. La repetibilidad de un procedimiento se evalúa efectuando determinaciones completas y separadas, con muestras separadas e idénticas del mismo lote de

---

<sup>7</sup> The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 32-NF 27.



material homogéneo, y por lo tanto proporciona una medida de la precisión del procedimiento bajo condiciones normales de operación.

**Reproducibilidad.** Es la precisión del procedimiento cuando se efectúa bajo condiciones diferentes, usualmente en diferentes laboratorios, con muestras supuestamente idénticas obtenidas del mismo lote de material homogéneo. También se puede obtener información valiosa efectuando comparaciones de los resultados obtenidos por distintos analistas, mediante el uso de diferentes equipos, o llevando a cabo el análisis en diferentes momentos.

**Robustez.** La robustez, o dureza, es la capacidad del procedimiento de producir resultados analíticos de exactitud y precisión aceptables bajo variadas condiciones. Constituye una medida del grado en que los resultados obtenidos de muestras separadas y supuestamente idénticas del mismo lote de material homogéneo son influenciados por los cambios en las condiciones operacionales o ambientales, pero son concordantes con las especificaciones establecidas para el procedimiento.

**Linealidad y alcance.** La linealidad de un procedimiento analítico es la posibilidad de que éste produzca resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. El alcance del procedimiento es una expresión de los niveles más bajo y más alto de analito que, según se haya demostrado, pueden ser determinables con precisión, exactitud, y linealidad aceptables.

Estas características son determinadas mediante la aplicación del procedimiento a una serie de muestras que tienen concentraciones de analito que cubren el alcance atribuido al procedimiento. Cuando la relación entre la respuesta y la concentración no es lineal, se puede lograr la normalización por medio de una curva de calibración.

**Selectividad.** La selectividad o especificidad de un procedimiento es la posibilidad de que éste mida el analito en una forma que esté libre de interferencia de parte de otros componentes de la muestra que se está examinando (por ejemplo, impurezas provenientes de la fabricación o de la degradación, o bien ingredientes que no sean el analito, sean farmacológicamente activos o inertes). La selectividad (o la carencia de la misma) puede expresarse en relación con el sesgo de los resultados analíticos obtenidos cuando el procedimiento se aplica al analito en presencia de niveles previstos de otros componentes, comparado con los resultados obtenidos con el mismo analito sin sustancias agregadas.

Cuando los demás componentes son todos conocidos y están disponibles, la selectividad puede determinarse mediante la comparación de los resultados analíticos obtenidos con el analito, con o sin la adición de los materiales que pueden interferir. Cuando dichos componentes no han sido identificados o no están disponibles, a menudo puede medirse la selectividad determinando la recuperación de una adición



normal de analito puro aun material que contenga un nivel constante de los otros componentes.

**Sensibilidad.** La sensibilidad es la capacidad del procedimiento de prueba de registrar pequeñas variaciones de la concentración. Es la inclinación de la curva de calibración. Se debe evitar usar el término en forma más general, es decir, abarcando límite de detección y/o límite de cuantificación.

**Límite de detección.** El límite de detección es el nivel más bajo de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente determinado en forma cuantitativa, empleando un método específico bajo las condiciones experimentales exigidas. Dicho límite generalmente se expresa en términos de la concentración de analito (por ejemplo, en microgramos por litro) en la muestra. Cuando la medición final se basa en la lectura de un instrumento, se deberá tener en cuenta la respuesta de fondo (la proporción entre señal y ruido).

**Límite de cuantificación.** El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en la muestra, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables cuando se emplea el procedimiento exigido. Se mide mediante el análisis de muestras que contengan cantidades conocidas de analito en disminución, y la determinación del nivel más bajo al cual pueden alcanzarse grados aceptables de exactitud y precisión. Cuando la evaluación final se basa en la lectura Instrumental, tal vez sea necesario evaluar y tener en cuenta la magnitud de la respuesta de fondo (la proporción entre Señal y ruido). En muchos casos el límite de cuantificación es aproximadamente el doble que el de detección.

### 2.6.5. Características analíticas aplicables en casos particulares<sup>8</sup>

Criterios para la selección de los parámetros analíticos de validación

No es necesario que en todos los casos se consideren todas las características mencionadas en la sección 2.6.4; las que son aplicables deben ser identificadas sobre la base de caso por caso. No obstante, las siguientes generalizaciones pueden servir de orientación.

En general los métodos empleados para el examen de los materiales farmacéuticos pueden ser clasificados en forma amplia de la siguiente manera:

El conjunto de parámetros analíticos para la validación de un procedimiento de ensayo varía desde las determinaciones analíticas altamente exactas hasta aquellas para la evaluación subjetiva de atributos. Considerando la variedad de ensayos, es lógico que diferentes métodos de ensayo requieran de diferentes esquemas de

---

<sup>8 8</sup> The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 32-NF 27.



validación. Las categorías más comunes de ensayos para las cuales los datos de validación son requeridas se alistan a continuación:

**Categoría I:** Ensayos químicos, con énfasis principalmente en análisis inorgánico, análisis de trazas.

**Categoría II:** Métodos de análisis para la cuantificación de componentes mayores de drogas a granel o ingredientes activos (incluyendo preservantes) en productos farmacéuticos preparados.

**Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en drogas a granel o degradación de componentes en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen Ensayos Cuantitativos y Ensayos Límites.

**Categoría IV:** Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño (p. Ej., disolución, liberación de droga).

**Categoría V:** Ensayos de identificación.

Asimismo, puede ser diferente el trato dado a una sustancia farmacéutica si se trata de su inclusión en la farmacopea o de su registro. Por ejemplo, la robustez es una característica de importancia crítica cuando se trata de la metodología de la farmacopea, pero puede ser menos importante en relación con las especificaciones para la autorización de un fabricante.

**Tabla 2.1. Requerimientos de Validación según la Categoría del Ensayo<sup>9</sup>**

	CATEGORÍA					
	I	II	III		IV	V
			Cuantitativo	Ensayo Límite		
<b>Exactitud</b>	SI	SI	SI	*	*	NO
<b>Precisión</b>	SI	SI	SI	NO	SI	NO
<b>Especificidad</b>	SI	SI	SI	SI	*	SI
<b>Límite de Detección</b>	SI	NO	NO	SI	*	NO
<b>Límite de Cuantificación</b>	SI	NO	SI	NO	*	NO
<b>Linealidad</b>	SI	SI	SI	NO	*	NO
<b>Rango</b>	SI	SI	SI	*	*	NO

*\*Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza del ensayo específico*

**Fuente: USP 32-NF 27**

<sup>9 8</sup> The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 32-NF 27.



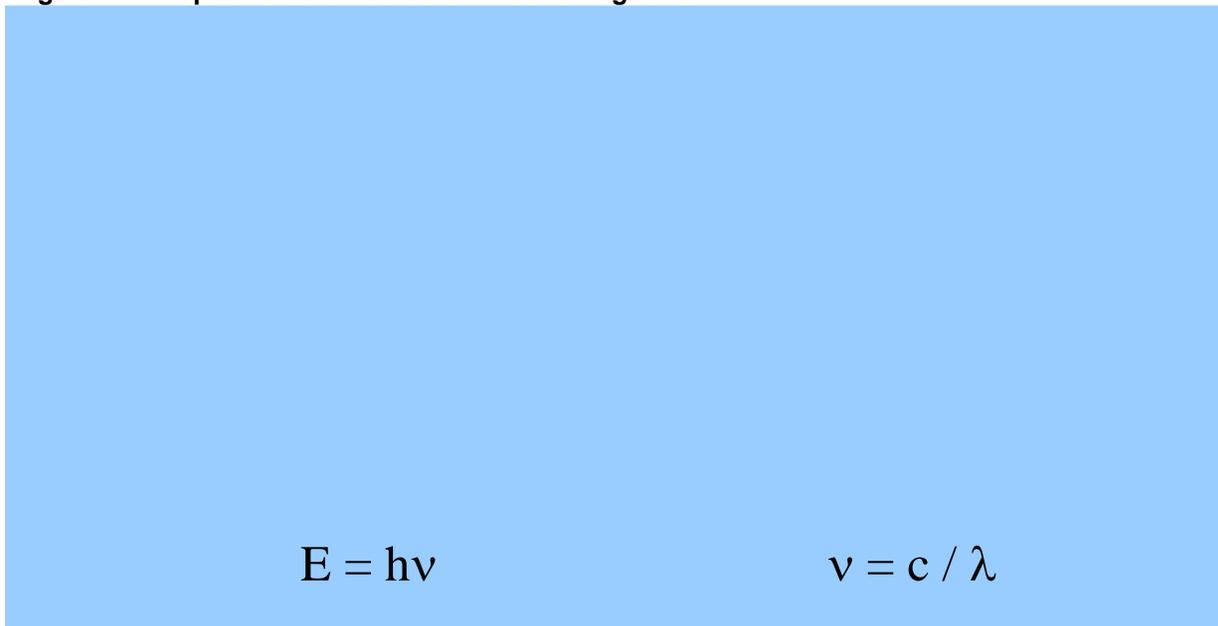
## 2.7. ESPECTRO ELECTROMAGNETICO

Se denomina espectro electromagnético al conjunto de ondas electromagnéticas, o más concretamente, a la radiación electromagnética que emite (espectro de emisión), o absorbe (espectro de absorción) una sustancia. Dicha radiación sirve para identificar la sustancia, es como una *huella dactilar*. Los espectros se pueden observar mediante espectroscopios que, además de permitirnos observar el espectro, permite realizar medidas sobre éste, como la longitud de onda o la frecuencia de la radiación.

Van desde las de menor longitud de onda, como son los rayos cósmicos, los rayos gamma y los rayos X, pasando por la luz ultravioleta, la luz visible y los rayos infrarrojos, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda, como son las ondas de radio. En cualquier caso, cada una de las categorías es de ondas de variación de campo electromagnético.

La tabla siguiente muestra el espectro electromagnético, con sus longitudes de onda, frecuencias y energías de fotón.

**Figura 2. 2. Espectro de la Radiación Electromagnética**



**Fuente: Hewlett Packard fundamentals of modern UV-visible spectroscopy**



## 2.7. 1. FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE<sup>10</sup>

El método que se ha validado en el presente trabajo se fundamenta en el uso de espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-visible), que tiene una larga y continua historia en el campo de la química analítica. Esta técnica esta basada en la medición de absorción de radiación ultravioleta (UV) o visible por determinadas moléculas. La radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas a longitudes de onda características de la estructura molecular de un compuesto.

El fenómeno de absorción esta dirigido o gobernado por leyes, las cuales se denominan leyes de absorción.

La espectrofotometría UV-visible se fundamenta en poseer una fuente de energía radiante cuya potencia depende de las dos lámparas que éste posee para la detección y medida de las muestras. Una de las lámparas esta constituida por deuterio, y se utiliza en la región ultravioleta. Esta región es muy pobre en análisis cualitativos sin embargo es excelente cuantificador, el inconveniente que presenta es la selectividad en cuanto a la determinación de una sustancia específica<sup>6</sup>.

Para la región visible la lámpara esta compuesta de tungsteno y abarca una longitud de onda ente 400 a 800 nm. Esta región es la mas utilizada por los métodos colorimétricos, para análisis cuantitativos de las soluciones de sustancia coloreadas debido a que dichas sustancias absorben energía sólo de la región visible por lo tanto los métodos colorimétricos aprovechan esta propiedad que tienen las sustancias coloreadas para determinar la cantidad de la especie química que absorbe la radiación porque hay una relación cuantitativa entre la concentración de ese componente coloreado y la cantidad de energía absorbida; es decir la cantidad de energía absorbida esta relacionada con la intensidad del color; es una relación directamente proporcional con la concentración de la especie absorbente.

La fuente de energía radiante debe proporcionar un haz de radiación cuya potencia sea suficiente para facilitar la detección y la medición debe y ser estable.

El sistema selector de la longitud de onda es un instrumento que utiliza filtros para obtener bandas de radiación, que abarcan un intervalo limitado de longitud de onda. El espectrofotómetro utiliza un complejo de sistema óptico de selección de longitud de onda, sistema monocromador el cual consta de los siguientes componentes: prismas o rejillas, lentes, espejos, ranuras de entrada y salida; con estos instrumentos se puede seleccionar la longitud de onda continua y en algunos casos con precisión de décimas de nm por lo tanto es posible obtener de forma continua el espectro de absorción de una molécula.

---

<sup>10</sup> Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw-Hill, Madrid, 2001.



## 2.7.2. Parámetros fundamentales de un espectro

- 1 El lugar donde ocurre el fenómeno de absorción que esta indicado por la longitud de onda ( $\lambda$ ), la frecuencia ( $\nu$ ) y el número de onda.
- 2 La intensidad de la absorción de la radiación esta indicada por la absorbencia (A) y la transmitancia (T).

## 2.7.3. Propiedades corpusculares de la radiación electromagnética (R.E.)<sup>11</sup>

Ciertas interacciones de la radiación con la materia requieren que la R.E. sea tratada como paquetes de energía llamados fotones o cuantos.

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Donde h es la constante de Planck,  $h = 6.63 \cdot 10^{-27}$  erg.s

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades. Muchas de las propiedades de la radiación electromagnética se explican convenientemente mediante la *teoría ondulatoria clásica* con parámetros como velocidad, frecuencia, longitud de onda y amplitud. En contraste con otros fenómenos ondulatorios, como el sonido, la R.E. no requiere un medio de transporte para su transmisión, por lo tanto se transmite fácilmente en el vacío.

La teoría ondulatoria para la R.E. no explica completamente los fenómenos asociados con la absorción o la emisión de energía radiante, para estos procesos es necesario considerar la energía radiante como un flujo de partículas discretas de energía llamados *fotones o cuantos*.

Estos dos conceptos se complementan muy bien (dualidad, onda partícula) y se aplican tanto al flujo de electrones como al de otras partículas elementales.

---

<sup>11</sup> <sup>11</sup> Skoog et al.. Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw-Hill, Madrid, 2001.



**TABLA 2.2. PARÁMETROS ONDULATORIOS**

<b>Período (p):</b>	Tiempo necesario para que dos máximos sucesivos de una onda pasen por un punto.
<b>Frecuencia (v):</b>	Número de oscilaciones del campo eléctrico por segundo y es igual 1/p (1 ciclo por segundo = 1 Hertz, Hz). La frecuencia es una magnitud invariable que está determinada por la fuente de radiación.
<b>Velocidad de propagación (V<sub>1</sub>):</b>	Velocidad a la que un frente de onda se desplaza a través de un medio, depende tanto de la densidad del medio como de v. En el vacío la velocidad de la R.E. es independiente de la frecuencia: $C_{\text{vacío}} = 2.997 \times 10^{10} \text{ cm/s} \approx 3.0 \times 10^{10} \text{ cm/s}$
<b>Longitud onda (λ):</b>	Es la distancia lineal entre dos máximos o dos mínimos sucesivos de una onda.
<b>Número de onda:</b>	Se define como el número de ondas por centímetro y es igual a $1/\lambda \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ .

Fuente: Hobart H. et. Al. **Métodos Instrumentales de Análisis Pág.159**

**TABLA 2. 3. Unidades de longitud de onda**

Unidades de λ		
Angstrom Å	10 <sup>-10</sup> m	(rayos X; UV en el vacío)
Nanómetro nm	10 <sup>-9</sup> m	(UV-VIS)
Micrómetro μm	10 <sup>-6</sup> m	(IR)

Fuente: Hobart H. et. **Métodos Instrumentales de Análisis Pág.131**

#### 2.7.4. Recipiente para la muestra en Análisis por Espectrofotometría UV-Visible

La mayor parte de las aplicaciones espectrofotométricas utiliza las muestras en solución líquida, por esta razón se requiere recipientes para colocar la muestra. La celda debe transmitir el 100% de la energía radiante en la zona espectral de trabajo en la región UV las celdas están hechas de cuarzo de 200 a 2000 nm; en la región visible las celdas son hechas de vidrio de 350 a 2000 nm.

La longitud más común para el trabajo en las regiones ultravioleta visible es de 1cm. Las celdas deben construirse con materiales que no absorban la radiación en la región de interés.

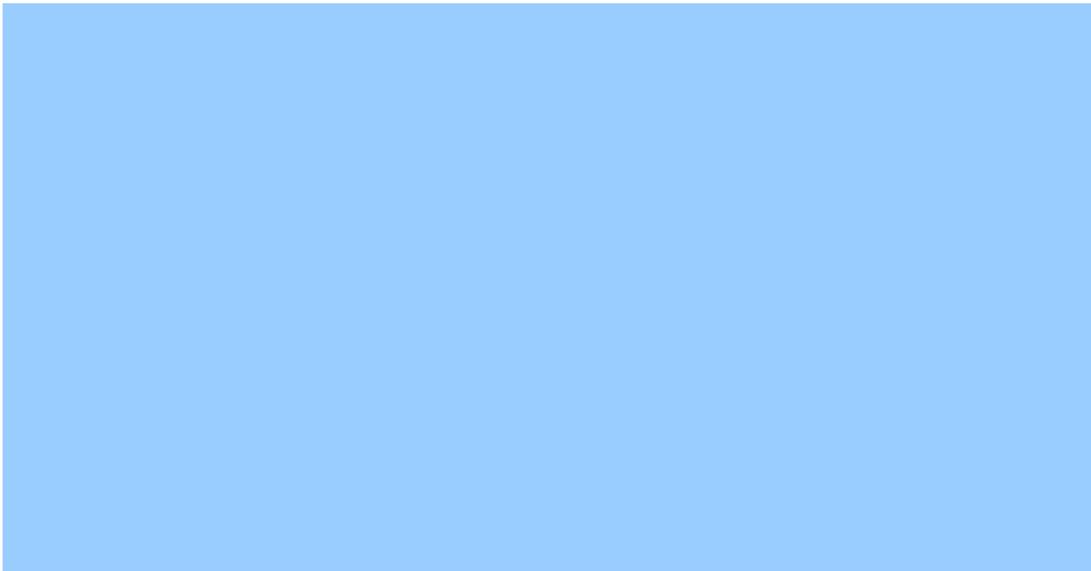
El silicio fundido o el cuarzo son transparentes desde 190 nm en la región ultravioleta hasta cerca de 3 a 4 μm en la región infrarroja. Para obtener buenos datos de absorbancia las celdas deben manejarse por pares. Las celdas deben limpiarse escrupulosamente antes y después de ser utilizadas: se recomienda el uso de ácido nítrico o de agua regia para su limpieza



**2.7.5. Detección de la radiación:** es un dispositivo electrónico llamado transductor que convierte la energía radiante en energía eléctrica

**2.7.6. Procesador de señales e instrumentos de lectura:** dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica en un detector, en este sentido existe una amplia gama de alternativas desde los galvanómetros.

**Figura 2. 3. Esquema de un Espectrofotómetro con arreglo de diodos**



Fuente: Hewlett Packard

## **2.7.7. APLICACIONES DE LAS MEDICIONES DE ABSORCIÓN DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE<sup>12</sup>**

### **2.7.7.1 Especies absorbentes**

La absorción de radiación ultravioleta y visible por una especie M, puede considerarse como un proceso en dos etapas, la primera de las cuales corresponde a la excitación según:



Donde M\* representa la partícula atómica o molecular en su estado electrónico excitado, que se produce como resultado de la absorción del fotón h v. Este estado excitado tiene un breve tiempo de existencia ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  s) y desaparece a través de algunos de los diferentes procesos de relajación (calor).

---

<sup>12</sup> Willard et al. Métodos Instrumentales de Análisis. Editorial Interamericana, México, 2001.



La absorción de la radiación ultravioleta o visible, se produce por lo general como consecuencia de la excitación de los electrones de enlace; debido a esto, la longitud de onda de los picos de absorción se puede correlacionar con los tipos de enlaces existentes en la especie que se estudia.

Las moléculas de una sustancia poseen una *energía relativa dada*, esto es, pueden existir sólo en *niveles de energía fijos*. Ello se debe a una serie de factores, de los cuales son de nuestro interés los siguientes:

- 1) Energía debida a los niveles electrónicos.
- 2) Energía debida a vibraciones entre los átomos que la componen.
- 3) Energía debida a rotación molecular

En la Fig. 2. 4 se presentan las principales transiciones electrónicas que se pueden presentar entre los niveles energéticos de las moléculas; en donde se esquematizan niveles de energía y se observa que la diferencia entre dos niveles electrónicos es siempre mayor que entre dos niveles vibracionales, y ésta a su vez es mayor que entre dos niveles rotacionales

**Figura 2.4. Transiciones electrónicas entre niveles energéticos**



**Fuente: Hewlett Packard**



### 2.7.7.2. Explotación analítica

- Identificación proximal de los grupos funcionales en una molécula.
- Método bastante selectivo para el análisis cuantitativo de compuestos cuyos enlaces producen absorción.

Conviene considerar tres tipos de transiciones electrónicas que permiten explicar porqué algunas especies pueden absorber energía radiante. Estos tres tipos son:

- Los electrones  $\pi$ ,  $\sigma$  y  $\eta$ .
- Los electrones d y f.
- Los electrones de transferencia de carga.

#### a) Especies químicas absorbentes que contienen electrones $\pi$ , $\sigma$ y $\eta$

La absorción de radiación ultravioleta y visible (200–800 nm) se restringe a un número limitado de grupos funcionales, llamados *cromóforos*, que contienen electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas.

**Tabla 2. 4. Características de absorción de algunos cromóforos comunes**

Cromóforo	Ejemplo	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$	Tipo de transición
Alqueno	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	n-Heptano	177	13,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alquino	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$	n-Hexano	178	10,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2,000	-
			225	160	-
Carbonilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	n-Heptano	186 280	1,000 16	$\pi \rightarrow \sigma^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$
	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	n-Hexano	180	larga	$\pi \rightarrow \sigma^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$
Carboxilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	Etanol	204	41	$\pi \rightarrow \pi^*$
Amido	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	Agua	214	60	$\pi \rightarrow \pi^*$
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	Etanol	339	5	$\pi \rightarrow \pi^*$
Nitro	$\text{CH}_3\text{NO}_2$	Isooctano	280	22	$\pi \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	Éter etílico	300	100	-
			665	20	$\pi \rightarrow \pi^*$
Nitrato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	Dioxano	270	12	$\pi \rightarrow \pi^*$

Fuente: Dyer J. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción de Compuestos Orgánicos. Editorial Prentice/Hall Internacional., España, 1973.



### b) Absorción en la que participan los electrones d y f

- Iones de los metales de transición
- Serie de los lantánidos y actínidos

Los iones y complejos de los 18 elementos de las dos primeras series de transición son coloreados en uno de sus estados de oxidación o en todos ellos. Dependiendo las características colorimétricas del complejo; del tipo de ligando (agente complejante) y del estado de oxidación.

**Tabla 2.5. Efecto de los ligandos sobre los máximos de absorción asociados con transiciones d-d**

$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) para los ligandos indicados	Aumento de fuerza del campo de unión				
	6Cl	6H <sub>2</sub> O	6NH <sub>3</sub>	3en(1)	6CN-
Cr (III)	736	573	462	456	380
Co (III)	-	538	435	428	294
Co (II)	-	1345	980	909	-
Ni (II)	1370	1279	925	863	-
Cu (II)	-	794	663	610	-

(1) en = etilendiamina, un ligante bidentado.

Fuente: Dyer J. *Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción de Compuestos Orgánicos*. Editorial Prentice/Hall Internacional., España, 1973.

### c) Absorción por transferencia de carga

Para fines analíticos es el tipo más importante de absorción por especies inorgánicas, debido a que las absorptividades molares de los picos son muy grandes ( $\epsilon < 10^5$ ). Esta es una particular característica de los complejos inorgánicos denominados también, complejos de transferencia de carga.

Ejemplos:

- Hierro III- ion tiocianato
- Hierro II - (o-Fenantrolina)
- Ion triyoduro I<sub>3</sub><sup>-</sup>

**2.7.7.3. Técnicas cualitativas.** Las aplicaciones cualitativas no ofrecen una herramienta muy útil, ya que con estos espectros existe un número relativamente escaso de máximos y mínimos. Sin embargo el análisis cualitativo es una excelente herramienta cuando va precedido de algún método de separación.



#### 2.7.7.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO<sup>13</sup>

**Tabla 2.6. Clasificación de sustancias que se pueden analizar por Espectrofotometría UV-Visible**

<b>Compuestos orgánicos:</b>	<b>Aldehídos y cetonas</b>
	Aromáticos
	Drogas
	Vitaminas, etc....
<b>Compuestos inorgánicos: (especies absorbentes)</b>	
Compuestos no absorbentes → Derivatización	
(Por ej.: formación de complejos coloreados).	

**Fuente:** Dyer J. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción de Compuestos Orgánicos. Editorial Prentice/Hall Internacional., España, 1973.

#### Principales características:

- 1 Alta sensibilidad.
- 2 Absortividades molares  $\epsilon \approx 10^5$
- 3 Intervalos de concentración  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  M.
- 4 Selectividad: selección de la longitud de onda en la que el único componente absorbente de una muestra sea la sustancia que se determina
- 5 Precisión y exactitud: dependiendo del nivel de concentración es posible lograr valores menores que 1% de error relativo.

#### 2.7.7.5. Medidas cuantitativas de la radiación - Ley de Beer<sup>14</sup>

**La ley de la Lambert – Beer** relaciona la cantidad de luz absorbida ( $I_e$ ) con la concentración del componente absorbente que establece lo siguiente: La absorción de la luz monocromática es directamente proporcional al espesor de la lámina y a la concentración del componente coloreado se denomina absorbancia a la que indica la intensidad de luz monocromática absorbida

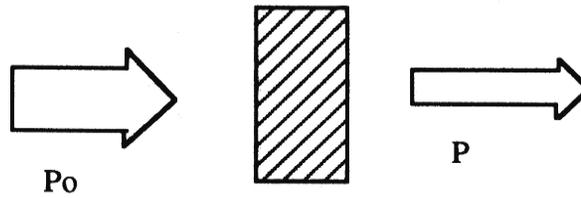
La Figura 2. 5 esquematiza el fenómeno de absorción, aquí un haz de radiación monocromático, pasa a través de una capa de solución de  $b$  cm de espesor y que contiene una especie molecular absorbente cuya concentración es  $c$ .

<sup>13</sup> Dyer J. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción de Compuestos Orgánicos. Editorial Prentice/Hall Internacional., España, 1973.

<sup>14</sup> Bermejo F. Química Analítica General, Cuantitativa e instrumental. Editorial Paraninfo, Madrid 1991.



**Figura 2.5. Fenómeno de absorción**



Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, la potencia del haz disminuye de  $P_0$  a  $P$ . Por lo tanto la transmitancia  $T$  de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida (o no absorbida) por la solución según:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \%T = 100 \frac{P}{P_0}$$

Según la Ley de Beer, entonces, la absorción  $A$  estará determinada por:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \log_{10} T = \xi \cdot b \cdot c$$

Donde:

$\xi$ : Absortividad molar

$b$ : Longitud de paso óptico

$c$ : Concentración en moles/l

#### **2.7.6.6. Medición experimental de la absorción**

Según vimos en el esquema anterior la absorción es directamente proporcional a la longitud ( $b$ ) de la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración ( $c$ ) de la especie absorbente:  $A = a \cdot b \cdot c$  (con  $a$ : constante de proporcionalidad).

Si  $c$  se expresa en moles por litro y  $b$  en cm, entonces la absortividad se denomina *absortividad molar* ( $\xi$ ):  $A = \xi \cdot b \cdot c$ .

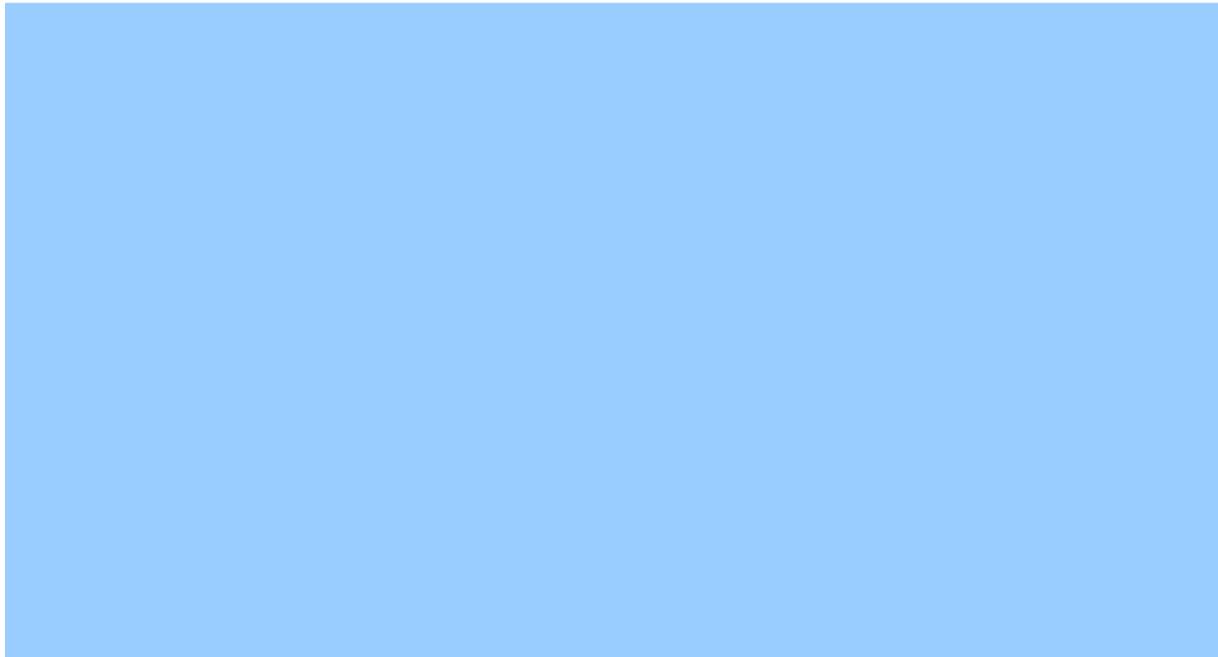


La Ley de Beer se cumple igualmente en soluciones que contienen más de una especie absorbente, siempre que no haya interacción entre dichas especies. Por tanto, para un sistema multicomponente la relación será:

$$\begin{aligned} A_T &= A_1 + A_2 + \dots + A_n \\ A_T &= \epsilon_1 b c_1 + \epsilon_2 b c_2 + \dots + \epsilon_n b c_n \end{aligned}$$

La Figura 2.6 ilustra el caso del análisis de dos componentes cuyos espectros de absorción se traslapan.

**Figura 2.6. Análisis de dos componentes por Espectrofotometría UV-Visible**



**Fuente: Hewlett Packard.**



### 2.7.7.7. Limitaciones a la aplicabilidad de la Ley de Beer

Se observan frecuentemente desviaciones de la proporcionalidad entre A y c (cuando b es constante). Algunas de estas desviaciones son importantes y representan limitaciones reales de la ley. Estas son de tipo:

- 1 Químico;
- 2 Instrumental.

#### a) *Desviaciones químicas*

Cuando las especies absorbentes experimentan asociación, disociación o reacción con el solvente originan productos con características absorbentes distintas de las del analito.

#### b) **Tabla 2.7. Desviaciones instrumentales**

<b>Radiación policromática:</b>	El requisito básico para el cumplimiento de la Ley de Beer es que la radiación incidente, sobre la especie absorbente, sea <i>monocromática</i> . Dependiendo de las características tecnológicas del sistema óptico del instrumento será más o menos accesible poder utilizar en forma práctica una radiación limitada a una sola longitud de onda.
<b>Radiación dispersa:</b>	La radiación dispersa suele diferir considerablemente en longitud de onda con respecto a la radiación principal; además puede alcanzar el detector sin haber pasado a través de la muestra.

La Ley de Beer es sólo aplicable a soluciones en las que las interacciones dependientes de la concentración de las moléculas o iones son mínimas. Solo es adaptable para luz monocromática y las soluciones utilizadas para el análisis en teoría no deben tener concentraciones inferiores a 0.01 M (moles / litros) aunque en la práctica se trabaja sin problemas a concentraciones mas bajas Concentraciones “altas” alteran las Absortividades molares y por lo tanto conducen a una relación no lineal entre Absorbancia y la concentración.

La presentación gráfica en un eje de coordenadas de la absorbancia (ordenas) frente a las concentraciones (en el eje de abscisas) se denomina curva de calibración.

Así se construye la curva de calibración, que debe ser una recta, presentando las concentraciones frente a las absorbancia gráficamente.



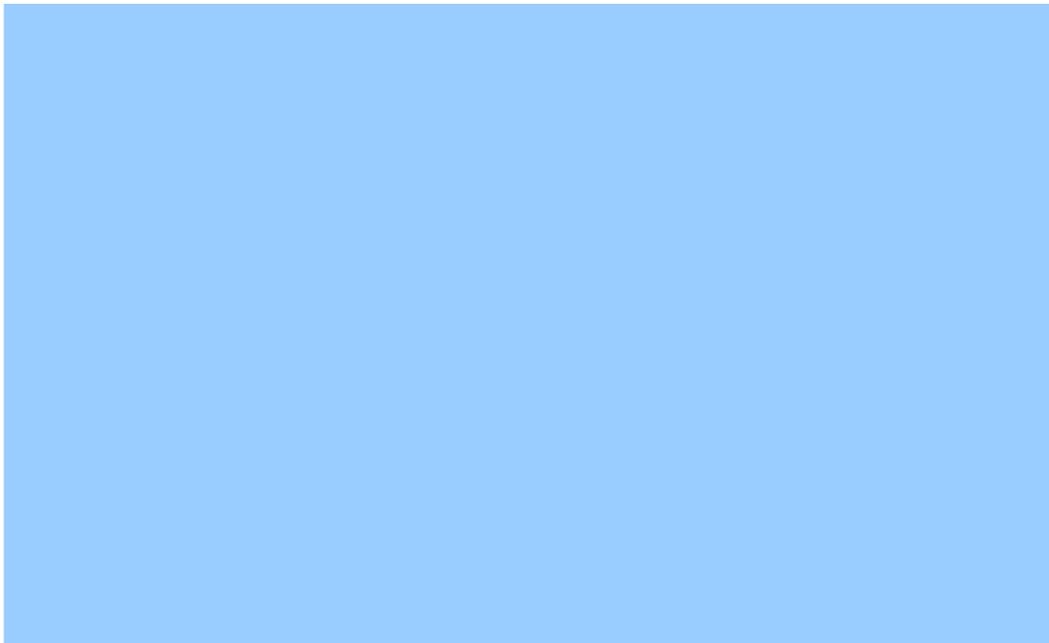
De este modo para calcular la concentración de una muestra problema solo tenemos que hallar la absorbancia de la solución problema y extrapolarla en la curva de calibrado, partiendo de la ecuación  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$  por lo tanto la recta de calibración toma la forma algebraica de  $y = a + b \cdot x$

Esta técnica solo es válida si la muestra cumple la ley de Lambert Beer y las soluciones estándar y los problemas son leídas en las mismas condiciones.

En las determinaciones espectrofotométricas se cumple la ley de Lambert Beer cuando la curva de calibrado sigue la llamada linealidad que es el intervalo de concentraciones de la muestra entre la cual existe una relación lineal entre concentración y absorbancia

La Figura 2.7 ilustra el cumplimiento de la Ley de Lambert y Beer.

**Figura.2.7. Ley de Lambert-Beer**



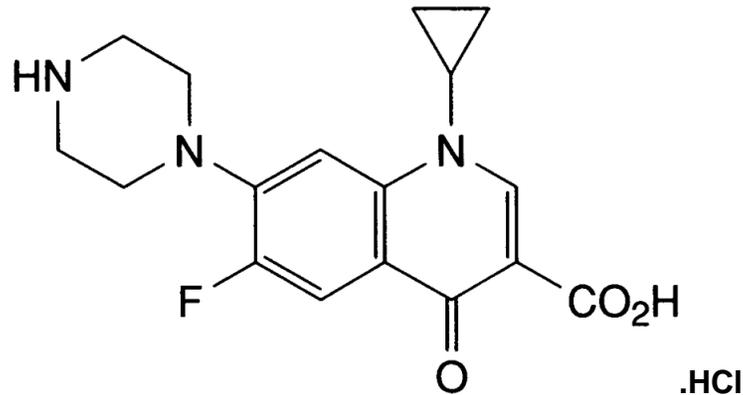
$$A = -\log T = -\log(I / I_0) = \log(I_0 / I) = \epsilon \cdot b \cdot c$$

**Fuente: Hewlett Packard.**



## 2.8. PROPIEDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO Y DE LAS TABLETAS DE CLORHIDRATO DE CIPROFLOXACINA<sup>515</sup>

### 2.8.1. PRINCIPIO ACTIVO (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)



#### Especificación de pureza:

La Ciprofloxacina contiene no menos del 98 % y no más de 102% de C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. Con respecto a su almacenamiento; se debe preservar en contenedores cerrados a 25°C evitando calores excesivos

#### Pruebas de identificación

- A. Espectro de absorción infrarrojo
- B. Cromatografía de capa fina
- C. Una solución de principio activo debe responder al ensayo para cloro (191)

**pH (791):** Entre 3 y 4,5 en una solución uno en 40.

**Agua:** Entre 4,7% y 6,7 %.

**Residuo de ignición (281):** No más del 1%

**Sulfato (221).** Una porción de 375 mg no debe de evidenciar mas sulfato que el correspondiente a 0,15 ml de acido sulfúrico 0,02 N (0,04%).

**Metales Pesados, método II (231):** No más de 0,002%

<sup>15 8</sup> The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 32-NF 27.



## 2.8.2. TABLETAS

### Identificación

- 1 El tiempo de retención (HPLC) del pico mayor en cromatograma del ensayo corresponde al del cromatograma del estándar.
- 2 Se coloca un número de tableta equivalentes a 1500 mg de Ciprofloxacina en un frasco adecuado, conteniendo alrededor de 750 ml de agua y se somete al microondas alrededor de 20 minutos diluyendo con agua a 1000 ml y mezclando.
- 3 Centrifugar una porción de la suspensión anterior, usando el líquido sobrenadante obtenido como solución de ensayo. Disolver una cantidad de clorhidrato de Ciprofloxacina USP en agua para obtener una solución estándar conteniendo 1,5mg/L. Proceder como se indica para el ensayo B de identificación en el ensayo para clorhidrato de Ciprofloxacina.

**Especificaciones:** Las tabletas de Ciprofloxacina deben contener no menos del 90,0% y no más 110,0% de la cantidad declarada de principio activo<sup>5</sup>.

### Ensayo de disolución (711):

- 1 Medio: HCl 0.01 N 900 ml
- 2 Aparato 2: 50 revoluciones por minutos
- 3 Tiempo: 30 minutos

**Procedimiento para evaluar la disolución:** Determinar la cantidad de clorhidrato de Ciprofloxacina disuelta empleando absorción ultra violeta y longitud de onda de máxima absorción de 276 nm en porciones filtradas para la solución del ensayo, diluidas adecuadamente con el medio de disolución si es necesario en comparación con una solución conteniendo una concentración conocida de clorhidrato de Ciprofloxacina en el mismo medio.

**Tolerancia de la Disolución:** una cantidad de clorhidrato de Ciprofloxacina equivalente a no menos del 80%(Q) de la cantidad declarada de Ciprofloxacina se debe disolver en 30 minutos.

**Uniformidad de contenido:** Se realiza de acuerdo a los requerimientos especificados en la sección 905 de la farmacopea USP32 –NF27.



### **III. APARTADO**

#### **3. HIPOTESIS**

El método espectrofotométrico para la determinación de la Ciprofloxacina es selectivo, preciso y exacto, tiene un adecuado rango de linealidad con una recta de regresión lineal que presenta una correlación estadísticamente significativa, una pendiente que se diferencia significativamente de cero, un intercepto que no se diferencia significativamente de cero, límites de detección y de cuantificación adecuados para la determinación del analito en la matriz de trabajo, así como una excelente robustez (no es muy sensible a pequeñas variaciones de las condiciones de determinación).



## IV. APARTADO

### 4. 1. DISEÑO METODOLOGICO

**Tipo de estudio:** Experimental, descriptivo.

**Área de estudio:** El estudio se llevó a cabo en el área de Control de Calidad del Laboratorio Bengoechea, ubicado en la ciudad de Managua, costado sur de la Rotonda Centro América.

**Población de estudio:** Lotes de 100,000 tabletas.

**Muestra:** 100 tabletas para la validación de cada parámetro.

**Unidad de análisis:** Tabletas de Ciprofloxacina clorhidrato de 500 mg de un Lote específico # 2329.

**Método de recolección:** Las tabletas fueron proporcionadas por el área de producción del laboratorio Bengoechea, a las cuales se aplica el método de análisis de espectrofotometría UV-VIS.

**Procedimiento:** El estudio se realizó de forma coordinada con el Director de Aseguramiento de la Calidad y el Responsable de Control de Calidad del Laboratorio Bengoechea, siguiendo el flujograma de procedimientos desarrollados para tal fin.

**Plan de análisis:** El análisis de datos se realizó haciendo uso de Hojas de Cálculo de Excel diseñadas específicamente para tal fin, presentando la información obtenida a través de cuadros y gráficos.



**Tabla 4.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES:**

<b>VARIABLE</b>	<b>CONCEPTO</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>SELECTIVIDAD</b>	Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra.	Se espera una correspondencia entre los espectros del estándar y la muestra en el intervalo de longitudes de onda de máxima absorción.
<b>PRECISION</b>	La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos obtenidos de una misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.	El coeficiente de Variación de los resultados, tanto para los datos correspondientes a la Repetibilidad como para la precisión Intermedia no debe ser mayor de 5%.
<b>Límite de detección y Límite de cuantificación</b>	<b>LD</b> es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y veracidad aceptables	El límite de detección y de cuantificación de un método representan una medida de la sensibilidad del mismo mientras más bajos sean los valores obtenidos para ambos parámetros el método investigado tendrá mayor sensibilidad.



VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES
<b>Linealidad</b>	la linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un ámbito dado) de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ C.V. de la pendiente <math>\leq 5\%</math>.</li><li>✓ <math>r \geq 0,995</math>.</li><li>✓ <math>R^2 \geq 0,998</math>.</li><li>✓ <math>t_{reg} \gg t_{tab}</math>.</li><li>✓ <math>t_{int} &lt; t_{tab}</math>.</li><li>✓ <math>T_{pend} &gt; t_{tab}</math>.</li></ul>
<b>Exactitud</b>	La exactitud expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado, estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto numero de veces.	Se compara a través de un ensayo de hipótesis de t de student el promedio de las concentraciones obtenidas en condiciones de recuperación por adiciones conocidas con la concentración adicionada. Si t experimental es menor que t de tabla, el método no presenta error sistemático y, por tanto, puede asegurarse que es exacto.

Fuente: Grupo de Trabajo (Gisela García, Bianka Gutiérrez)



### 4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA GENERAL)

#### PARAMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO A EVALUAR

Los parámetros de desempeño del método que se seleccionaron fueron los siguientes:

**Tabla. 4.2.**

Especificidad	✓
Linealidad	✓
Exactitud	✓
Precisión	✓
Límite de Cuantificación	✓
Límite de Detección	✓
Intervalo	✓

**Fuente Grupo de Trabajo (Gisela García, Bianka Gutiérrez)**

**Especificidad:** La especificidad del método se estableció mediante la comparación de los espectros y el reporte de su correspondiente pureza de la muestra. La evaluación de la especificidad del sistema se realizó mediante el software del equipo, trabajándose con la solución estándar y la muestra.

**CRITERIO DE DECISION PARA LA SELECTIVIDAD:** Se espera una correspondencia entre los espectros del estándar y la muestra en el intervalo de longitudes de onda de máxima absorción, sin evidencias de absorciones parásitas a la longitud de onda de trabajo.

**Linealidad:** La linealidad es la capacidad de un ensayo para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en una muestra. Fueron preparadas cinco réplicas de la muestra, conteniendo **cinco niveles de concentración** de principio activo. La señal analítica fue determinada en cinco réplicas. La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado. La curva de calibración obtenida a partir de estas medidas fue analizada por medio de regresión lineal, calculándose el coeficiente de correlación y de determinación, así como la ecuación de la recta y los parámetros de dispersión del sistema.

Además de la prueba estadística de linealidad se practicaron ensayos de hipótesis tanto para el Intercepto como para la pendiente para establecer su validez estadística.



### CRITERIOS DE DECISIÓN PARA LA LINEALIDAD:

$$\Rightarrow t_{\text{reg}} \gg t_{\text{tab}}$$

$$\Rightarrow t_{\text{int}} < t_{\text{tab}}$$

$$\Rightarrow t_{\text{pend}} > t_{\text{tab}}$$

**Exactitud:** La exactitud es el grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con el método y el contenido real del analito en la muestra. La exactitud del método se evaluó en términos de la recuperación. Se prepararon seis muestras enriquecidas a dos niveles (bajo, y alto en relación a la concentración de cuantificación). Estas muestras se trataron igual que las muestras normales y los estándares antes de obtener la correspondiente señal analítica. Se realizó el ensayo de hipótesis estadístico de t de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren estadísticamente a un nivel de confianza establecido y con los grados de libertad que correspondan.

**CRITERIO DE DECISIÓN PARA LA EXACTITUD:** Si  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ , el método analítico desarrollado tiene la exactitud requerida, y ambos valores no son estadísticamente diferentes. Mientras que, si  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$  significa que el método analítico no es exacto y que existe un error sistemático por defecto o por exceso que en valor absoluto es  $|\mu - x_{\text{med}}|$ , donde  $\mu$  representa el valor verdadero o esperado de concentración del analito.

**PRECISIÓN:** La precisión fue verificada evaluándose las condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. Se estudió sobre el sistema, evaluando la dispersión de 6 determinaciones por cada uno de los niveles de concentración de los estándares del principio activo cuantificado. La evaluación correspondió a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por el instrumento, obteniéndose las señales analíticas de las soluciones en un mismo día bajo las mismas condiciones de trabajo, el mismo equipo, las mismas soluciones reactivas y el mismo analista ( $n = 12$ ) para la repetibilidad. Las mediciones se realizaron también en dos días diferentes ( $n = 12$ ) sin variación del resto de condiciones para evaluar la precisión intermedia. Se determinó el Coeficiente de Variación (CV) y se aplicó la prueba de ANOVA de clasificación simple para evaluar las varianzas interdía.

**CRITERIO DE DECISIÓN PARA LA PRECISIÓN:** El coeficiente de Variación de los resultados, tanto para los datos correspondientes a la Repetibilidad como para la precisión *Intermedia* no debe ser mayor de 5%.



**Límite de detección y de Cuantificación.** Los Límites de Detección y de Cuantificación de un método representan una medida de la sensibilidad del mismo. En un método analítico sensible, ligeros incrementos de concentración resultan en incrementos notables de la señal o respuesta analítica. La determinación de los Límites de Detección y de Cuantificación se realizó sobre los resultados obtenidos tanto para la evaluación de la linealidad del método como para la evaluación del sistema. Tanto el límite de detección como el de cuantificación se calcularon utilizando el criterio de Miller que relaciona la varianza residual con el valor de la pendiente.

**CRITERIO DE DECISION PARA LÍMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION:** Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación se comprobaron experimentalmente mediante el análisis repetitivo de 10 muestras de dos soluciones preparadas a las concentraciones obtenidas, evaluando los resultados mediante Análisis de Varianza.

### **Evaluación de Robustez**

La solidez de un método analítico es determinada mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, usando condiciones operacionales y ambientales que puedan ser diferentes pero que estén dentro de las especificaciones de los parámetros de ensayo. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es entonces determinado como una función de las variables del ensayo. Esta reproducibilidad puede ser comparada con la precisión del ensayo bajo condiciones normales para obtener una medida de la solidez del método analítico.

### **Establecimiento de la Idoneidad del Sistema**

Si las mediciones son susceptibles de variación en las condiciones analíticas, éstas deben ser controladas adecuadamente o las precauciones necesarias deben ser incluidas en el método. Una consecuencia de la evaluación de la solidez y la robustez debe ser el establecimiento de una serie de parámetros adecuados para asegurar que la validez del método analítico se mantiene a través de su uso. Variaciones típicas son la estabilidad de las soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas.



#### **4.4. MATERIALES**

##### **Reactivos:**

- 1 Acido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- 2 Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- 3 Acido sulfúrico
- 4 Acido nítrico
- 5 Agua destilada

##### **Estándares y muestras:**

- 1 Principio activo cuantificado de Ciprofloxacina.
- 2 Tabletas de Ciprofloxacina producidas por laboratorios Bengoechea con un número de lote determinado.

##### **Equipos instrumentales:**

- 1 Espectrofotómetro con arreglo de diodos, AGILENT, MODEL 8453
- 2 Balanza analítica SARTORIUS-
- 3 Agitador magnético, FISHER SCIENTIFIC.
- 4 pH-metro. FISHER SCIENTIFIC; ACCUMET, APG1
- 5 Agitador magnético y magneto
- 6 Cronómetro.
- 7 Calculadora Casio FX 350.
- 8 Laptop, HP.

##### **Tipo de cristalería:**

- 1 Vidrio pyrex® USA
- 2 Bureta calibradas de 25.0 y 50.0 ml.
- 3 Probetas calibradas de 50.0 y 100.0 ml.



- 4 Balones calibrados de 50.0ml, 100.0 ml y 1000.0 ml.
- 5 Pipetas volumétricas de 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml
- 6 Beakers de 25.0 100.0 y 250.0 ml.
- 7 Mortero y pilón uno de cada uno
- 8 Espátula
- 9 Soporte

## 4.5. Metodología Analítica

### 1 Preparaciones de los Reactivos

Para realizar los parámetros de validación se procedió en primera instancia ha preparar los reactivos a utilizar durante el proceso.

**HCl 0,1 N.** Transferir 7,90 ml de HCl concentrado (12,73 N) a un balón de 1000,0 ml llevándolo hasta la marca de aforo con agua destilada.

### Cuantificación

#### Preparación de Estándares

**Solución Stock.** Pesar exactamente 20,0 mg de Ciprofloxacina base, tomando en cuenta el grado de pureza y el factor de conversión de la forma base a clorhidrato (1,16). Transferir a un balón 100 ml aforando hasta su marca y llevar a volumen con HCl 0.1 N (Concentración de principio activo 200,0 µg/ml).

**Estándares de lectura.** Se tomaron las alícuotas indicadas en la primera columna de la tabla 4.3 de la solución Stock para obtener las concentraciones de trabajo correspondientes a la segunda columna. Para lograr esto el polvo se disolvió de forma homogénea y completamente, fue agitado durante 3 minutos haciéndose uso de un agitador magnético, seguidamente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda de 277 nm, después de filtrar gravimétricamente a través de papel Wathman No. 1.



**Tabla 4.3. Preparación de soluciones de estándares de lectura**

<b>Alícuota de Solución Stock (ml)</b>	<b>Concentración final (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
1	2,0
2	4,0
3	6,0
4	8,0
5	10,0

**Fuente: Grupo de Trabajo (Gisela García, Bianka Gutiérrez)**

### **Preparación de la muestra**

Se tomó del lote 2329 dos blister que contenían 10 tabletas cada uno de Ciprofloxacina básica de 500 mg, se pesó de forma individual cada tableta, se calculó el peso promedio el cual fue de 827,18 mg, obteniendo una desviación estándar de 0,0114, una vez realizado esto se hicieron las pruebas de friabilidad así como el porcentaje de dureza.

Se continuó a la trituration de las tabletas obteniendo un polvo suficientemente fino para garantizar el equivalente a 20,0 mg de principio activo tomando en cuenta su peso promedio, así como los miligramos declarados por la tableta. Seguido de este proceso el polvo equivalente es transferido a un balón de 100ml llevándolo a la marca de aforo con HCl 0,1N la solución fue agitada durante tres minutos haciendo uso del agitador magnético, de esta solución se tomaron 3ml y fueron transferidos a un balón de 100,0 ml, aforando hasta la marca de aforo con HCl 0,1N procediendo a leer en el espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 277 nm.

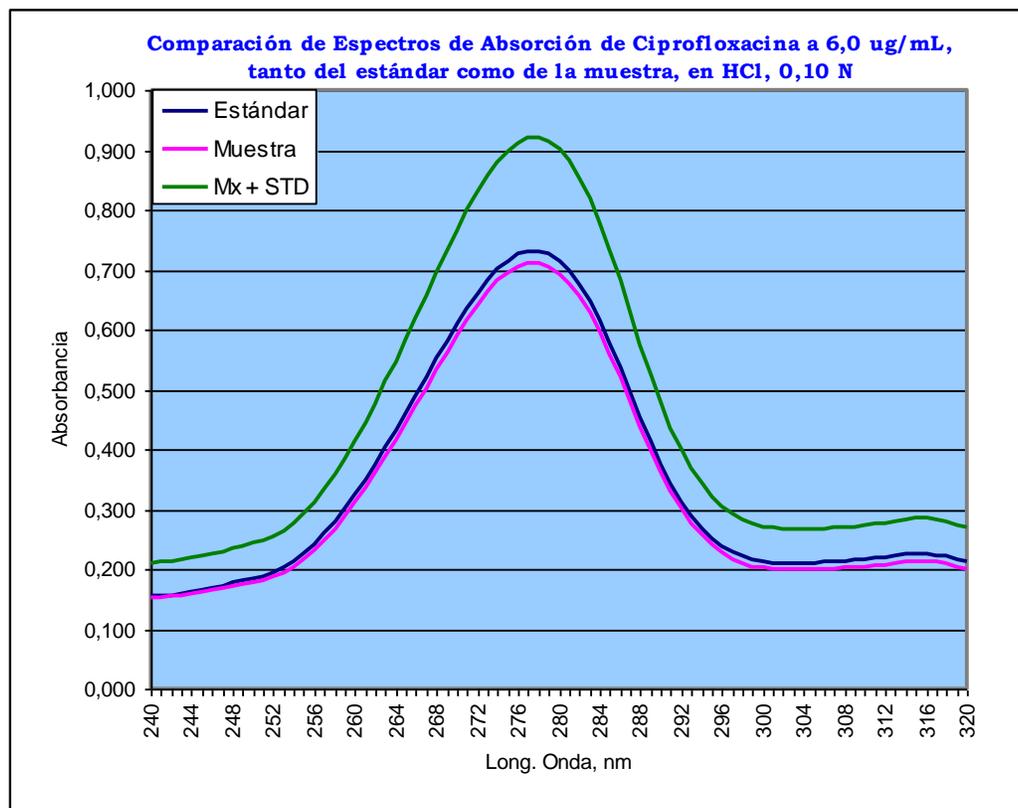


## 4.6. RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

### 4.6.1. SELECTIVIDAD DEL METODO

El primer parámetro que se evaluó es el de la selectividad o especificidad del método. Esta se estableció mediante la comparación de los espectros de la muestra y un estándar de concentración similar a la obtenida con la muestra. Al mismo tiempo se realizó una adición o enriquecimiento de la muestra con estándar, graficándose los espectros obtenidos. Los resultados reflejados en la figura 4.1 indican que hay una total correspondencia de los espectros en la zona de máxima absorción y que no hay ninguna evidencia de influencia de la matriz en el espectro de absorción.

Figura 4.1.



La evaluación de la selectividad se realizó mediante el software del equipo como se muestra en la figura 4.1 donde se observa una correspondencia entre la absorbancia de la muestra y del estándar a una misma longitud de onda.



#### 4.6.2. Linealidad del Método

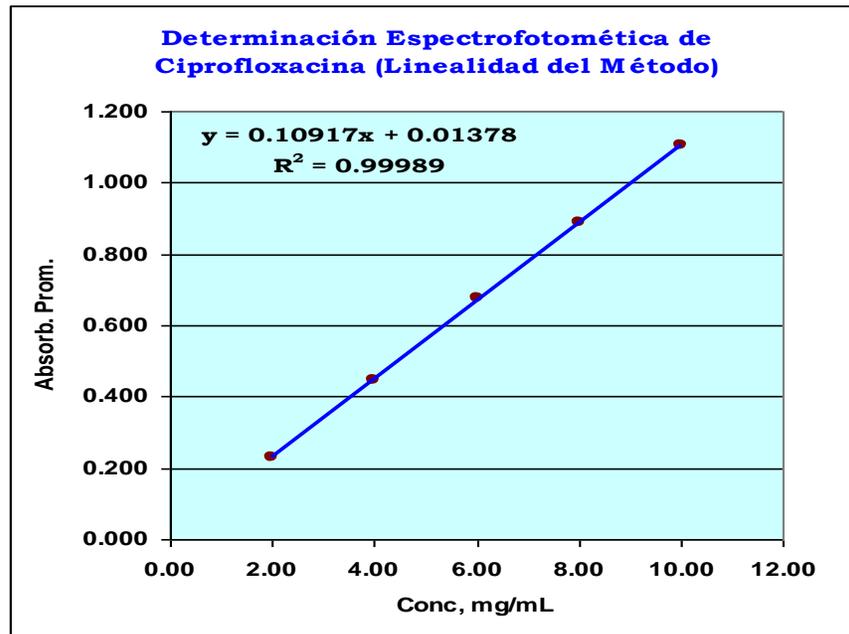
Se elaboraron cinco curvas de calibración con los estándares, en distintos momentos, llevando a cabo todas las operaciones desde el inicio en su totalidad, para evaluar la Variabilidad del Método. La evaluación de la variabilidad de la pendiente permitió obtener un valor de Coeficiente de Variación 1,98% con un intervalo de confianza de 0,0020 mg/ml. La curva de calibración promedio (Figura 4.2) se obtuvo graficando la señal analítica promedio de las cinco curvas contra las concentraciones estándar (2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml). El método es lineal con un valor de r: 0.9999 y de R<sup>2</sup> 0.99989

**Tabla 4.4. Evaluación de la Linealidad del Método en la determinación de Ciprofloxacina espectrofotométricamente**

Conc., µg/ml	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	PROM
2.00	0.2386	0.2491	0.2204	0.2172	0.2293	0.2309
4.00	0.4550	0.4526	0.4429	0.4457	0.4436	0.4480
6.00	0.6835	0.6668	0.6615	0.6808	0.6827	0.6751
8.00	0.9077	0.8755	0.8866	0.8843	0.8816	0.8872
10.00	1.1174	1.0948	1.1077	1.1008	1.0945	1.1030
<b>Intercepto</b>	0.0174	0.033	-0.002	0.004	0.016	0.0138
<b>Pendiente</b>	0.111	0.106	0.111	0.110	0.108	0.109
<b>Coef. Correl.</b>	0.9999	0.9999	1.0000	0.9997	0.9996	0.9999
<b>Coef. Determ.</b>	0.9998	0.9998	1.0000	0.9994	0.9992	0.9998
<b>Error Típico</b>	0.0056	0.0046	0.0016	0.0104	0.0108	0.0042
	<b>VARIABILIDAD DE LA PENDIENTE</b>					
	<b>PROM</b>	<b>S</b>	<b>CV, %</b>	<b>Int. Conf.</b>		
	0.109	0.002	1.98	0.002		



**Figura: 4.2.**



El criterio de linealidad que se estableció fue  $r \geq 0.9950$  y  $R^2 \geq 0.990$ . La evaluación estadística indica que existe una regresión válida entre las variables concentración y la señal analítica.

**Tabla 4.5. Evaluación Estadística de la Linealidad del Método en la Determinación Espectrofotométrica de la Ciprofloxacina**

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	Conclusión
Coeficiente de Correlación.	$r \geq 0.995$	0.9999	Cumple
Coeficiente de Determinación	$R^2 \geq 0.99$ .	0.9989	Cumple
Regresión, Hipótesis nula	$t_{reg} > t_{tabla}$	$t_{reg} = 164,27$	Cumple
Intercepto, Hipótesis nula	$t_{exp} < t_{tabla}$	$t_{exp} = 3,13$	Cumple
Pendiente, Hipótesis nula	$t_{exp} > t_{tabla}$	$t_{exp} = 164,27$	Cumple



### 4.6.3. Linealidad del Sistema

La evaluación de la linealidad del sistema se llevó a cabo utilizando la muestra real, la cual se cuantificó previamente en relación al contenido de principio activo y luego se prepararon cinco soluciones, tomando en consideración la concentración encontrada de principio activo, a concentraciones de 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 6,0 µg/ml, 8,0 µg/ml y 10,0 µg/ml partiendo de una solución madre haciendo todas las etapas de forma independientes para cada curva y para cada punto.

Los resultados del procesamiento estadístico indicaron que para este intervalo de concentraciones se obtiene un coeficiente de correlación de  $r = 0,9999$  siendo el valor mínimo admisible 0.9950; y un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9999$ , lo que establece una buena regresión entre las variables concentración y sus respuestas.

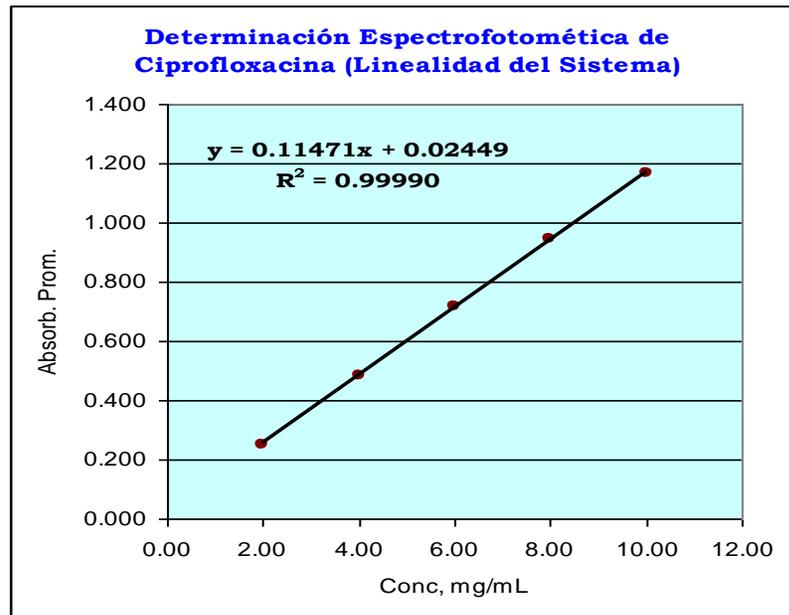
Para confirmar la Linealidad de dicha regresión, se aplicó un ensayo de hipótesis de regresión (test de Student), de acuerdo con el cual debe cumplirse que el valor de  $r_{\text{regresión}}$  debe ser mayor al valor de  $t_{\text{tabla}}$  con una probabilidad de cometer error de  $p = 0,05$  y  $n-2$  grados de libertad. También se demostró la validez estadística del intercepto y la pendiente con los ensayos de hipótesis correspondientes.

**Tabla 4.6. Evaluación Estadística de la Linealidad del Sistema en la Determinación Espectrofotométrica de la Ciprofloxacina**

Conc., µg/ml	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	PROM
2.00	0.2555	0.2627	0.2379	0.2467	0.2574	0.2520
4.00	0.4961	0.4763	0.4785	0.4655	0.4918	0.4817
6.00	0.7268	0.7361	0.7014	0.7022	0.7292	0.7191
8.00	0.9565	0.9343	0.9233	0.9440	0.9509	0.9418
10.00	1.1860	1.1709	1.1571	1.1495	1.1818	1.1691
<b>Intercepto</b>	0.0278	0.034	0.015	0.016	0.030	0.0245
<b>Pendiente</b>	0.12	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11
<b>Coef. Correl.</b>	1.0000	0.9994	0.9999	0.9997	0.9999	0.9999
<b>Coef. Determ.</b>	1.0000	0.9988	0.9998	0.9994	0.9998	0.9998
<b>Error Típico</b>	0.0040	0.0146	0.0059	0.0106	0.005	0.0042
	<b>VARIABILIDAD DE LA PENDIENTE</b>					
	<b>PROM</b>	<b>S</b>	<b>CV, %</b>	<b>Int. Conf.</b>		
	0.11	0.001	0.85	0.001		



**Figura: 4.3.**



**Tabla 4.7. Evaluación Estadística de la Linealidad del Sistema en la Determinación Espectrofotométrica de la Ciprofloxacina**

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	Conclusión
Coeficiente de Correlación.	$r \geq 0.995$	0.99990	Cumple
Coeficiente de Determinación	$R^2 \geq 0.99$ .	0.9998	Cumple
Regresión, Hipótesis nula	$t_{reg} > t_{tabla}$	$t_{reg} = 171,41$	Cumple
Intercepto, Hipótesis nula	$t_{exp} < t_{tabla}$	$t_{exp} = 2,50$	Cumple
Pendiente, Hipótesis nula	$t_{exp} > t_{tabla}$	$t_{exp} = 171,41$	Cumple



#### 4.6.4. Exactitud

Los valores referentes a la exactitud del método, obtenidos por medio de la prueba de recuperación, se encuentran en la Tabla 4.7. El porcentaje de principio activo recuperado, a dos niveles de concentración, muestra que el método presenta exactitud, es decir que los valores obtenidos en la determinación no se diferencian estadísticamente del valor verdadero. El ensayo de Hipótesis de t de Student para comparar el valor Promedio de las concentraciones obtenidas con el valor esperado (utilizando la Hoja de Cálculo “Media Muestral Poblacional Referencia”) demostró que no hay diferencia significativa entre la concentración introducida y la recuperada, a un nivel de confianza de 95% y 4 grados libertad (n = 5) a los dos niveles de concentración investigados.

**Tabla 4.8. Validación de la Exactitud en la Determinación Espectrofotométrica de Ciprofloxacina por Recuperación de Adiciones Conocidas, adicionando 4,0 µg/ml en la matriz de la muestra.**

VALIDACIÓN DE EXACTITUD POR RECUPERACIÓN DE ADICIONES CONOCIDAS						
Ensayo	Conc. de muestra + Adición Conocida	Conc. Muestra	Recuperación Calculada	Adición Conocida	Desviaciones del Esperado	Recuperación, %
1	7.9389	4.0444	3.8945	4.0000	-0.1055	97.4
2	8.0656	4.0444	4.0212	4.0000	0.0212	100.5
3	7.9987	4.0444	3.9543	4.0000	-0.0457	98.9
4	7.9826	4.0444	3.9382	4.0000	-0.0618	98.5
5	7.9321	4.0444	3.8877	4.0000	-0.1123	97.2
6	8.1271	4.0444	4.0827	4.0000	0.0827	102.1
<b>PROM</b>			<b>3.9631</b>		<b>-0.0369</b>	<b>99.08</b>
<b>MIN</b>			<b>3.8877</b>		<b>-0.1123</b>	<b>97.19</b>
<b>MAX</b>			<b>4.0827</b>		<b>0.0827</b>	<b>102.07</b>
<b>RANGO</b>			<b>0.1950</b>		<b>0.1950</b>	<b>4.88</b>
<b>DESVEST</b>			<b>0.0759</b>		<b>0.0759</b>	<b>1.90</b>
<b>Interv. Conf</b>			<b>0.0607</b>			<b>1.52</b>
<b>t<sub>calc</sub> □</b>	<b>1.19</b>	<b>t<sub>tab</sub> □</b>	<b>2.57</b>			
<b>DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA</b>						



**Tabla: 4.9. Validación de la Exactitud en la Determinación Espectrofotométrica de Ciprofloxacina por Recuperación de Adiciones Conocidas, adicionando 2,0 µg/ml en la matriz de la muestra.**

<b>VALIDACIÓN DE EXACTITUD POR RECUPERACIÓN DE ADICIONES CONOCIDAS</b>						
<b>Ensayo</b>	<b>Conc. de muestra + Adición Conocida</b>	<b>Conc. Muestra</b>	<b>Recuperación Calculada</b>	<b>Adición Conocida</b>	<b>Desviaciones del Esperado</b>	<b>Recuperación, %</b>
1	6.1171	4.0444	2.0727	2.0000	0.0727	103.6
2	6.0987	4.0444	2.0543	2.0000	0.0543	102.7
3	5.9305	4.0444	1.8861	2.0000	-0.1139	94.3
4	6.0081	4.0444	1.9637	2.0000	-0.0363	98.2
5	6.2077	4.0444	2.1633	2.0000	0.1633	108.2
6	5.9535	4.0444	1.9091	2.0000	-0.0909	95.5
<b>PROM</b>			<b>2.0082</b>		<b>0.0082</b>	<b>100.41</b>
<b>MIN</b>			<b>1.8861</b>		<b>-0.1139</b>	<b>94.31</b>
<b>MAX</b>			<b>2.1633</b>		<b>0.1633</b>	<b>108.17</b>
<b>RANGO</b>			<b>0.2772</b>		<b>0.2772</b>	<b>13.86</b>
<b>S</b>			<b>0.1068</b>		<b>0.1068</b>	<b>5.34</b>
<b>Intervalo de Conf.</b>			<b>0.0855</b>			<b>4.27</b>
<b>t<sub>calc</sub></b>	<b>0.19</b>	<b>t<sub>tab</sub></b>	<b>2.57</b>			
<b>DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA</b>						



#### 4.6.5. Precisión

Para evaluar este proceso se utilizaron una serie de muestras a concentraciones diferentes, tales como 4,0 µg/ml, 6,0 µg/ml, 8,0 µg/ml; la precisión fue determinada intradía e interdía realizando los experimentos en las mismas condiciones de trabajo. Los resultados de las pruebas de precisión muestran las variaciones obtenidas en la señal analítica, el valor promedio de la señal y la Desviación Estándar Relativa (CV).

La repetibilidad en los valores de la señal analítica de los análisis intra e interdías con bajos valores de CV (menores que 5,0) indican que el método es preciso. Los valores de CV por debajo del 5% tanto en lo que concierne a repetibilidad (Intradía) como a precisión intermedia (Interdía) son considerados aceptables.

**Tabla. 4.10. Repetibilidad (Intradía)**

ANALISTA: 1				ANALISTA: 2			
	Concentración de Trabajo				Concentración de Trabajo		
Ensayo Número	4,0 µg/ml	6,0 µg/ml	8,0 µg/ml	Ensayo Número	4,0 µg/ml	6,0 µg/ml	8,0 µg/ml
1	4.1779	6.0651	7.7944	1	4.1528	5.9483	7.9160
2	4.1198	6.2296	8.0244	2	4.0585	6.1457	8.0246
3	4.1497	6.2949	8.1804	3	4.1322	6.0082	7.8851
4	3.9490	5.9912	7.7395	4	4.0218	5.8347	7.7907
5	3.9374	5.7923	7.6748	5	4.0142	6.0024	7.9042
6	3.9613	5.8058	7.7808	6	4.0444	6.0769	7.9719
<b>Media</b>	<b>4.0492</b>	<b>6.0298</b>	<b>7.8657</b>	<b>Media</b>	<b>4.0707</b>	<b>6.0027</b>	<b>7.9154</b>
<b>S</b>	<b>0.1113</b>	<b>0.2095</b>	<b>0.1944</b>	<b>S</b>	<b>0.0582</b>	<b>0.1069</b>	<b>0.0796</b>
<b>C.V., %</b>	<b>2.75</b>	<b>3.47</b>	<b>2.47</b>	<b>C.V.,%</b>	<b>1.43</b>	<b>1.78</b>	<b>1.01</b>
<b>Int. Conf</b>	<b>0.0890</b>	<b>0.1677</b>	<b>0.1555</b>	<b>Int. Conf</b>	<b>0.0466</b>	<b>0.0856</b>	<b>0.0637</b>



#### 4.6.6. Reproducibilidad

Los resultados de las pruebas de reproducibilidad muestran las variaciones obtenidas en la señal analítica, el valor promedio de la señal y la Desviación Estándar Relativa (CV); Los valores de CV se presentan por debajo del 5% por lo que concierne una buena reproducibilidad del método.

**Tabla 4.11. Repetibilidad Intralaboratorio**

Ensayo Número	Concentración Baja, µg/ml		
	Analista 1	Analista 2	Diferencia
1	4.1779	4.1528	0.0251
2	4.1198	4.0585	0.0613
3	4.1497	4.1322	0.0175
4	3.9490	4.0218	-0.0728
5	3.9374	4.0142	-0.0768
6	3.9613	4.0444	-0.0831
<b>Media</b>	<b>4.0492</b>	<b>4.0707</b>	<b>-0.0215</b>
<b>S</b>	<b>0.1113</b>	<b>0.0582</b>	<b>0.0633</b>
<b>C.V., %</b>	<b>2.75</b>	<b>1.43</b>	
<b>t (Calculada)</b>	<b>0.83</b>		
<b>t(Tabla)</b>	<b>2.57</b>		
<b>NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA</b>			

**Tabla 4.12. Repetibilidad Intralaboratorio**

Ensayo Número	Concentración Media, µg/ml		
	Analista 1	Analista 2	Diferencia
1	6.0651	5.9483	0.1168
2	6.2296	6.1457	0.0839
3	6.2949	6.0082	0.2867
4	5.9912	5.8347	0.1565
5	5.7923	6.0024	-0.2101
6	5.8058	6.0769	-0.2711
<b>Media</b>	<b>6.0298</b>	<b>6.0027</b>	<b>0.0271</b>
<b>S</b>	<b>0.2095</b>	<b>0.1069</b>	<b>0.2194</b>
<b>C.V., %</b>	<b>3.47</b>	<b>1.78</b>	
<b>t (Calculada)</b>	<b>0.30</b>		
<b>t(Tabla)</b>	<b>2.57</b>		
<b>NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA</b>			



<b>Tabla 4.13. Reproducibilidad Intralaboratorio</b>			
	<b>Concentración Alta, µg/ml</b>		
<b>Ensayo Número</b>	<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>	<b>Diferencia</b>
1	7.7944	7.9160	-0.1216
2	8.0244	8.0246	-0.0002
3	8.1804	7.8851	0.2953
4	7.7395	7.7907	-0.0512
5	7.6748	7.9042	-0.2294
6	7.7808	7.9719	-0.1911
<b>Media</b>	<b>7.8657</b>	<b>7.9154</b>	<b>-0.0497</b>
<b>S</b>	<b>0.1944</b>	<b>0.0796</b>	<b>0.1892</b>
<b>C.V., %</b>	<b>2.47</b>	<b>1.01</b>	
<b>t (Calculada)</b>	<b>0.64</b>		
<b>t(Tabla)</b>	<b>2.57</b>		
<b>NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA</b>			



#### 4.6.7. Precisión intermedia

Como se observa en la tabla 4.13 se obtuvieron resultados de coeficiente de variación menores que los que presenta la repetibilidad lo que indica que el método presenta un nivel de variación menos del 0.05%, para observar la variedad entre día se utilizó el análisis de varianza de un solo factor manejando el criterio de Fisher, como se observa no hay diferencia de usar datos en días diferentes.

<b>Tabla.4.13. Precisión Intermedia (Repetibilidad Interdía)</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Concentración de Trabajo</b>		
	<b>4,0 µg/ml</b>	<b>6,0 µg/ml</b>	<b>8,0 µg/ml</b>
1	4.1528	5.9483	7.9160
2	4.0585	6.1457	8.0246
3	4.1322	6.0082	7.8851
4	4.0218	5.8347	7.7907
5	4.0142	6.0024	7.9042
6	4.0444	6.0769	7.9719
7	4.1053	6.2750	8.0628
8	3.9531	6.0272	8.3380
9	4.1332	6.0278	8.4344
10	3.9701	5.9953	8.0415
11	4.0563	5.9405	8.1419
12	3.9870	6.1033	7.8255
<b>Media</b>	<b>4.0524</b>	<b>6.0321</b>	<b>8.0281</b>
<b>S</b>	<b>0.0669</b>	<b>0.1113</b>	<b>0.1964</b>
<b>C.V., %</b>	<b>1.65</b>	<b>1.84</b>	<b>2.45</b>
<b>Int. Conf</b>	<b>0.0378</b>	<b>0.0630</b>	<b>0.1111</b>

Análisis de varianza de un factor para 4 µg/mL						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Día 1	6	24.4239	4.07065	0.003389		
Día 2	6	24.205	4.034167	0.005652		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.003993101	1	0.003993	0.8833	0.3694	4.9646
Dentro de los grupos	0.045205108	10	0.004521			
Total	0.049198209	11				



Análisis de varianza de un factor, 6 µg/mL

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Día 1	6	36.0162	6.0027	0.0114		
Día 2	6	36.3691	6.0615	0.0137		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico
Entre grupos	0.0104	1	0.0103	<b>0.824757</b>	<b>0.3852</b>	<b>4.9646</b>
Dentro de los grupos	0.1258	10	0.0125			
Total	0.1362	11				

Análisis de varianza de un factor, 8,0 ug/mL

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Día 1	6	47.4925	7.9154	0.0063		
Día 2	6	48.8441	8.1406	0.0480		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.1522	1	0.1522	5.5936	0.0396	4.9646
Dentro de los grupos	0.2721	10	0.027			
Total	0.4243	11				



#### 4.6.8. Limite de detección y cuantificación

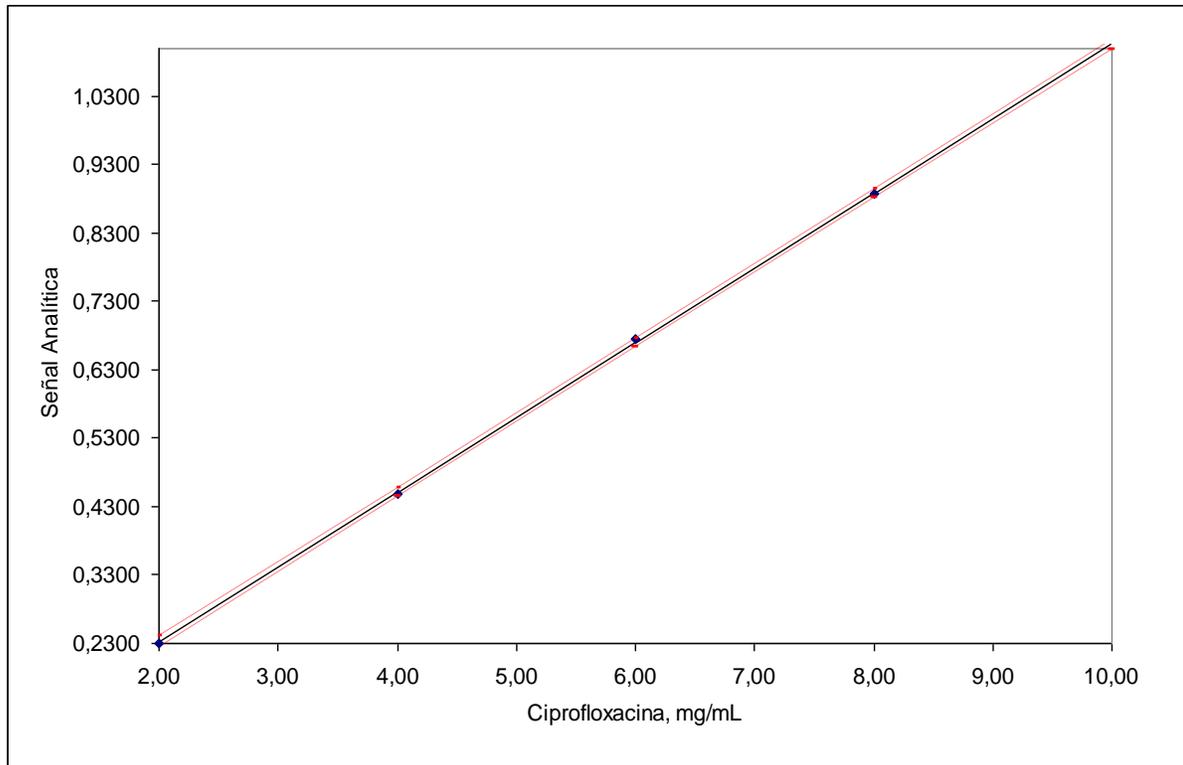
La determinación de los Límites de Detección y de Cuantificación se realizó sobre las muestras empleadas para la prueba de precisión, fueron calculados aplicando los criterios de 3 y 10 veces el valor de la desviación estándar residual y dividiendo el valor obtenido en cada caso entre la pendiente, respectivamente los valores logrado sujeto a validación no presentan diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los limites empleados y los coeficientes variación entre ambos pudiendo decir así que el método es suficientemente sensible

Los resultados de la evaluación tanto del Límite de Detección como del límite de Cuantificación se presentan en la Figura 4.4. Donde, además de los parámetros básicos de la regresión lineal, se presentan los parámetros de dispersión del sistema y la Curva de Calibración con sus correspondientes hipérbolas de regresión

Tabla 4.14.Regresión Lineal Simple, Limite de Detección y de Cuantificación					
CIPROFLOXACINA, 500 mg/TABLECAP					
		FECHA			
		23/12/2008			
mg/mL	Abs	a (Intercepto)	0,01378	r	0,9999
2,00	0,2309	b (pendiente)	0,10917	R <sup>2</sup>	0,9999
4,00	0,4480	Varianza residual	0,00002	Desviación Estándar de x/y	0,0042
6,00	0,6751	Desviación Estándar de la Pendiente	0,00066	Intervalo de Confianza de la pendiente	0,0021
8,00	0,8872	Desviación Estándar del Intercepto	0,00441	Intervalo de Confianza del Intercepto	0,0140
10,00	1,1030	Límite de Detección	0,11550	Límite de Cuantificación	0,3850



**Figura. 4.4.**



#### 4.6.9. Robustez del Método

Para evaluar la robustez del método se realizaron los ensayos de cuantificación del principio activo variando primeramente la concentración del ácido y luego el tipo de ácido utilizado y valorando el resultado que se obtenía al realizar las mediciones analíticas. Los resultados se reflejan en la siguiente tabla



**Tabla 4.15. Evaluación de la influencia de la concentración del ácido utilizado (HCl) en la recuperación de principio activo (Concentración introducida 6,0 µg/ml).**

	HCl 0.05N	HCl 0.10N	HCl 0.15N	
<b>DATOS</b>	6.08	6.08	5.95	
	6.00	6.04	6.00	
	6.06	6.05	6.03	
	6.05	6.07	6.06	N
	6.00	5.98	6.01	
<b>DATOS</b>	5	5	5	15
<b>SUMA</b>	30.19	30.22	30.05	<b>90.46</b>
<b>SC</b>				
<b>PROM</b>	6.038	6.044	6.01	18,092
<b>VAR</b>	0.00132	0.00153	0.00165	

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN SOLO FACTOR					
		Grados Libertad	Promedio Cuadrados	F	F crit
<b>SC<sub>TRAT</sub></b> (Entre Grupos)	0.003293333	2	0.001646667	1.097777778	3.885293835
<b>SC<sub>E</sub></b> (Dentro de los Grupos)	0.018	12	0.0015		
<b>SC<sub>T</sub></b> (Total)	0.021293333	14			

El Análisis de varianza de los tres conjuntos de datos llevó a la conclusión de que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos para cada caso. Por tanto puede concluirse que una variación de Concentración de  $\pm 0,05$  unidades no introduce una variación significativa en el resultado de la determinación.

Seguidamente se evaluó la influencia que podría tener el uso de un ácido distinto, procediendo a comparar los resultados que se podrían obtener al utilizar, además de HCl 0,10 N, HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la misma concentración de trabajo. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla



**Tabla 4.15. Evaluación de la influencia de distintos tipos de ácidos en la recuperación de principio activo (Concentración introducida 6,0 µg/ml).**

	<b>HCl 0.10N</b>	<b>HNO<sub>3</sub> 0.10N</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.15N</b>	
<b>DATOS</b>	6.06	6.05	6.00	
	6.04	5.93	6.04	
	6.02	6.04	6.01	
	6.07	5.93	6.11	N
	6.09	5.93	6,10	
<b>DATOS</b>	5	5	5	15
<b>SUMA</b>	30.28	29.88	30.26	90.42
<b>PROM</b>	6.056	5.976	6.052	18,084
<b>VAR</b>	0.00073	0.00398	0.00257	

		<b>Grados Libertad</b>	<b>Promedio Cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>F crit.</b>
<b>SC<sub>TRAT</sub></b> (Entre Grupos)	0.00257	2	0.01016	4.1868	3.8853
<b>SC<sub>E</sub></b> (Dentro de los Grupos)	0.02912	12	0.0024		
<b>SC<sub>T</sub></b> (Total)	0.04944	14			



Nuevamente, se realizó el Análisis de varianza para demostrar que si el cambio de ácido influye en el proceso considerando los tres conjuntos de datos se llevó a la conclusión de que hay diferencia significativa entre los valores obtenidos para tal efecto se efectuó el uso de datos anómalos usando el criterio Huber, encontrando que para el caso del  $H_2SO_4$  cumple el rango no así para el caso del  $HNO_3$ . Por tanto se procedió de realizar una vez más el análisis de varianza del ácido  $H_2SO_4$  comparándolo con el HCL

**Tabla 4.16. Evaluación de la comparación de distintos tipos de ácidos en la recuperación de principio activo (Concentración introducida 6,0  $\mu g/ml$ ).**

	<b>HCl 0.10N</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.15N</b>	
<b>DATOS</b>	6.06	6.00	
	6.04	6.04	
	6.02	6.01	
	6.07	6.11	N
	6.09	6,10	
<b>DATOS</b>	5	5	10
<b>SUMA</b>	30.28	30.26	60.54
<b>PROM</b>	6.056	6.052	12.108
<b>VAR</b>	0.00073	0.00257	

		<b>Grados Libertad</b>	<b>Promedio Cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>F crit.</b>
<b>SC<sub>TRAT</sub></b> (Entre Grupos)	4E-05	1	4E-05	0.02424242	5.1317655063
<b>SC<sub>E</sub></b> (Dentro de los Grupos)	0.0132	8	0.00165		
<b>SC<sub>T</sub></b> <b>(Total)</b>	0.01324	9			

Se concluye que el uso del  $H_2SO_4$  en lugar del HCL, no introduce una variación significativa en el resultado de la determinación.

Por tanto, se afirma, que el método es robusto a este tipo de cambios que circunstancialmente pudieran presentarse en el laboratorio, al momento de realizar la determinación.



#### 4.6.10. RESUMEN DE RESULTADOS

Tabla 4.17. Resumen de los resultados de la Validación

PARÁMETRO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
<b>1. SELECTIVIDAD</b>	✓ No debe presentar interferencias de matriz	✓ Conforme
<b>2. PRECISIÓN INTRADÍA (REPETIBILIDAD)</b> ✓ Coeficiente de Variación	✓ No mayor de 5%	✓ Conforme
<b>3. PRECISIÓN INTERDÍA (PRECISIÓN INTERMEDIA)</b> ✓ Coeficiente de Variación	✓ No mayor de 5%	✓ Conforme
<b>4. EXACTITUD</b> ✓ Recuperación	✓ $t_{exp} < t_{tab}$	✓ Conforme
<b>5. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b> ✓ Coeficiente de Correlación ✓ Coeficiente de Determinación ✓ Test Estadístico para la regresión (P = 0,05 y n-2 grados de libertad). ✓ Coeficiente de variación (Pendiente). ✓ Prueba de Linealidad de la Pendiente (P = 0,05 y n-2 grados de Libertad). ✓ Prueba de Proporcionalidad del Intercepto (P = 0,05 y n-2 grados de libertad)	✓ Mínimo 0,9950 ✓ Mínimo 0,9900 ✓ $t_{exp} >> t_{tabla}$  ✓ Máximo 5%  ✓ $t_{exp} > t_{tabla}$  ✓ $t_{exp} < t_{tabla}$	✓ Conforme. ✓ Conforme. ✓ Conforme.  ✓ Conforme.  ✓ Conforme.  ✓ Conforme.
<b>6. ROBUSTEZ</b>	Estable ante pequeños cambios	✓ Conforme

Fuente: grupo de trabajo (Gisela García, Bianka Gutiérrez).



#### 4.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos responden a los objetivos planteados inicialmente, obteniéndose un método debidamente validado logrando las condiciones óptimas de trabajo con un alto rendimiento, para procesar los datos se hizo uso de herramienta estadística para esto se diseñó un programa computarizado.

Se afirma que los parámetros propuestos en el estudio cumplen con los criterios de aceptación establecidos comprobando la hipótesis planteada lo cual se refleja en los resultados.

1. Se estableció que el método es suficientemente específico en las condiciones validadas para su ejecución, sin presentarse interferencia significativa por ninguno de los constituyentes de la matriz del producto objeto de análisis.
2. Para evaluar la exactitud se aplicaron diferentes procedimientos experimentales y estadísticos que responden a las características propias del método analítico validado. Además, no se obtuvieron diferencias significativas entre la recuperación media y el valor considerado verdadero para esto se aplicó la prueba de t de Student, confirmando que el método es exacto con un porcentaje promedio de recuperación de 100,4% para el nivel bajo y 99,0% para el nivel alto.
3. El estudio de precisión mostró una buena repetibilidad y repetibilidad intermedia de los resultados, de acuerdo a los criterios de aceptación, al realizar mediciones, en las condiciones de implementación del método, donde se obtuvieron valores de coeficiente de variación para el primer analista de 2,75; 3,47; 2,47 para el segundo analista fueron de 1,43; 1,78 y 1,01, a los tres niveles de concentración trabajados, verificando que el método presenta un nivel de variación menor del 5%.



4. Los Límites de Detección y de Cuantificación calculados para el método sujeto a validación fueron de 0,11550 y de 0,3850 respectivamente corroborados experimentalmente. El método es suficientemente sensible, para los fines de implementación proyectados, ya que se obtuvo un  $r$  igual de 0,999 y un  $R^2$  igual a 0,9999 una desviación estándar de  $y$  y con respecto a  $x$  (desviación estándar residual) de 0,042.
  
5. Al evaluar estadísticamente la linealidad del método analítico validado, se obtuvo un valor de coeficiente de correlación de 0,9999 y un valor de coeficiente de determinación 0,9998, con lo cual se demuestra que existe una adecuada correlación entre las variables señal analítica obtenida y concentración. El sistema pasó los ensayos de hipótesis (  $t$  de student) para verificar la idoneidad tanto de la correlación (significativa) así como del intercepto (diferente de cero) y de la pendiente (no paralela al eje  $x$ ),
  
6. El método es robusto ante pequeños cambios circunstanciales que pudieran presentarse; obteniendo un valor de  $F$  de 1,0977 al evaluar la variación de la concentraciones del HCl, al aplicar el análisis de varianza de un solo factor; mientras que en el caso de la diversificación del tipo del ácido se logró un valor de  $F$  de 0,88012, ambos menores que el valor crítico de  $F$ .



#### **4.8. RECOMENDACIONES**

1. Aplicar este método para la cuantificación de Ciprofloxacina en las formulaciones sólidas de este producto de Laboratorio Bengoechea y pruebas comparativas en diferentes formulaciones farmacéuticas.
2. Realizar estudios posteriores para comparar el método espectrofotométrico UV-Visible con el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
3. Fomentar en la industria la validación de sus métodos analíticos para análisis de sus productos terminados, así como de los materiales en proceso que lo ameriten.



#### 4.9. BIBLIOGRAFÍA

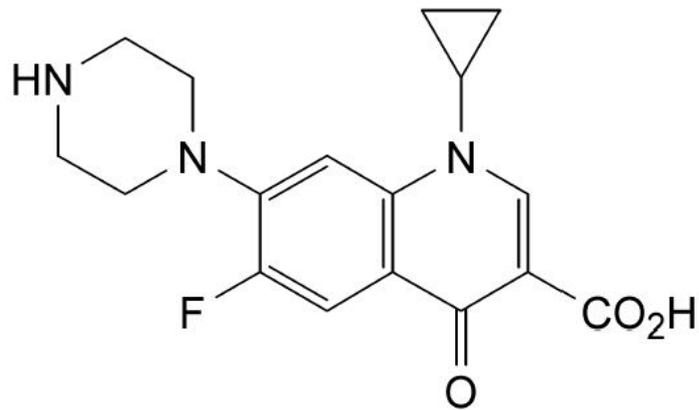
1. Coautores. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, Asociación Española Farmacéutica de la Industria (AEFI), Marzo 2001, pág. 3.
2. Castellucci Federico. Resultado del simposio sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos, pág. 1, 5.
3. Guía para la Validación de Métodos Analíticos. Entidad de Acreditación de Costa Rica, ECA, 2001.
4. Castellucci Federico. Resultado del simposio sobre Armonización de Sistemas de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos.
5. Manual de Procedimientos para el registro y Renovación de Productos Farmacéuticos e Inscripción Sanitaria y Renovación de Productos Cosméticos e Higiénicos.
6. Trejos E. Control de Calidad en el Laboratorio Analítico, UNAN, León, 1994.
7. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 32-NF 27.
8. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw-Hill, Madrid, 2001.
9. Willard et al. Métodos Instrumentales de Análisis. Editorial Interamericana, México, 2001.
10. Dyer J. Aplicaciones de Espectroscopia de Absorción de Compuestos Orgánicos. Editorial Prentice/Hall Internacional., España, 1973.
11. Bermejo F. Química Analítica General, Cuantitativa e instrumental. Editorial Paraninfo, Madrid 1991.
12. BP 2009, versión electrónica.
13. Clarke's. Analysis of Drugs and Poisons, Electronic Version.
14. Harrison's, USP DI, Drug Information for the Health Care Professional. McGraw-Hill, Versión Electrónica, 2001.
15. Physical Desk Reference, Electronic Library, 2002
16. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman & Gilman. IX Edición, McGraw-Hill Interamericana, México, 1996.
17. Miller et al. Estadística para Química Analítica. Editorial Prentice Hall, Abril, 1984.



## ANEXO A. PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD DE LA CIPROFLOXACINA, 500 mg/TABLETA

A.1.PRODUCTO: Ciprofloxacina, 500 mg/Tablecap x Blister de 10 Tablecaps X 2 Blister/Caja.

### Estructura



PM (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) = 331.35

### A.2. FÓRMULA CUALICUANTITATIVA

Nombre de los Materiales	Cantidad por Tableta	Unidad de medida
Ciprofloxacina (Ciprofloxacina.HCl. H <sub>2</sub> O)	582.2	mg.
Celulosa Microcristalina PH 102	30	mg
Lactosa Monohidrato	24	mg.
Almidón de Maíz (Relleno)	20	mg.
Croscarmelosa Sódica	45	mg.
Povidone K-30	50	mg.
Dióxido de Slicón Coloidal (Aerosil 200)	4	mg.
Talco	15	mg.
Estearato de Magnesio	15	mg.
Ácido Esteárico	5	mg.
Croscarmelosa Sódica	30	mg.
Agua Purificada	0.165	ml



### A.3. PARAMETROS FISICOQUIMICOS

#### A.3.1. Identificación

- 1 **Identificación por cromatografía de capa fina (USP XXX):** El tiempo de retención del mayor pico detectado en la solución de prueba debe de coincidir con el de la preparación estándar, mediante el método de *ensayo*.
- 2 Correspondencia de Espectros y cromatogramas en análisis por HPLC.

**A.3.2. Variación de peso.** Pesar 20 tabletas del principio activo sometido a ensayo de forma individual y calcular el peso promedio de las tabletas. Luego calcular el contenido de ingrediente activo en cada una de las 20 tabletas y determinar la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (DSR) del principio activo.

**Criterio USP XXX.** El contenido de ingrediente activo en cada una de las 20 tabletas analizadas se debe encontrar entre 85 % a 115 % de la cantidad etiquetada y la DSR debe ser menor que 6.0 %. Por otro lado, si una tableta está fuera del rango 85 % - 115 % y ninguna está fuera del rango 75 % -125 %, o si a DSR es mayor que 6.0 % o si ambas condiciones prevalecen, ensayar 20 tabletas adicionales. Los requerimientos se cumplen si no más de 1 tableta de las 40 está fuera del rango 85 % - 115 % y ninguna fuera del rango 75 % - 125 % de la cantidad etiquetada y la DSR no excede de 7.8 %.

**A.3.3. Desintegración.** Colocar una tableta en cada uno de los 6 tubos de la canasta y operar el aparato usando agua destilada a una temperatura de  $37 \pm 2$  °C como el fluido de inmersión. Al final del límite de tiempo especificado, sacar la canasta del fluido y observar las tabletas.

Todas las tabletas deben haberse desintegrado completamente. Si 1 ó 2 tabletas no se desintegrasen completamente, repetir la prueba con 12 tabletas adicionales.

**Criterio.** No menos de 16 de un total de 18 tabletas sometidas al ensayo se desintegran totalmente.

**Tiempo de desintegración:** No mayor de 30 minutos.

**A.3.4. Friabilidad.** Colocar 20 tabletas previamente pesadas en el aparato friabulador y ponerlo a funcionar a 25 rpm, por espacio de 4 minutos. Luego limpiarle el polvo superficial a las tabletas con ayuda de una brocha, pesar y calcular el porcentaje de peso perdido. La friabilidad de las tabletas no debe ser mayor de 1.0 %.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{(P_o - P_f)}{P_o} * 100$$

**A.3.5. Dureza.** En el rango de  $8 \pm 4$  Kg/cm<sup>2</sup>.



### A.3.6. Disolución

Medio: HCl 0.01 N; 900 ml.

Aparato 2: 50 r.p.m.

Tiempo: 30 minutos.

**Procedimiento.** Determinar la cantidad de Ciprofloxacina ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$ ) disuelta empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorción (aproximadamente 276 nm) en porciones filtradas de la solución bajo ensayo, diluidas adecuadamente con el Medio de Disolución, si es necesario, en comparación con una solución de estándar RS de concentración conocida en el mismo medio.

**Tolerancia.** Una cantidad de **Ciprofloxacina ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$ )** equivalente a no menos de 75% (Q) de la cantidad declarada se debe disolver en 60 minutos.

*Usar la Tabla 1 de Aceptación bajo Disolución (711), con las siguientes excepciones: en la etapa  $S_2$  ninguna unidad debe ser menor que Q-5%; en la etapa  $S_3$  ninguna unidad debe ser menor que Q-10%; y no más de 2 unidades de las 24 debe ser menor que Q-5%.*

## A.4. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

### A.4.1. Parámetros Fisicoquímicos

Parámetro Medido	Especificaciones
Descripción	Capleta, bisectada en una cara, con logo del Laboratorio en la otra cara. Color blanco a ligeramente amarillento. Dimensiones: 19.4x7.5x6.7..
Identificación	Relación de Picos cromatográficos en las condiciones de Ensayo por HPLC.
Friabilidad	No mayor de 1.0%
Dureza	$9 \pm 4 \text{ Kg/cm}^2$ .
Desintegración	Desintegración en un tiempo no mayor de 30 minutos.
Disolución	No menor de 80% Q en 30 min.
Uniformidad de peso	No menor de 85% y no mayor de 115% y un CV no mayor del 6%.
Uniformidad de contenido	No menor de 85% y no mayor de 115% y un CV no mayor del 6%.
Ensayo de Cuantitativo	Debe contener no menos de 90.0% y no mas de 110.0% de la cantidad declarada de Principio Activo ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ).



#### A.4.2. Parámetros microbiológicos

<b>Parámetro Medido</b>	<b>Especificaciones</b>
Conteo total de microorganismos aerobios viables	No Aplica
Presencia de microorganismos objetables del producto	No Aplica

#### A.5. BIBLIOGRAFÍA

- 1 USP XXX, versión electrónica.
- 2 BP 2007, versión electrónica.
- 3 Clarke's. Analysis of Drugs and Poisons, Electronic Version.



## ANEXO B - DEFINICIONES ESTADÍSTICAS

### ⇒ Introducción

En la cuantificación de elementos en matrices de aguas naturales, potables y residuales, es de suma importancia que la curva de calibración sea confiable con respecto al intervalo que puede utilizar para cuantificar concentraciones desconocidas de patrones y muestras. El siguiente instructivo de trabajo tiene por finalidad determinar este intervalo con patrones y con muestras y patrones.

1. Según la definición del Límite de Detección del Instrumento (LDI) y Límite de Cuantificación del Instrumento (LCI).

$$Y_{LDI} = Y_B + 3S_B$$

$$Y_{LCI} = Y_B + 10S_B$$

2. Obtención de los valores de absorbancia  $Y_{i,n}$  de los puntos de la curva de calibración, donde el número de estándares (i), podrán estar en el intervalo ( $5 \leq i \leq 10$ ) y el número de réplicas (n) pueden estar entre ( $7 \leq n \leq 10$ ) para flama y ( $3 \leq n \leq 5$ ) para horno y generador de hidruros y vapores.

De cada serie de datos se obtiene la desviación estándar ( $S_i$ ) y el promedio de la absorbancia ( $\bar{Y}_i$ ), con éstos dos últimos se calcula el coeficiente de variación ( $CV_i$ ).

3. Comprobación visual de la linealidad entre las absorbancia promedio ( $Y_i$ ) y la concentración graficando  $\bar{Y}_i$  vs  $X_i$
4. Determinar el coeficiente de correlación lineal.

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Si  $r \geq 0,995$  se acepta. Si no se rechaza y regresamos al punto 2.

5. Si se cumplen las condiciones (3) y (4), se calcula la pendiente (b) y el punto de intersección (a) de la recta en el eje Y, por medio del método de los mínimos cuadrados:



$$y = a + b x$$

6. Cálculo de las desviaciones  $S_{y/x}$  entre los valores calculados por medio de la línea recta ( $\hat{Y}_i$ ) y los valores experimentales ( $\bar{Y}_i$ ).

6.1 Calcular los valores de la absorbancia ( $\hat{Y}_i$ ) sustituyendo en la línea recta las concentraciones ( $X_i$ ):

$$x_1 \rightarrow \hat{y}_1, x_2 \rightarrow \hat{y}_2, x_3 \rightarrow \hat{y}_3, \dots, x_i \rightarrow \hat{y}_i$$

6.2. Con los datos anteriores obtener  $S_{y/x}$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2}{(n - 2)}}$$

6.3. Por definición  $S_{y/x}$  es igual a la desviación estándar del blanco ( $S_B$ ) y el término independiente de la línea recta ( $a$ ) es igual a la absorbancia del blanco ( $Y_B$ ).

7. Con los valores obtenidos calcular ( $Y_{LDI}$ ,  $Y_{LCI}$ ). Sustituyendo estos valores en la ecuación de la línea recta, calcular las concentraciones correspondientes:  $X_{LDI}$  y  $X_{LCI}$ . Con el valor  $X_{LCI}$  tenemos el primer punto confiable de la línea recta.

8. Obtención del Límite Superior de Linealidad (LSL) para esta serie de puntos. Comparar el coeficiente de variación ( $CV_i$ ), obtenido para cada punto aceptándolo si cumple con el criterio  $CV_i \leq 3\%$ . Si los puntos de concentraciones más altas de la recta cumplen con este criterio se aceptan y tendremos el LSL de la curva.

Con el LCI y el LSL se obtiene el intervalo lineal confiable de la línea recta.

9. Disminución del Límite de Cuantificación del Instrumento (LCI).

En algunos casos se podrá hacer uso de la curva para cuantificar desde un valor inferior al obtenido, aplicando los puntos inferiores al LCI, el criterio de  $CV_i \leq 3\%$ , si se cumple con este criterio el punto LCI se podrá recorrer a concentraciones inferiores, ampliando el intervalo lineal hacia concentraciones más bajas.

10. Determinación de los Límites de Detección (LDM), Límites de Cuantificación (LCM) y límite superior de linealidad (LSLM) con la matriz de la muestra.

Se procede en forma similar a como se procedió en el punto 2, con la absorbancia de los patrones.



- a) Se elige una muestra con bajo contenido de metales < LCI.
- b) Se añaden a la muestra de 5 a 10 concentraciones conocidas y se leen de 7 a 10 veces.
- c) La absorbancia promedio de la muestra  $Y_{iM}$  se obtiene restando a la lectura de la muestra adicionada la lectura de la muestra sin adicionar, para cada adición.
- d) De cada serie de replicas se obtiene la desviación estándar ( $S_{iM}$ ) el promedio de las réplicas  $\bar{Y}_{iM}$  y con estos valores se calcula el coeficiente de variación.

e) Comprobar la linealidad analizando las muestras

11. El resto de los cálculos se realiza siguiendo la secuencia de los incisos: 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9. Con esto se deben obtener los valores correspondientes al método.

12. Media ( $\bar{X}$ ).  $\bar{X}$  Es la media de un número finito de mediciones repetidas ( $n < 30$ ). Es la estimación de la media ( $\mu$ ) o el promedio, de la distribución de valores aleatorios y se calcula como:

$$\bar{X} = \frac{(\sum X_i)}{n - 1}$$

Donde:

n es igual al número de mediciones.

13. Desviación estándar de la distribución normal, se define como:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \mu)^2}{n}}$$

para un número infinito de determinaciones.

Para un número finito de determinaciones;  $\sigma$  se estima por medio de s y se calcula como:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

14. Amplitud de la dispersión de la distribución normal ( $\mu \pm i s$ ) y su probabilidad:

Probabilidad de la fracción de los valores-Intervalo de Confianza. ( $\bar{X} \pm S$  con n)

68,27 %	$\mu \pm \sigma$
95,45 %	$\mu \pm 2\sigma$
99,70 %	$\mu \pm 3\sigma$



15. Error estándar de la media ( $\sigma_{\mu}$ ) Es la desviación estándar ( $\sigma$ ) dividida por la raíz cuadrada del número de valores, ó  $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ .

Esto significa que otra muestra de la misma población tendrá una media dentro de algunos múltiplos de ésta. En la practica se dispone de un pequeño número de valores promedio, por lo tanto el intervalo de confianza de la media se expresa como

$$\bar{x} \pm \frac{t_{0,95\%} S}{\sqrt{n}}$$

el valor de  $t_{95\%}$  se consulta en tablas para n determinaciones, donde  $n \geq 2$

16. Desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV).

Este se expresa comúnmente en porcentaje como:

$$CV = 100 \frac{\sigma}{\mu}$$

y su estimación como:

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

Esta magnitud normaliza la desviación estándar y facilita el hacer comparaciones directas entre análisis que incluyen un amplio intervalo de concentración.

17. Límite de Detección (LD) para el elemento de interés. Es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco ( $Y_B$ ) más tres veces la desviación estándar del blanco ( $S_B$ ).

$$Y_{LD} = Y_B + 3S_B$$

18. Límite de Cuantificación o Límite de Determinación (LC). Es considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas y se sugiere que sea una señal igual a la del blanco ( $Y_B$ ) más diez veces la desviación estándar del blanco ( $S_B$ ).

$$Y_{LC} = Y_B + 10 S_B$$



## ANEXO C. RESULTADOS ORIGINALES DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

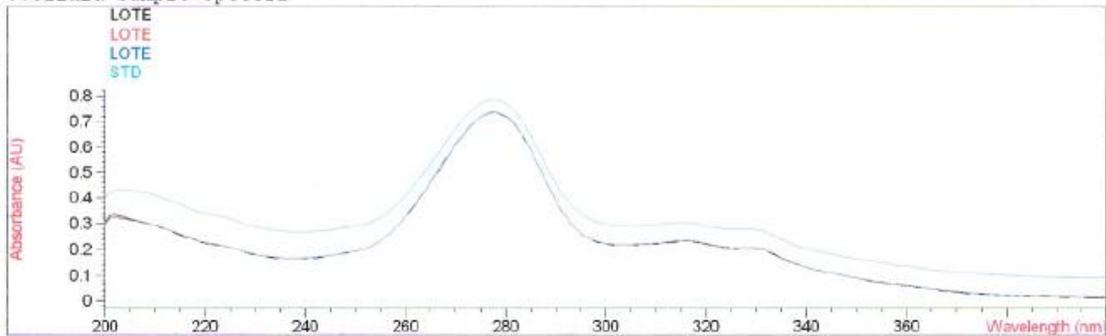
Quantification Report  
ANALISIS DE HIERRO EN AGUA LB26431

Date 10/9/2008 Time 16:32:23 Page 1 of 1

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
Information : factor 1.110

Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	LOTE	1.00000	6.08200	0.72397	9.0265E-3
2	LOTE	1.00000	6.08010	0.72374	9.7699E-3
3	LOTE	1.00000	6.07980	0.72372	1.0100E-2
4	STD	1.00000	5.64920	0.69626	8.8218E-2



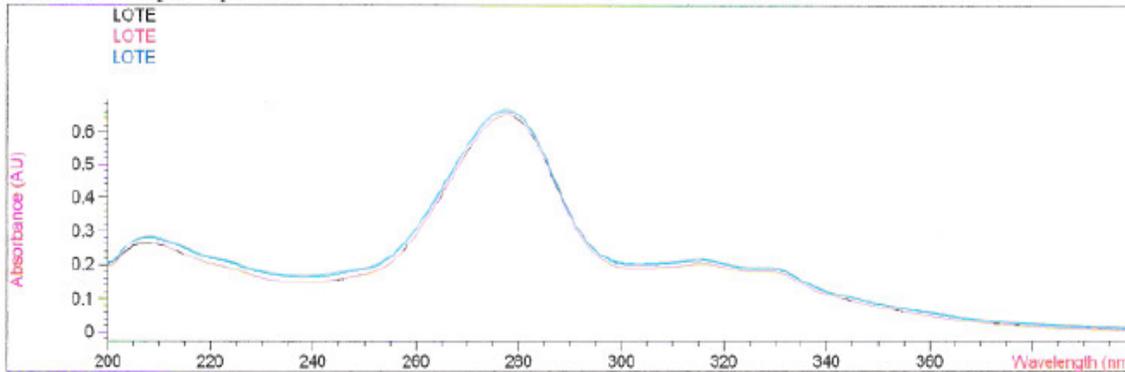
Quantification Report  
ANALISIS DE CIPROFLOXACINA HCL

Date 10/9/2008 Time 14:25:51 Page 1 of 1

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 8/8/2008 Time 2:32:32 PM  
Information : Default Method

Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 8/8/2008 Time 2:32:32 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	LOTE	1.00000	5.39540	0.64224	5.5690E-3
2	LOTE	1.00000	5.39590	0.64230	5.6286E-3
3	LOTE	1.00000	5.46550	0.65059	9.6068E-3
4		1.00000	5.48240	0.65260	1.2232E-2

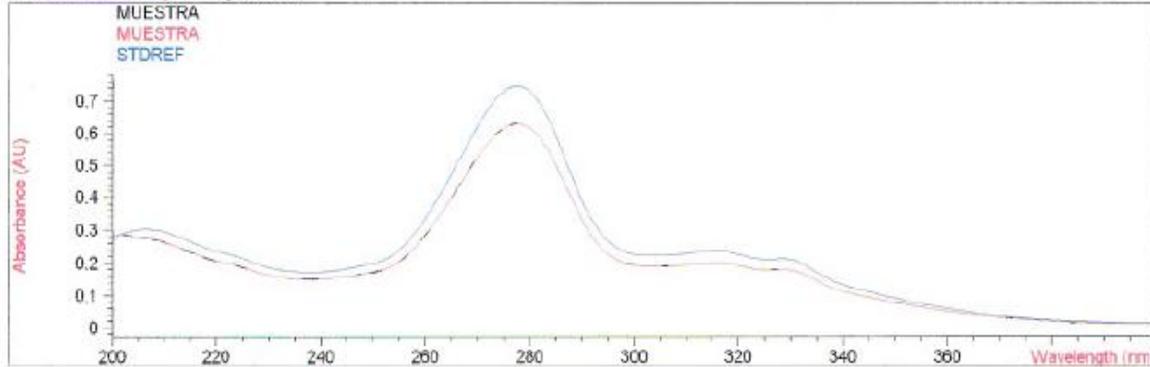


Quantification Report Date 10/9/2008 Time 13:11:11 Page 1 of 1  
ENSAYO DE DISOLUCION DE DICLOFENAC SODICO 100mg LOTE 2367

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 8/8/2008 Time 2:32:32 PM  
Information : Default Method

Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 8/8/2008 Time 2:32:32 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MUESTRA	1.00000	5.19320	0.61817	1.0744E-2
2	MUESTRA	1.00000	5.19490	0.61837	1.0723E-2
3	STDREF	1.00000	6.14590	0.73158	1.1854E-2

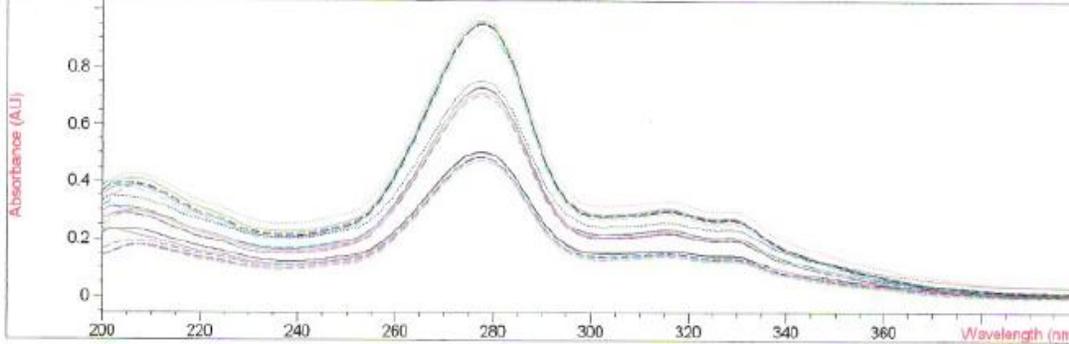


Quantification Report Date 10/16/2008 Time 14:10:25 Page 1 of 1  
 ENSAYO DE REPETIBILIDAD DE CIPROFLOXACINA DE 500 MG LOTE 2329

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGS2.SD Created : 10/16/08 14:05:10

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	4UG/ML	1.00000	4.15280	0.49433	1.1013E-2
2	6UG/ML	1.00000	5.94830	0.70805	3.8161E-3
3	8UG/ML	1.00000	7.91600	0.94228	6.2356E-3
4	4UG/ML	1.00000	4.05850	0.48310	-1.2851E-3
5	6UG/ML	1.00000	6.14570	0.73155	-1.2808E-3
6	UG/ML	1.00000	8.02460	0.95521	7.2880E-3
7	4UG/ML	1.00000	4.13220	0.49188	1.0762E-2
8	6UG/ML	1.00000	6.00820	0.71519	1.3454E-2
9	UG/ML	1.00000	7.88510	0.93860	8.8406E-3
10	4UG/ML	1.00000	4.02180	0.47873	-5.2843E-3
11	6UG/ML	1.00000	5.83470	0.69453	4.8604E-3
12	UG/ML	1.00000	7.79070	0.92737	-1.1082E-3
13	4UM/ML	1.00000	4.01420	0.47783	6.3262E-3
14	6UM/ML	1.00000	6.00240	0.71450	1.2965E-2
15	8UG/ML	1.00000	7.90420	0.94088	1.0865E-2
16	4UG/ML	1.00000	4.04440	0.48142	3.6950E-3
17	6UG/ML	1.00000	6.07690	0.72337	3.1282E-2
18	8UG/ML	1.00000	7.97190	0.94894	3.2805E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

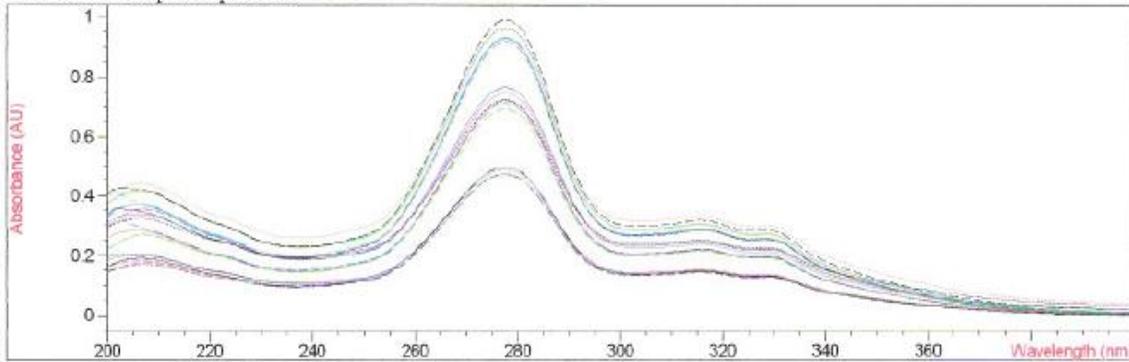


Quantification Report Date 10/16/2008 Time 14:33:25 Page 1 of 1  
 ENSAYO DE REPETIBILIDAD DE CIPROFLOXACINA DE 500 MG LOTE 2329

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	4UG/ML	1.00000		4.17790	0.49732	-2.0628E-3
2	6UG/ML	1.00000		6.06510	0.72197	-5.9090E-4
3	8UG/ML	1.00000		7.79440	0.92781	-4.0007E-4
4	4UG/ML	1.00000		4.11980	0.49040	-4.7584E-3
5	6UG/ML	1.00000		6.22960	0.74154	4.3206E-3
6	8UG/ML	1.00000		8.02440	0.95519	3.1323E-3
7	4UG/ML	1.00000		4.14970	0.49397	6.3038E-4
8	6UG/ML	1.00000		6.29490	0.74931	1.4542E-2
9	Sample	1.00000		8.18040	0.97376	1.4065E-2
10	4UG/ML	1.00000		3.94900	0.47007	7.2813E-4
11	6UG/ML	1.00000		5.99120	0.71316	-2.3589E-3
12	8UG/ML	1.00000		7.73950	0.92127	1.8215E-3
13	4UG/ML	1.00000		3.93740	0.46869	1.2980E-3
14	6UG/ML	1.00000		5.79230	0.68949	1.5831E-3
15	8UG/ML	1.00000		7.67480	0.91357	-3.6716E-5
16	4UG/ML	1.00000		3.96130	0.47154	-1.1950E-3
17	6UG/ML	1.00000		5.80580	0.69110	3.1695E-2
18	8UG/ML	1.00000		7.78080	0.92620	3.5777E-2

Report generated by : B.GUTIERREZ

Signature: .....



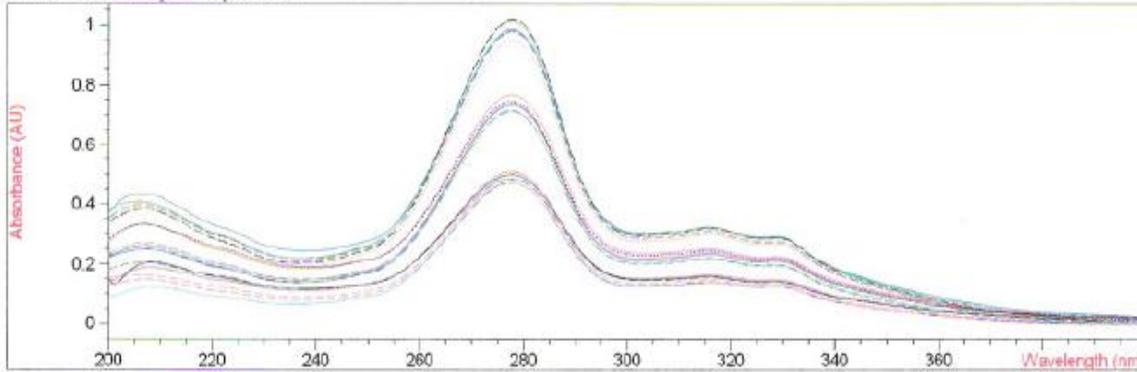
Quantification Report Date 10/23/2008 Time 13:13:40 Page 1 of 1  
 Ensayo de repetibilidad de ciprofloxacina 500 mg lote2329

*Introducción*

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.SD Created : 10/23/08 11:57:26

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation:  $\text{Conc.} = 8.40090 \text{ ug/ml} * \text{net Abs}$

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MTA 4UG/ML	1.00000		4.10530	0.48868	7.7872E-3
2	MTA 6UG/ML	1.00000		6.27500	0.74694	1.7861E-2
3	MTA 8UG/ML	1.00000		8.06280	0.95976	2.1043E-2
4	MTA 4 UG/ML	1.00000		3.95310	0.47056	-1.5559E-3
5	MTA 6UG/ML	1.00000		6.02720	0.71745	2.0086E-2
6	MTA 8UG/ML	1.00000		8.33800	0.99252	1.7102E-2
7	MTA 4UG/ML	1.00000		4.13320	0.49200	1.4048E-2
8	MTA 6UG/ML	1.00000		6.02780	0.71753	1.4936E-2
9	MTA 8UG /ML	1.00000		8.43440	1.00400	1.2531E-2
10	MTA 4UG/ML	1.00000		3.97010	0.47258	-3.5653E-3
11	MTA 6 UG/ML	1.00000		5.99530	0.71365	-3.6383E-4
12	MTA 8UG/ML	1.00000		8.04150	0.95722	1.6786E-2
13	MTA 4UG/ML	1.00000		4.05630	0.48285	-5.3406E-5
14	MTA 6UG/ML	1.00000		5.94050	0.70713	3.6631E-3
15	MTA 8UG/ML	1.00000		8.14190	0.96918	6.6600E-3
16	MTA 4UG/ML	1.00000		3.98700	0.47459	8.7461E-3
17	MTA 6UG/ML	1.00000		6.10330	0.72651	1.7874E-2
18	MTA8UG/ML	1.00000		7.82550	0.93151	1.2818E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....



Spectrophotometer

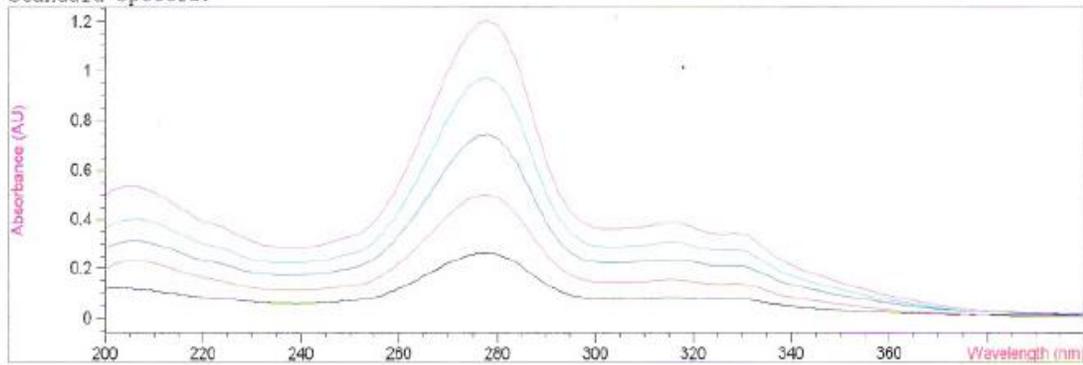
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

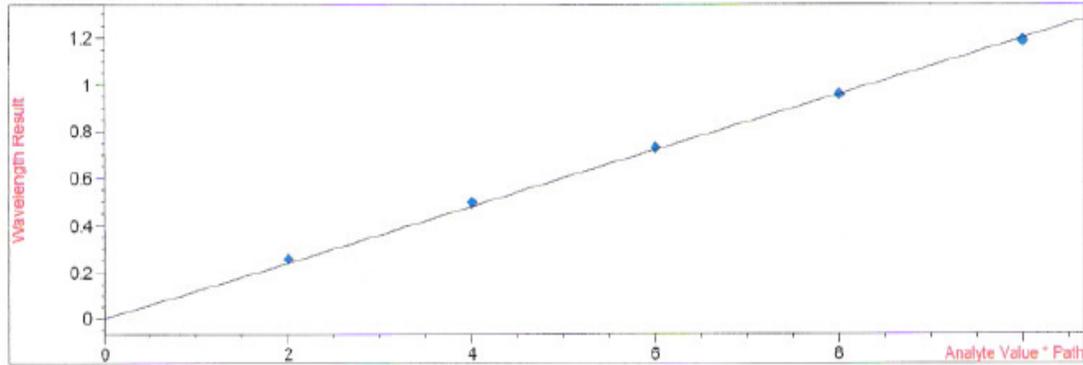
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 08:53:32 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99976

Calibration equation : Conc. = 8.34140 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.25553	6.3624E-3	-6.17
2	STD2	4.00000	0.49609	2.0251E-3	-3.34
3	STD3	6.00000	0.72681	1.0870E-2	-1.03
4	STD4	8.00000	0.95645	7.6828E-3	0.27
5	STD5	10.00000	1.18600	8.9054E-3	1.08



=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 10:04:40 Page 1 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : B.GUTIERREZ  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

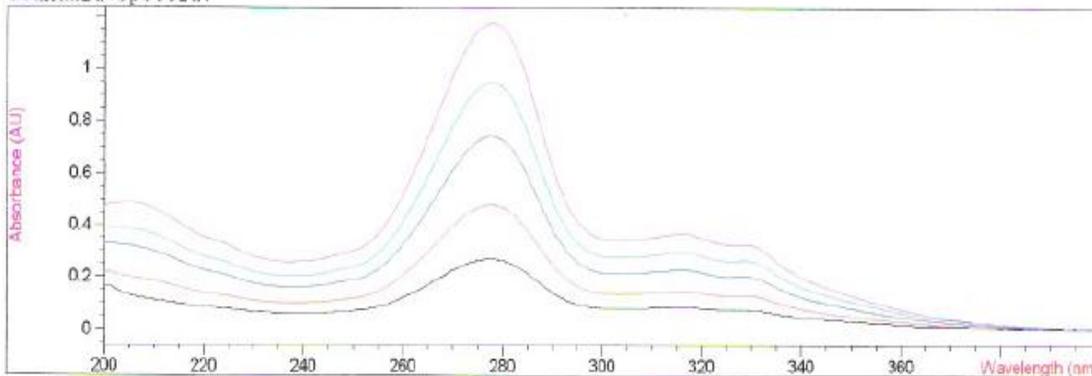
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

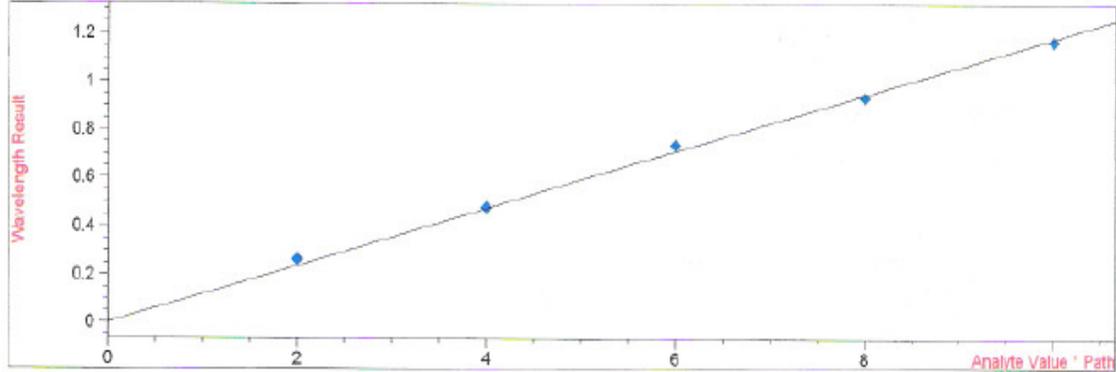
Standard Spectra:





Quantification Method SISTEMA Date 10/30/2008 Time 10:04:40 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99946  
Calibration equation : Conc. = 8.44700 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.26265	5.9457E-3	-9.85
2	STD2	4.00000	0.47632	1.7061E-3	-0.58
3	STD3	6.00000	0.73614	2.2416E-3	-3.51
4	STD4	8.00000	0.93430	5.9009E-3	1.37
5	STD5	10.00000	1.17090	9.0170E-4	1.11

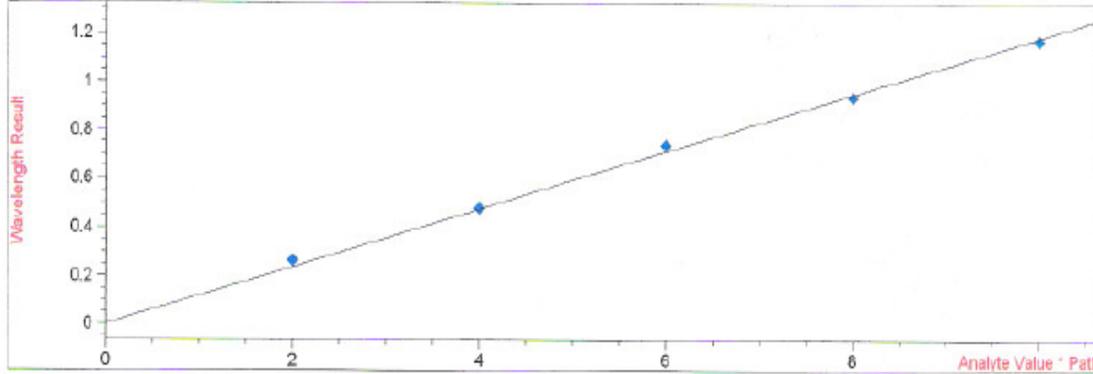
Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 9:57:29 AM

Operator: GISELA GARCIA



Quantification Method **SISTEMA** Date 10/30/2008 Time 10:04:40 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99946  
Calibration equation : Conc. = 8.44700 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.26265	5.9457E-3	-9.65
2	STD2	4.00000	0.47632	1.7061E-3	-0.58
3	STD3	6.00000	0.73614	2.2416E-3	-3.51
4	STD4	8.00000	0.93430	5.9009E-3	1.37
5	STD5	10.00000	1.17090	9.0170E-4	1.11

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 9:57:29 AM

Operator: GISELA GARCIA



=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 10:23:53 Page 1 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

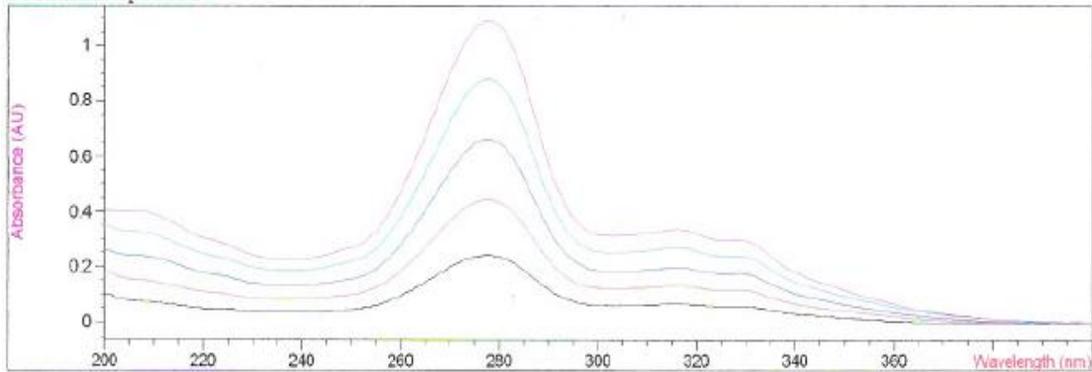
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

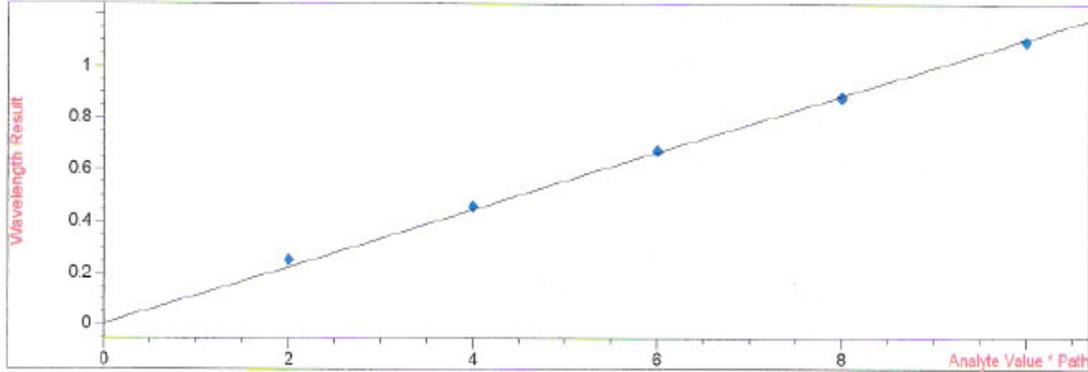
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 10:23:53 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99960  
Calibration equation : Conc. = 9.06420 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%ERROR
1	STD1	2.00000	0.24911	-8.2889E-3	-11.43
2	STD2	4.00000	0.45262	-8.2283E-3	-2.50
3	STD3	6.00000	0.66677	-6.7692E-3	-0.72
4	STD4	8.00000	0.87553	-2.4352E-3	0.81
5	STD5	10.00000	1.09480	-5.6577E-3	0.77

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 10:22:30 AM Operator: B.GUTIERREZ



---

Quantification Method Date 10/30/2008 Time 14:55:54 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500 MG LOTE 2329

---

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

Prompt for standard information: on

Spectrophotometer

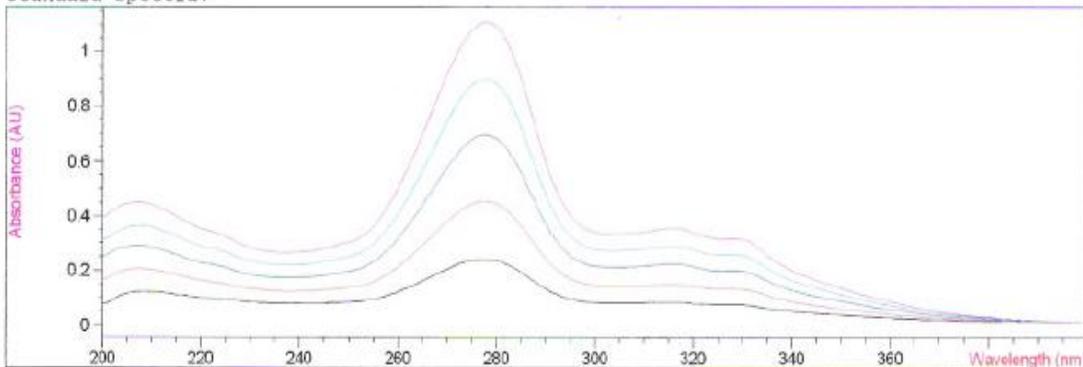
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

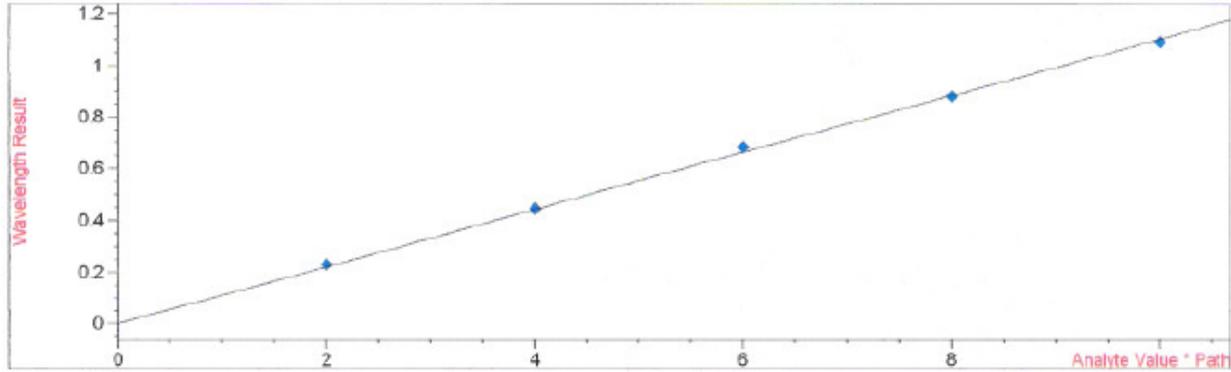
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 14:55:54 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500 MG LOTE 2329

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99979

Calibration equation : Conc. = 9.04140 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.22925	1.1583E-2	-3.51
2	STD2	4.00000	0.44360	1.0777E-2	-0.27
3	STD3	6.00000	0.68274	1.0786E-2	-2.80
4	STD4	8.00000	0.88163	1.2335E-2	0.36
5	STD5	10.00000	1.09450	1.1040E-2	1.05

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 2:52:41 PM

Operator: B.GUTIERREZ



---

Quantification Method Date 10/30/2008 Time 12:07:45 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329

---

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : B.GUTIERREZ  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

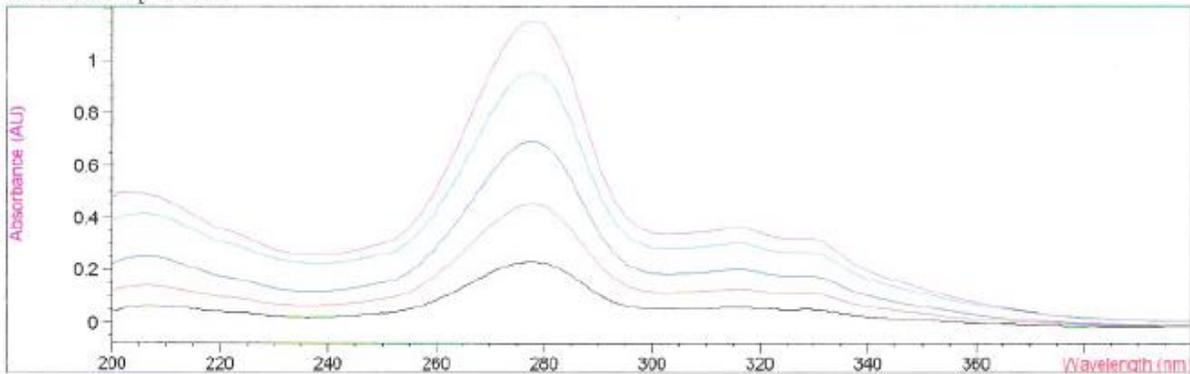
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

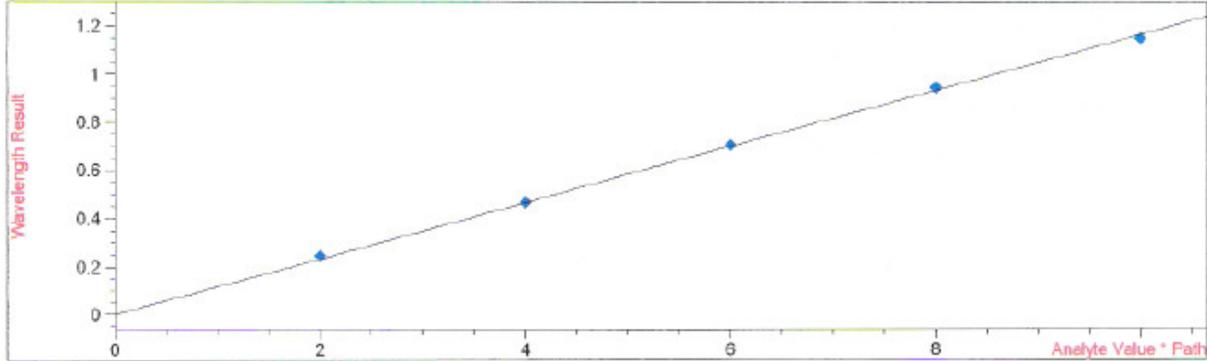
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 12:07:45 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99980  
Calibration equation : Conc. = 8.58670 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.24674	-1.4079E-2	-5.60
2	STD2	4.00000	0.46554	-1.2799E-2	0.06
3	STD3	6.00000	0.70222	-1.1772E-2	-0.49
4	STD4	8.00000	0.94399	8.2378E-3	-1.30
5	STD5	10.00000	1.14950	1.9593E-3	1.31

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 12:06:34 PM Operator: B.GUTIERREZ



=====  
Quantification Method Date 10/24/2008 Time 17:24:06 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO DE CIPROFLOXACINA 500mg  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

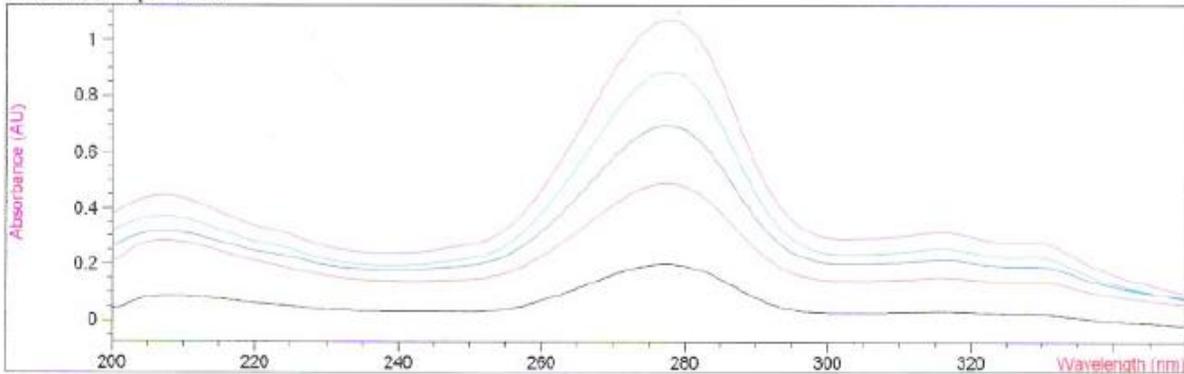
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 350 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

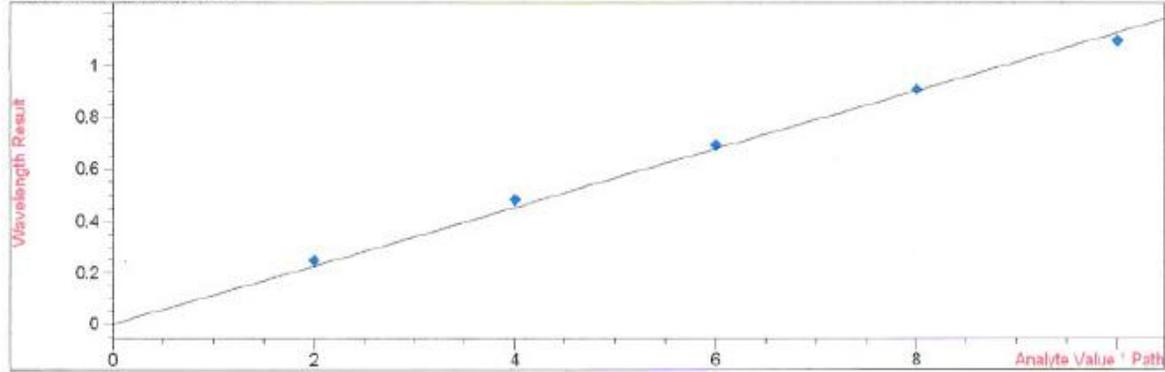
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/24/2008 Time 17:24:06 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO DE CIPROFLOXACINA 500mg

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99907  
Calibration equation : Conc. = 8.88040 ug/ml + net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD 1	2.00000	0.24753	-4.6509E-2	-9.01
2	STD 2	4.00000	0.48031	1.1187E-2	-6.22
3	STD 3	6.00000	0.68919	4.3273E-3	-1.97
4	STD 4	8.00000	0.90541	-2.3024E-2	-0.61
5	STD 5	10.00000	1.09480	-2.4508E-2	2.86

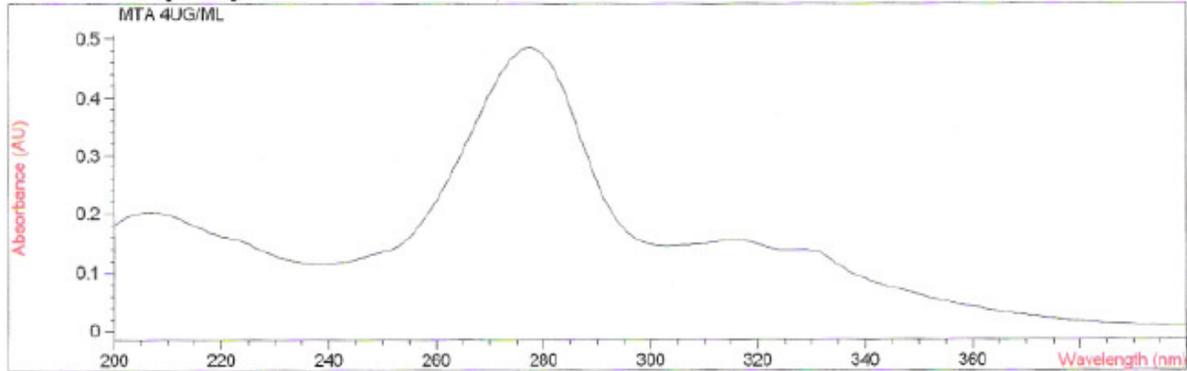


=====  
Quantification Report Date 10/23/2008 Time 09:28:52 Page 1 of 1  
ENSAYO DE EXACTITUD DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329  
=====

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\claritro.SD Created : 10/23/08 9:27:27

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MTA 4UG/ML	1.00000	3.98700	0.47459	8.7461E-3

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

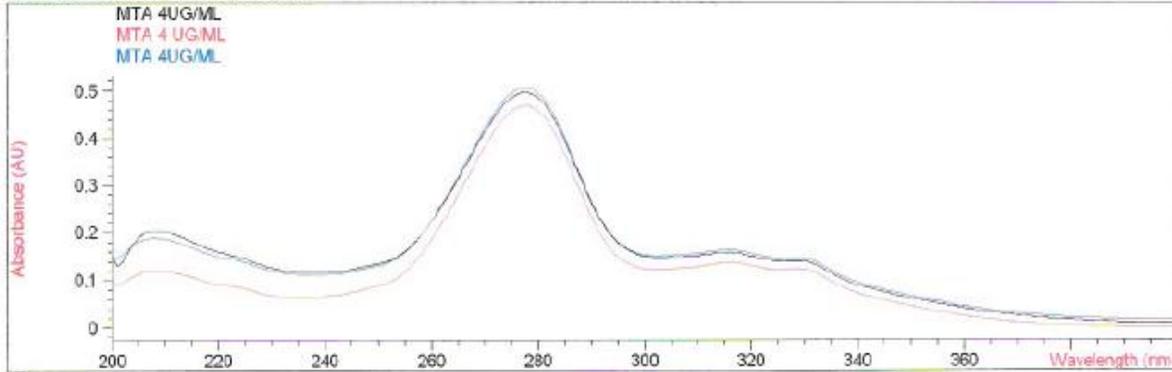


=====  
Quantification Report Date 10/23/2008 Time 13:19:48 Page 1 of 1  
Ensayo de exactitud de ciprofloxacina 500 mg lote2329  
=====

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM  
Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.SD Created : 10/23/08 11:57:26

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml + net Abs

Calibrated at : Date 10/9/2008 Time 4:20:45 PM Operator: G.ORTIZ

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MTA 4UG/ML	1.00000		4.10530	0.48868	7.7872E-3
2	MTA 4 UG/ML	1.00000		3.95310	0.47056	-1.5559E-3
3	MTA 4UG/ML	1.00000		4.13320	0.49200	1.4048E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

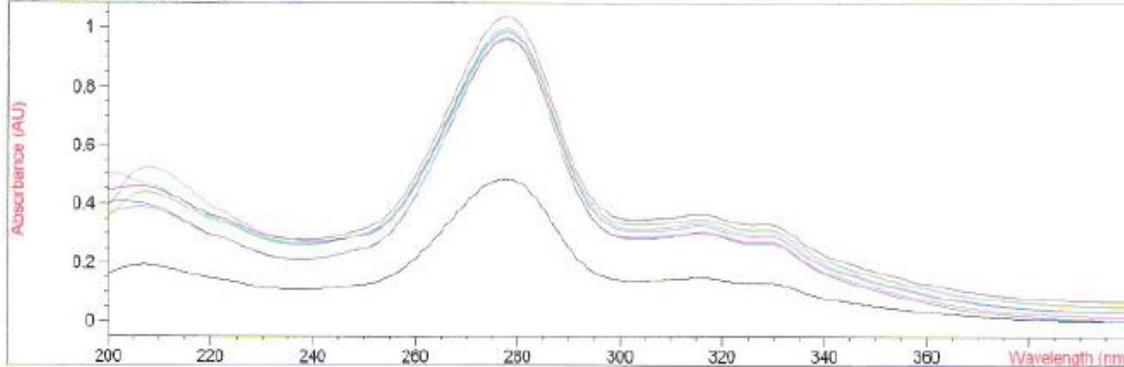


Quantification Report Date 10/31/2008 Time 15:46:58 Page 1 of 1  
 ENSAYO DE EXACTITUD DE CIPROFLOXACINA DE 500MG LOTE 2329

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 10/31/2008 Time 3:18:40 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.3D Created : 10/16/08 9:27:37

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/31/2008 Time 3:18:40 PM Operator: OSCAR R.

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	4UG /ML	1.00000	4.04440	0.48142	3.6950E-3
2	MTA +STD	1.00000	7.93890	0.94502	1.5192E-2
3	MTA+STD	1.00000	8.06560	0.96010	3.4146E-3
4	MTA+ STD	1.00000	7.99870	0.95212	3.3154E-2
5	MTA+SDF	1.00000	7.98260	0.95021	3.1807E-2
6	MTA+SDF	1.00000	7.93210	0.94420	5.1725E-2
7	MTA+STD	1.00000	8.12710	0.96742	6.7813E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

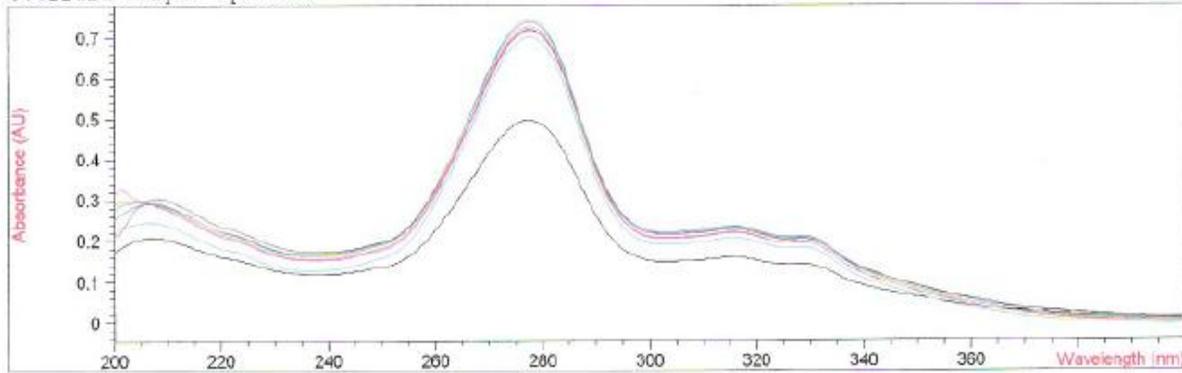


Quantification Report Date 10/31/2008 Time 16:50:45 Page 1 of 1  
ENSAYO DE EXACTITUD CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 10/31/2008 Time 4:42:02 PM  
Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROB2.SD Created : 10/10/08 9:28:27

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 10/31/2008 Time 4:42:02 PM Operator: B.GUTIERREZ

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MUESTRA 4UG/ML	1.00000		4.11660	0.49003	8.0843E-3
2	MTA+STD	1.00000		6.11710	0.72816	-3.0041E-3
3	MTA+STD	1.00000		6.09870	0.72596	1.0046E-2
4	MTA+STD	1.00000		5.93050	0.70594	-7.2279E-3
5	MTA+STD	1.00000		6.00810	0.71517	6.7043E-4
6	MTA+STD	1.00000		6.20770	0.73894	3.2654E-3
7	MTA+STD	1.00000		5.95350	0.70868	9.5558E-3

Report generated by : B.GUTIERREZ

Signature: .....



=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 09:13:33 Page 1 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

Prompt for standard information: on

Spectrophotometer

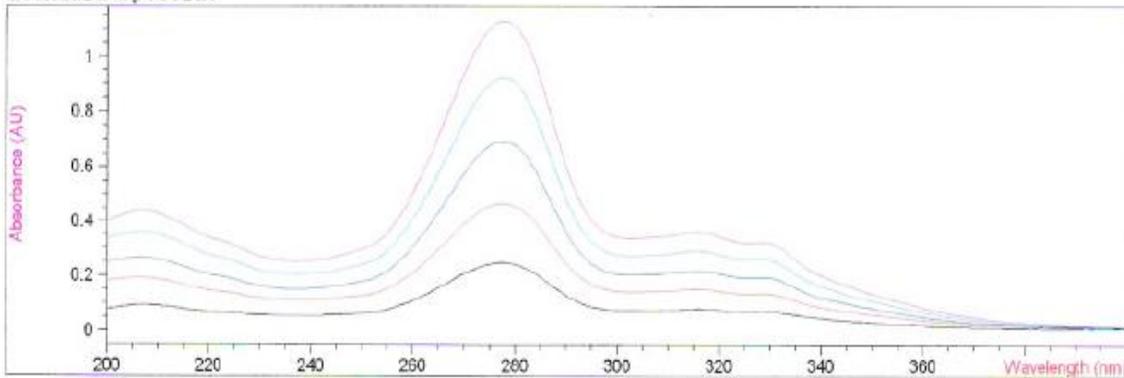
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

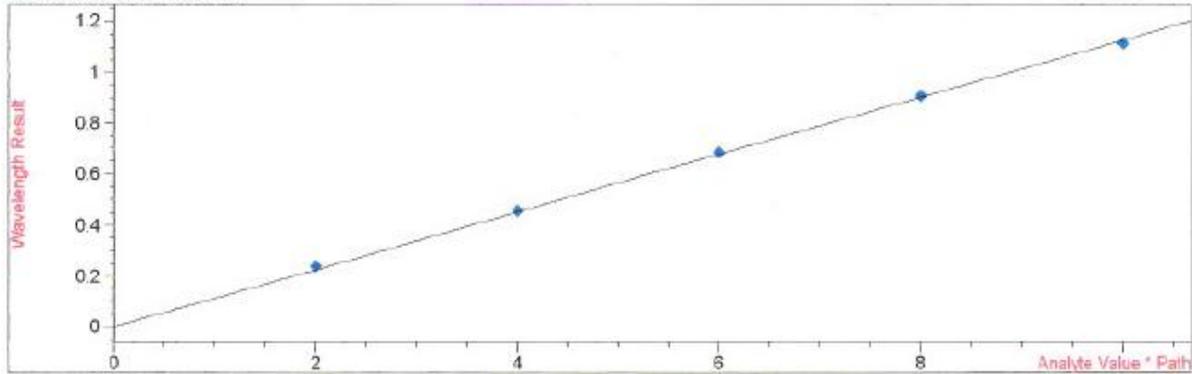
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 09:13:33 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL METODO CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99987

Calibration equation : Conc. = 8.85760 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.23861	7.0748E-3	-5.37
2	STD2	4.00000	0.45501	1.0202E-2	-0.75
3	STD3	6.00000	0.68351	6.8793E-3	-0.90
4	STD4	8.00000	0.90771	9.4872E-3	-0.50
5	STD5	10.00000	1.11740	1.1552E-2	1.03



---

Quantification Method Date 10/30/2008 Time 10:47:36 Page 1 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA CIPROFLOXACINA 500MG

---

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : B.GUTIERREZ  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

Prompt for standard information: on

**Spectrophotometer**

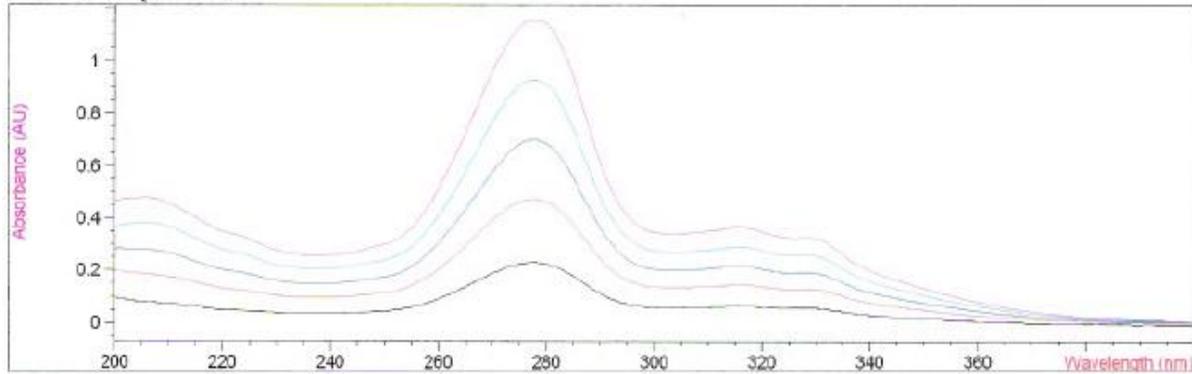
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

**Data Analysis**

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

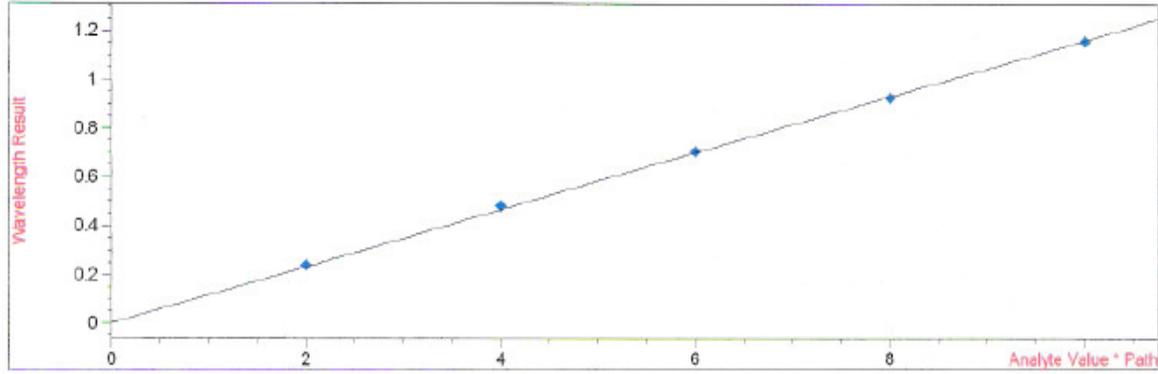
**Standard Spectra:**





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 10:47:36 Page 2 of 2  
ENSAYO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA CIPROFLOXACINA 500MG

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99990  
Calibration equation : Conc. = 8.60810 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD	2.00000	0.23785	-9.4180E-3	-2.32
2	STD2	4.00000	0.47851	-3.2501E-3	-2.89
3	STD3	6.00000	0.70138	-2.2297E-3	-0.62
4	STD4	8.00000	0.92327	1.2321E-3	0.66
5	STD5	10.00000	1.15710	1.9846E-3	0.40

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 10:46:45 AM Operator: GISELA GARCIA



=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 11:24:24 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

Prompt for standard information: on

Spectrophotometer

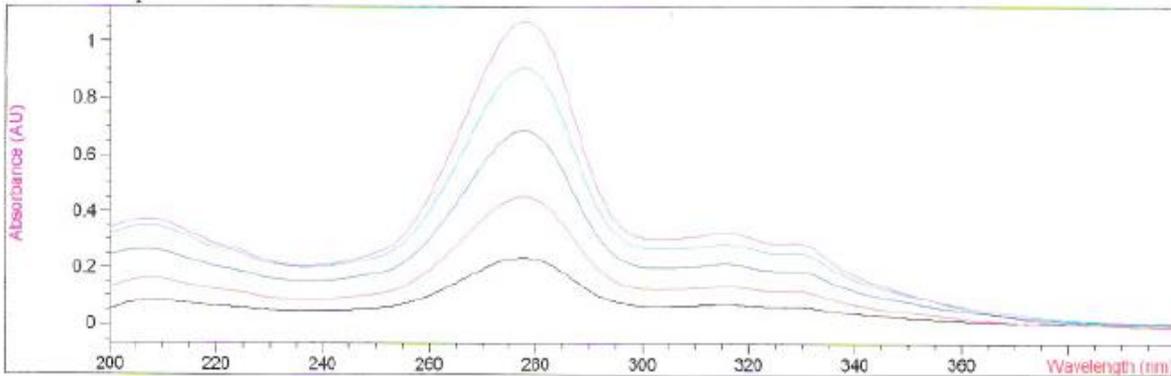
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

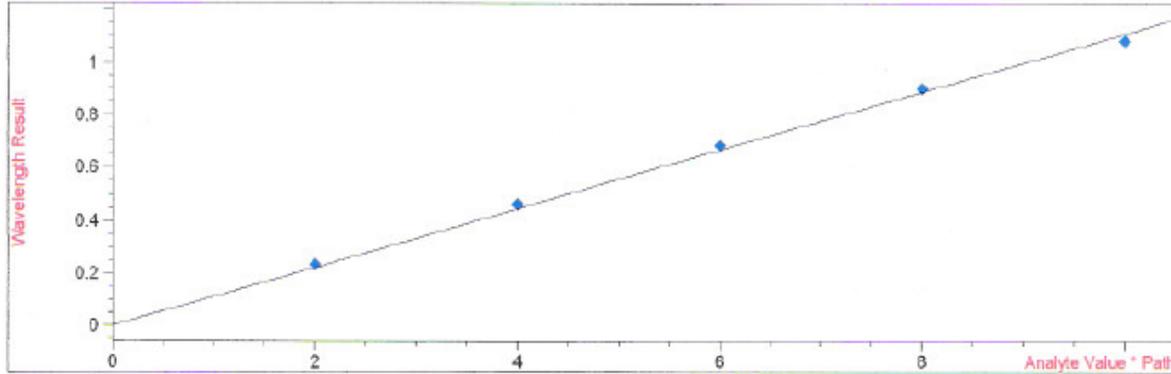
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 11:24:24 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99944

Calibration equation : Conc. = 9.01330 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.23415	-7.0953E-4	-5.23
2	STD2	4.00000	0.45889	-7.5054E-3	-3.29
3	STD3	6.00000	0.68107	2.0037E-3	-2.26
4	STD4	8.00000	0.89878	3.4699E-3	-1.25
5	STD5	10.00000	1.08140	-1.1847E-2	2.59



---

Quantification Method Date 10/30/2008 Time 11:42:40 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO DE CIPROFLOXACINA 500MG LOTE 2329

---

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

Prompt for standard information: on

Spectrophotometer

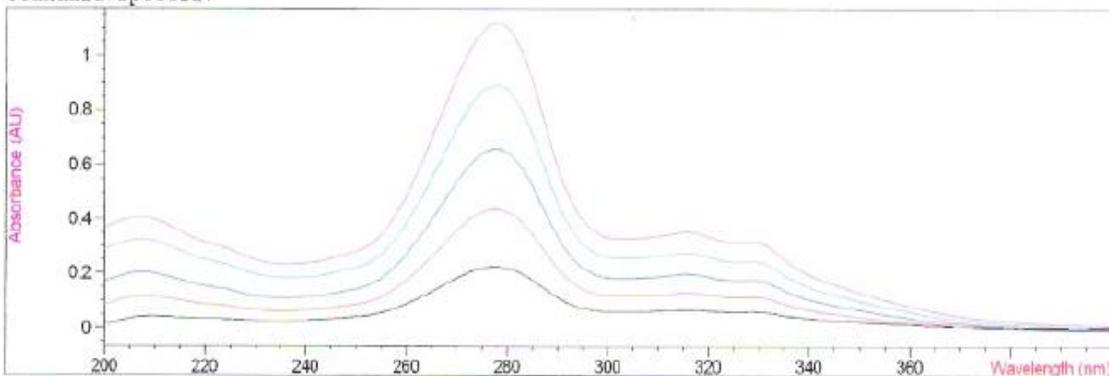
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis

Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

Standard Spectra:





=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 13:56:20 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO LOTE 2329  
=====

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : GISELA GARCIA  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

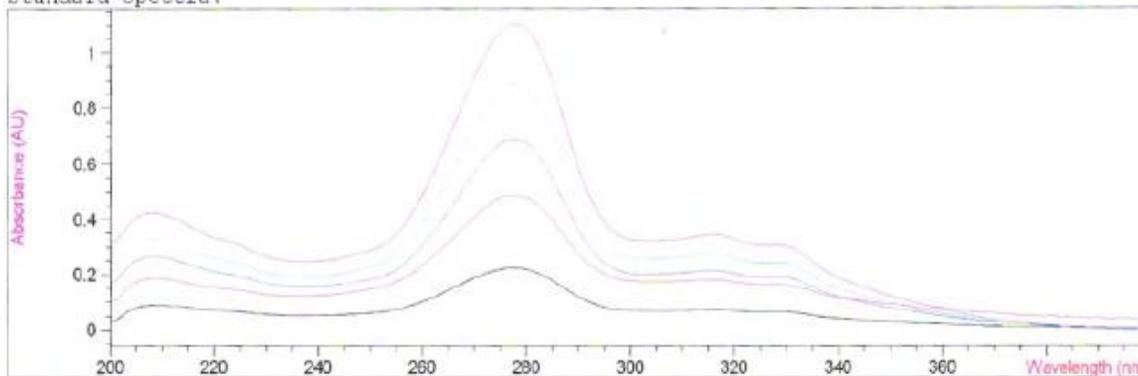
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

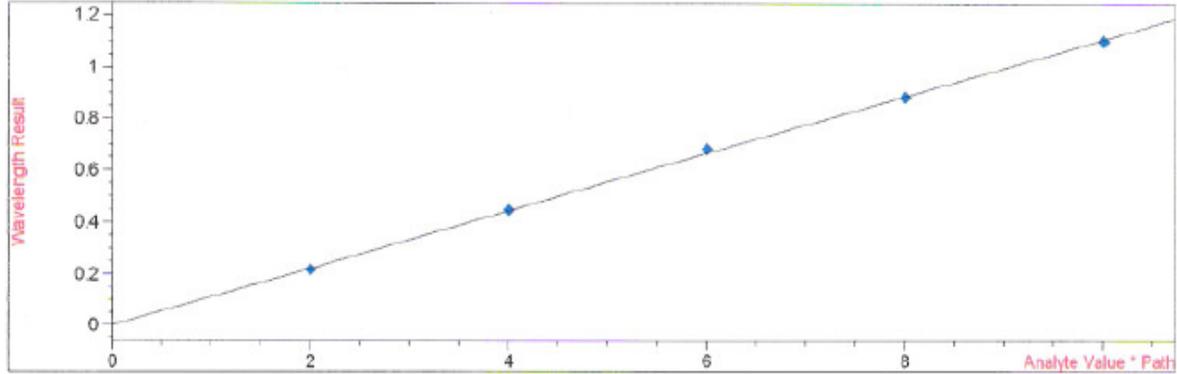
Standard Spectra:





Quantification Method Date 10/30/2008 Time 13:54:46 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL METODO LOTE 2329

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99987

Calibration equation : Conc. = 9.02130 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.21716	6.7053E-3	2.09
2	STD2	4.00000	0.44566	4.1507E-2	-0.51
3	STD3	6.00000	0.68081	5.2166E-3	-2.31
4	STD4	8.00000	0.88425	-2.6846E-4	0.29
5	STD	10.00000	1.10080	1.3232E-3	0.70

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 1:52:13 PM

Operator: GISELA GARCIA



---

Quantification Method Date 10/30/2008 Time 14:19:17 Page 1 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA CIPROFLOXACINA 500 MG LOTE 2329

---

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Operator : B.GUTIERREZ  
Product : UV-Visible ChemStation

Prompt for sample information : on

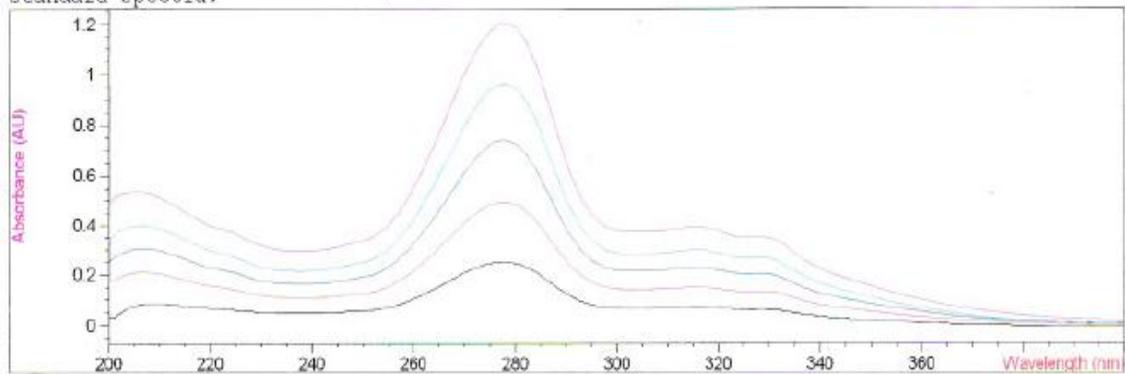
Prompt for standard information: on

Spectrophotometer  
Instrument : 8453  
Acquisition range : 190 to 1100 nm  
Interval : 1 nm  
Integration Time : 0.5 s  
Std. Deviation : On

Data Analysis  
Data Type : Absorbance  
Display spectrum : 200 to 400 nm  
Used Wavelength : 277 nm  
Background correction : single reference wavelength at 400 nm

Analyte name : Ciprofloxacina  
Concentration unit : ug/ml  
Calibration Curve : Linear (Beer's law)

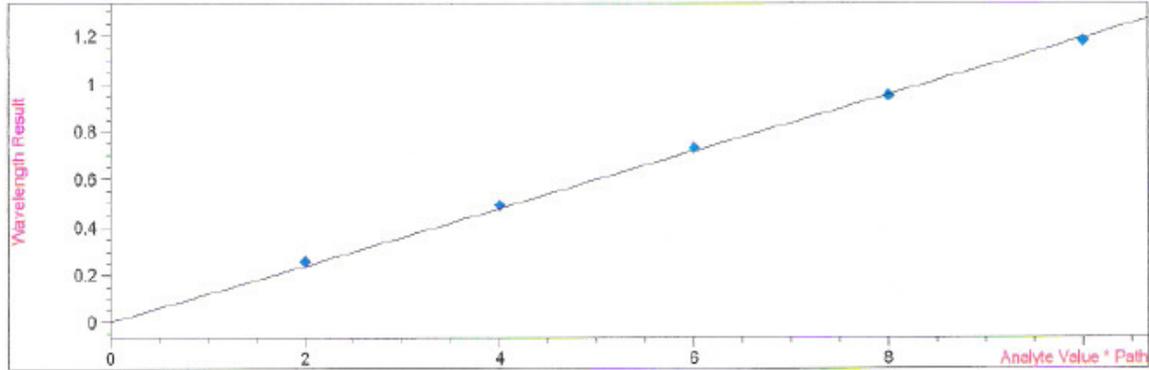
Standard Spectra:





=====  
Quantification Method Date 10/30/2008 Time 14:19:17 Page 2 of 2  
ENSAYO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA CIPROFLOXACINA 500 MG LOTE 2329  
=====

Calibration Curve:



Correlation coefficient: 0.99972

Calibration equation : Conc. = 8.36820 ug/ml \* net Abs

#	Standard Name	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>	%Error
1	STD1	2.00000	0.25744	-6.3944E-3	-7.16
2	STD2	4.00000	0.49184	2.1029E-4	-2.81
3	STD3	6.00000	0.72918	3.8524E-3	-1.67
4	STD4	8.00000	0.95090	3.4876E-3	0.54
5	STD5	10.00000	1.18180	1.8895E-2	1.12

Calibrated at: Date 10/30/2008 Time 2:13:28 PM

Operator: GISELA GARCIA



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 1 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Tabular Data of Overlaid Sample Spectra[1]

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
190.0	0.233229	3.93393E-3
191.0	0.222916	2.81904E-3
192.0	0.223323	2.08298E-3
193.0	0.226689	2.35693E-3
194.0	0.222003	2.09407E-3
195.0	0.222648	1.79273E-3
196.0	0.219528	1.36242E-3
197.0	0.219146	1.72455E-3
198.0	0.220547	1.13232E-3
199.0	0.233172	1.05413E-3
200.0	0.245977	3.22229E-4
201.0	0.251972	1.36202E-4
202.0	0.254146	8.37864E-5
203.0	0.255195	8.89298E-5
204.0	0.256547	9.37734E-5
205.0	0.257572	7.30371E-5
206.0	0.257765	5.20725E-5
207.0	0.256701	4.48138E-5
208.0	0.254370	6.10324E-5
209.0	0.250982	5.24055E-5
210.0	0.246261	4.79559E-5
211.0	0.240846	5.38826E-5
212.0	0.234501	4.39997E-5
213.0	0.227850	3.91522E-5
214.0	0.220781	3.97008E-5
215.0	0.213724	3.85258E-5
216.0	0.206649	4.30885E-5
217.0	0.199158	4.07263E-5
218.0	0.192234	3.07551E-5
219.0	0.186258	3.27242E-5
220.0	0.181498	4.76181E-5
221.0	0.177824	5.88232E-5
222.0	0.174513	5.39090E-5
223.0	0.171002	4.40488E-5
224.0	0.166702	4.13503E-5
225.0	0.161641	5.08027E-5
226.0	0.156008	5.40038E-5
227.0	0.150257	5.61272E-5
228.0	0.144938	4.52405E-5
229.0	0.140140	4.43907E-5
230.0	0.136421	4.57851E-5
231.0	0.133304	6.16431E-5
232.0	0.130827	4.93382E-5
233.0	0.128889	3.77553E-5
234.0	0.127554	3.70693E-5
235.0	0.126670	2.85849E-5
236.0	0.126154	2.46392E-5
237.0	0.126165	3.57922E-5
238.0	0.126523	3.42486E-5
239.0	0.127244	2.70482E-5
240.0	0.128126	2.94097E-5
241.0	0.129332	4.09053E-5
242.0	0.130734	4.24305E-5
243.0	0.132704	3.40137E-5
244.0	0.135160	4.34864E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:46:35 Page 3 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
303.0	0.181624	7.05236E-5
304.0	0.182204	7.14556E-5
305.0	0.182740	6.39780E-5
306.0	0.183331	8.74395E-5
307.0	0.184009	8.43031E-5
308.0	0.185157	7.32919E-5
309.0	0.186332	7.68744E-5
310.0	0.187796	9.70829E-5
311.0	0.189461	7.90903E-5
312.0	0.191617	6.94875E-5
313.0	0.193777	7.67723E-5
314.0	0.195857	5.36225E-5
315.0	0.197247	7.71725E-5
316.0	0.197659	7.40772E-5
317.0	0.196538	6.54849E-5
318.0	0.193926	8.28860E-5
319.0	0.190354	7.44065E-5
320.0	0.186099	9.69540E-5
321.0	0.181939	6.68593E-5
322.0	0.178442	6.99782E-5
323.0	0.175384	7.40619E-5
324.0	0.173280	6.10389E-5
325.0	0.172123	7.19503E-5
326.0	0.171944	7.00415E-5
327.0	0.172315	6.15101E-5
328.0	0.173114	8.01384E-5
329.0	0.173240	9.00402E-5
330.0	0.171567	5.45129E-5
331.0	0.167356	4.77683E-5
332.0	0.160671	5.16439E-5
333.0	0.152082	5.80382E-5
334.0	0.142377	7.02749E-5
335.0	0.132592	4.79215E-5
336.0	0.123283	5.39764E-5
337.0	0.114994	6.92088E-5
338.0	0.107676	6.31445E-5
339.0	0.101086	4.67361E-5
340.0	9.54990E-2	5.96828E-5
341.0	9.02925E-2	5.49191E-5
342.0	8.54983E-2	4.22674E-5
343.0	8.09994E-2	5.38710E-5
344.0	7.67355E-2	5.92373E-5
345.0	7.26256E-2	6.11022E-5
346.0	6.86235E-2	6.35322E-5
347.0	6.47740E-2	4.94935E-5
348.0	6.08978E-2	5.53963E-5
349.0	5.71527E-2	5.67526E-5
350.0	5.35822E-2	7.56550E-5
351.0	4.99263E-2	6.53075E-5
352.0	4.63457E-2	7.18697E-5
353.0	4.30241E-2	5.90066E-5
354.0	3.97930E-2	5.16109E-5
355.0	3.66917E-2	5.72155E-5
356.0	3.41749E-2	7.62746E-5
357.0	3.15862E-2	7.91176E-5
358.0	2.94152E-2	7.29623E-5
359.0	2.43092E-2	7.50197E-5
360.0	2.07624E-2	7.41616E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 4 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
361.0	1.86887E-2	9.10322E-5
362.0	1.67251E-2	9.43391E-5
363.0	1.41359E-2	9.51072E-5
364.0	1.17717E-2	1.16869E-4
365.0	9.57632E-3	1.01240E-4
366.0	7.77102E-3	7.42994E-5
367.0	6.02150E-3	6.97520E-5
368.0	3.66974E-3	5.39427E-5
369.0	1.65224E-3	6.33745E-5
370.0	-3.09944E-5	1.10423E-4
371.0	-1.50537E-3	8.95083E-5
372.0	-3.01170E-3	8.24225E-5
373.0	-4.12607E-3	9.65357E-5
374.0	-5.67532E-3	9.88860E-5
375.0	-6.55365E-3	7.32593E-5
376.0	-8.25644E-3	6.18254E-5
377.0	-8.93831E-3	6.99571E-5
378.0	-1.00818E-2	7.53327E-5
379.0	-1.06821E-2	8.34261E-5
380.0	-1.22643E-2	1.02818E-4
381.0	-1.28126E-2	9.59119E-5
382.0	-1.32909E-2	1.27111E-4
383.0	-1.44858E-2	9.30896E-5
384.0	-1.52402E-2	7.85277E-5
385.0	-1.59092E-2	7.98200E-5
386.0	-1.64194E-2	1.11026E-4
387.0	-1.64714E-2	6.98009E-5
388.0	-1.69992E-2	6.08234E-5
389.0	-1.83139E-2	1.04289E-4
390.0	-1.87168E-2	8.06419E-5
391.0	-1.85261E-2	8.87916E-5
392.0	-1.81479E-2	7.20971E-5
393.0	-1.91712E-2	7.97588E-5
394.0	-1.97392E-2	1.06620E-4
395.0	-2.01473E-2	8.93354E-5
396.0	-2.02227E-2	8.78598E-5
397.0	-1.99151E-2	7.66137E-5
398.0	-1.97673E-2	7.13633E-5
399.0	-2.08306E-2	7.79115E-5
400.0	-2.14047E-2	8.98329E-5
401.0	-2.12145E-2	9.40107E-5
402.0	-2.12631E-2	7.16526E-5
403.0	-2.11635E-2	7.34438E-5
404.0	-2.08077E-2	6.36984E-5
405.0	-2.07548E-2	8.76110E-5
406.0	-2.16360E-2	7.84828E-5
407.0	-2.20685E-2	6.69035E-5
408.0	-2.15354E-2	8.76162E-5
409.0	-2.16141E-2	8.74057E-5
410.0	-2.20237E-2	5.80088E-5
411.0	-2.18883E-2	5.47730E-5
412.0	-2.12440E-2	6.45177E-5
413.0	-2.14777E-2	7.52678E-5
414.0	-2.21295E-2	6.83725E-5
415.0	-2.19789E-2	6.12638E-5
416.0	-2.19564E-2	5.57247E-5
417.0	-2.19369E-2	3.97330E-5
418.0	-2.18515E-2	4.21624E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 5 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
419.0	-2.19512E-2	6.89290E-5
420.0	-2.14381E-2	8.36859E-5
421.0	-2.09169E-2	6.26837E-5
422.0	-2.13580E-2	8.29998E-5
423.0	-2.19169E-2	8.41141E-5
424.0	-2.23646E-2	6.27997E-5
425.0	-2.24466E-2	6.39051E-5
426.0	-2.20466E-2	5.84198E-5
427.0	-2.12350E-2	5.33941E-5
428.0	-2.20056E-2	5.99953E-5
429.0	-2.15898E-2	5.64433E-5
430.0	-2.11563E-2	6.48411E-5
431.0	-2.26440E-2	6.23381E-5
432.0	-2.27156E-2	6.24129E-5
433.0	-2.16451E-2	8.98455E-5
434.0	-2.24504E-2	6.85535E-5
435.0	-2.29959E-2	6.69782E-5
436.0	-2.20490E-2	6.98595E-5
437.0	-2.23560E-2	7.14317E-5
438.0	-2.21190E-2	6.80141E-5
439.0	-2.22239E-2	6.23983E-5
440.0	-2.20842E-2	4.79014E-5
441.0	-2.14763E-2	3.95480E-5
442.0	-2.24624E-2	3.49688E-5
443.0	-2.24566E-2	6.36144E-5
444.0	-2.21043E-2	7.06186E-5
445.0	-2.24657E-2	5.40900E-5
446.0	-2.23923E-2	4.23218E-5
447.0	-2.24376E-2	3.99129E-5
448.0	-2.24247E-2	4.71068E-5
449.0	-2.20799E-2	5.61728E-5
450.0	-2.22430E-2	8.74681E-5
451.0	-2.23179E-2	6.11245E-5
452.0	-2.22993E-2	4.36781E-5
453.0	-2.23727E-2	5.14200E-5
454.0	-2.21248E-2	5.93801E-5
455.0	-2.19450E-2	5.43730E-5
456.0	-2.21925E-2	6.54414E-5
457.0	-2.18697E-2	5.24521E-5
458.0	-2.17295E-2	5.38404E-5
459.0	-2.18916E-2	7.23301E-5
460.0	-2.21572E-2	6.55941E-5
461.0	-2.21291E-2	7.34716E-5
462.0	-2.21796E-2	6.64055E-5
463.0	-2.14295E-2	8.45186E-5
464.0	-2.11229E-2	7.37804E-5
465.0	-2.14992E-2	7.27657E-5
466.0	-2.20313E-2	7.21491E-5
467.0	-2.21634E-2	6.32919E-5
468.0	-2.17190E-2	4.76324E-5
469.0	-2.21338E-2	5.52802E-5
470.0	-2.19698E-2	6.74602E-5
471.0	-2.18663E-2	6.12137E-5
472.0	-2.15068E-2	7.53825E-5
473.0	-2.15940E-2	7.54262E-5
474.0	-2.19393E-2	6.77914E-5
475.0	-2.17595E-2	5.86422E-5
476.0	-2.19240E-2	6.84274E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 6 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
477.0	-2.17919E-2	7.61030E-5
478.0	-2.16603E-2	5.36765E-5
479.0	-2.19026E-2	6.69256E-5
480.0	-2.19469E-2	6.56097E-5
481.0	-2.19584E-2	6.67627E-5
482.0	-2.18558E-2	7.11495E-5
483.0	-2.18558E-2	5.88908E-5
484.0	-2.14710E-2	7.08549E-5
485.0	-1.96195E-2	4.93152E-5
486.0	-2.15073E-2	4.58434E-5
487.0	-2.53286E-2	7.44630E-5
488.0	-2.28667E-2	8.36846E-5
489.0	-2.19374E-2	5.10572E-5
490.0	-2.17056E-2	5.31818E-5
491.0	-2.18372E-2	5.42684E-5
492.0	-2.16203E-2	6.52117E-5
493.0	-2.18120E-2	4.01224E-5
494.0	-2.17905E-2	2.73283E-5
495.0	-2.20041E-2	6.92498E-5
496.0	-2.14911E-2	9.47167E-5
497.0	-2.19226E-2	8.09402E-5
498.0	-2.16327E-2	6.29804E-5
499.0	-2.15359E-2	5.79077E-5
500.0	-2.16870E-2	5.00304E-5
501.0	-2.14534E-2	5.39954E-5
502.0	-2.14615E-2	7.63922E-5
503.0	-2.16026E-2	6.35984E-5
504.0	-2.16565E-2	5.33855E-5
505.0	-2.15006E-2	8.74655E-5
506.0	-2.14639E-2	7.43591E-5
507.0	-2.16842E-2	7.09991E-5
508.0	-2.14448E-2	7.22640E-5
509.0	-2.14772E-2	4.91235E-5
510.0	-2.13299E-2	5.25236E-5
511.0	-2.12913E-2	6.89026E-5
512.0	-2.13647E-2	7.39467E-5
513.0	-2.13199E-2	5.32619E-5
514.0	-2.13761E-2	4.79820E-5
515.0	-2.12593E-2	6.95905E-5
516.0	-2.13494E-2	7.78049E-5
517.0	-2.13251E-2	7.86593E-5
518.0	-2.12269E-2	7.67500E-5
519.0	-2.11911E-2	8.57326E-5
520.0	-2.13566E-2	6.30291E-5
521.0	-2.12431E-2	4.98950E-5
522.0	-2.13513E-2	4.86666E-5
523.0	-2.11997E-2	6.00181E-5
524.0	-2.11372E-2	6.52013E-5
525.0	-2.12350E-2	5.44942E-5
526.0	-2.12522E-2	5.17121E-5
527.0	-2.12779E-2	5.37865E-5
528.0	-2.11887E-2	5.99195E-5
529.0	-2.11811E-2	5.10561E-5
530.0	-2.13656E-2	6.18622E-5
531.0	-2.14310E-2	5.13890E-5
532.0	-2.13408E-2	5.41961E-5
533.0	-2.12202E-2	7.27360E-5
534.0	-2.13308E-2	6.46198E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 7 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
535.0	-2.12955E-2	5.68977E-5
536.0	-2.13819E-2	5.57767E-5
537.0	-2.13523E-2	5.08106E-5
538.0	-2.12479E-2	5.95550E-5
539.0	-2.13914E-2	5.05459E-5
540.0	-2.14243E-2	4.96712E-5
541.0	-2.13761E-2	4.67325E-5
542.0	-2.13790E-2	4.03160E-5
543.0	-2.12989E-2	5.93294E-5
544.0	-2.13857E-2	6.25966E-5
545.0	-2.14815E-2	4.32859E-5
546.0	-2.14605E-2	4.37548E-5
547.0	-2.12307E-2	6.56859E-5
548.0	-2.13380E-2	4.73991E-5
549.0	-2.15130E-2	5.15448E-5
550.0	-2.14252E-2	4.93659E-5
551.0	-2.13284E-2	5.11495E-5
552.0	-2.12493E-2	4.00550E-5
553.0	-2.15387E-2	4.50251E-5
554.0	-2.15287E-2	5.35758E-5
555.0	-2.12984E-2	4.27009E-5
556.0	-2.14109E-2	3.76082E-5
557.0	-2.13814E-2	4.72105E-5
558.0	-2.14114E-2	4.89473E-5
559.0	-2.13814E-2	4.91165E-5
560.0	-2.12259E-2	4.73283E-5
561.0	-2.14696E-2	4.09678E-5
562.0	-2.14167E-2	4.15635E-5
563.0	-2.13170E-2	4.96346E-5
564.0	-2.12960E-2	4.82384E-5
565.0	-2.13990E-2	3.88951E-5
566.0	-2.13041E-2	3.87619E-5
567.0	-2.12140E-2	3.80567E-5
568.0	-2.14095E-2	2.73179E-5
569.0	-2.10376E-2	3.04733E-5
570.0	-2.14143E-2	3.90192E-5
571.0	-2.13242E-2	4.39454E-5
572.0	-2.15054E-2	4.48189E-5
573.0	-2.12860E-2	3.65940E-5
574.0	-2.11821E-2	2.75886E-5
575.0	-2.13766E-2	2.97751E-5
576.0	-2.13413E-2	2.55898E-5
577.0	-2.09746E-2	3.41779E-5
578.0	-2.17056E-2	3.56784E-5
579.0	-2.16603E-2	3.69741E-5
580.0	-2.15025E-2	3.95631E-5
581.0	-2.06194E-2	3.71704E-5
582.0	-2.19717E-2	2.96206E-5
583.0	-2.28796E-2	4.03583E-5
584.0	-2.12545E-2	3.66436E-5
585.0	-2.12703E-2	4.04385E-5
586.0	-2.21524E-2	3.44166E-5
587.0	-2.17323E-2	2.35902E-5
588.0	-2.17447E-2	3.38781E-5
589.0	-2.19336E-2	4.71454E-5
590.0	-2.17171E-2	4.90355E-5
591.0	-2.16446E-2	3.42345E-5
592.0	-2.12088E-2	3.80731E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 13:48:35 Page 8 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA MUESTRA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
593.0	-2.12760E-2	3.28352E-5
594.0	-2.21801E-2	4.75034E-5
595.0	-2.15440E-2	4.22021E-5
596.0	-2.20242E-2	3.54539E-5
597.0	-2.17009E-2	3.34976E-5
598.0	-2.13785E-2	2.61973E-5
599.0	-2.16303E-2	2.67071E-5
600.0	-2.17457E-2	3.65901E-5
601.0	-2.17013E-2	4.21367E-5
602.0	-2.17423E-2	4.43023E-5
603.0	-2.15926E-2	2.81919E-5
604.0	-2.19193E-2	2.52510E-5
605.0	-2.13685E-2	3.10924E-5
606.0	-2.15669E-2	3.40672E-5
607.0	-2.14658E-2	2.73813E-5
608.0	-2.13871E-2	3.11426E-5
609.0	-2.16527E-2	5.02492E-5
610.0	-2.18000E-2	3.29095E-5
611.0	-2.16379E-2	2.76725E-5
612.0	-2.15731E-2	2.62553E-5
613.0	-2.14386E-2	3.67374E-5
614.0	-2.17209E-2	3.64851E-5
615.0	-2.15802E-2	4.00018E-5
616.0	-2.17047E-2	3.70187E-5
617.0	-2.17118E-2	3.10668E-5
618.0	-2.21672E-2	4.04068E-5
619.0	-2.22526E-2	4.30093E-5
620.0	-2.20070E-2	3.45254E-5
621.0	-2.18606E-2	3.49915E-5
622.0	-2.16551E-2	3.81291E-5
623.0	-2.18787E-2	3.09357E-5
624.0	-2.20714E-2	2.86048E-5
625.0	-2.20542E-2	2.62239E-5
626.0	-2.18830E-2	2.55631E-5
627.0	-2.16484E-2	2.58269E-5
628.0	-2.16918E-2	3.39376E-5
629.0	-2.15931E-2	4.53535E-5
630.0	-2.17113E-2	3.38109E-5
631.0	-2.17085E-2	3.36888E-5
632.0	-2.15344E-2	3.63735E-5
633.0	-2.14052E-2	2.84013E-5
634.0	-2.13156E-2	3.43505E-5
635.0	-2.12593E-2	4.10059E-5
636.0	-2.15569E-2	5.19938E-5
637.0	-2.20642E-2	3.75401E-5
638.0	-2.19474E-2	3.74492E-5
639.0	-2.19755E-2	5.51361E-5
640.0	-2.22335E-2	3.17258E-5
641.0	-2.23804E-2	3.48328E-5
642.0	-2.05817E-2	3.72490E-5
643.0	-2.10457E-2	4.74195E-5
644.0	-2.27261E-2	3.94646E-5
645.0	-2.32248E-2	3.97688E-5
646.0	-2.24524E-2	3.44050E-5
647.0	-2.13976E-2	3.14098E-5
648.0	-2.17991E-2	4.40875E-5
649.0	-2.20575E-2	3.45304E-5
650.0	-2.19975E-2	3.50248E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 7 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
535.0	3.86381E-3	5.02153E-5
536.0	3.83043E-3	6.15342E-5
537.0	3.73077E-3	4.66765E-5
538.0	3.86524E-3	4.85801E-5
539.0	3.78847E-3	5.66684E-5
540.0	3.72982E-3	5.63122E-5
541.0	3.75700E-3	4.99121E-5
542.0	3.81708E-3	4.18464E-5
543.0	3.83711E-3	5.27256E-5
544.0	3.78609E-3	5.90749E-5
545.0	3.78799E-3	4.60450E-5
546.0	3.69453E-3	4.74746E-5
547.0	3.68881E-3	5.30587E-5
548.0	3.84760E-3	4.24532E-5
549.0	3.69501E-3	4.61794E-5
550.0	3.70359E-3	5.53717E-5
551.0	3.78752E-3	4.45479E-5
552.0	3.76225E-3	4.14101E-5
553.0	3.64399E-3	5.54209E-5
554.0	3.64399E-3	6.01798E-5
555.0	3.66735E-3	4.56358E-5
556.0	3.67928E-3	3.63985E-5
557.0	3.69549E-3	5.00236E-5
558.0	3.59964E-3	6.60501E-5
559.0	3.50904E-3	6.27326E-5
560.0	3.63779E-3	5.08106E-5
561.0	3.60489E-3	4.92852E-5
562.0	3.54385E-3	5.37707E-5
563.0	3.56483E-3	5.45734E-5
564.0	3.53479E-3	4.37509E-5
565.0	3.47471E-3	4.94924E-5
566.0	3.54433E-3	3.67018E-5
567.0	3.63350E-3	3.91878E-5
568.0	3.41606E-3	3.04887E-5
569.0	3.58486E-3	2.69656E-5
570.0	3.50094E-3	4.45339E-5
571.0	3.30925E-3	4.57987E-5
572.0	3.34692E-3	4.69727E-5
573.0	3.13663E-3	3.42228E-5
574.0	3.48902E-3	3.19214E-5
575.0	3.17669E-3	4.02786E-5
576.0	3.12948E-3	4.22082E-5
577.0	3.22914E-3	4.80246E-5
578.0	3.37029E-3	3.74173E-5
579.0	2.73371E-3	3.87707E-5
580.0	3.20196E-3	4.66631E-5
581.0	3.02029E-3	3.27936E-5
582.0	3.50475E-3	2.22740E-5
583.0	2.10381E-3	3.14685E-5
584.0	2.71034E-3	3.79550E-5
585.0	3.39079E-3	4.41660E-5
586.0	2.80094E-3	4.58347E-5
587.0	2.76947E-3	4.10842E-5
588.0	3.10896E-3	3.08059E-5
589.0	2.77138E-3	4.35961E-5
590.0	2.89297E-3	4.06635E-5
591.0	2.99072E-3	3.03939E-5
592.0	3.05367E-3	3.02392E-5



Hardcopy view

Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 8 of 17

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
593.0	3.44276E-3	3.17133E-5
594.0	2.77138E-3	4.84078E-5
595.0	2.88296E-3	4.06222E-5
596.0	2.94399E-3	4.17627E-5
597.0	2.78378E-3	3.90519E-5
598.0	2.99692E-3	3.23336E-5
599.0	3.14522E-3	3.35730E-5
600.0	2.89488E-3	3.54980E-5
601.0	2.94781E-3	3.90716E-5
602.0	2.89583E-3	3.70279E-5
603.0	2.94590E-3	2.19488E-5
604.0	3.11232E-3	3.04565E-5
605.0	2.96497E-3	3.51180E-5
606.0	3.17621E-3	3.17697E-5
607.0	3.23391E-3	2.65674E-5
608.0	3.11613E-3	2.97398E-5
609.0	2.73180E-3	4.90471E-5
610.0	2.81429E-3	3.52279E-5
611.0	2.73371E-3	3.03111E-5
612.0	2.56348E-3	3.65870E-5
613.0	2.52295E-3	3.85111E-5
614.0	2.53963E-3	4.20868E-5
615.0	2.85435E-3	2.70923E-5
616.0	2.90918E-3	2.28372E-5
617.0	2.82669E-3	2.98709E-5
618.0	2.70987E-3	3.67722E-5
619.0	2.57158E-3	3.75000E-5
620.0	2.72799E-3	4.14375E-5
621.0	2.55013E-3	3.87362E-5
622.0	2.61545E-3	3.93383E-5
623.0	2.54631E-3	3.51415E-5
624.0	2.64883E-3	2.31327E-5
625.0	2.81906E-3	2.92522E-5
626.0	2.76899E-3	3.43397E-5
627.0	2.92206E-3	3.13754E-5
628.0	2.87056E-3	3.36196E-5
629.0	2.85482E-3	3.55891E-5
630.0	2.84338E-3	3.83187E-5
631.0	2.82955E-3	4.07445E-5
632.0	3.00503E-3	4.00749E-5
633.0	2.92683E-3	3.08123E-5
634.0	3.06368E-3	3.73549E-5
635.0	2.98882E-3	4.29623E-5
636.0	2.86055E-3	5.34823E-5
637.0	2.65121E-3	4.19380E-5
638.0	2.60639E-3	3.37975E-5
639.0	2.51627E-3	5.48321E-5
640.0	2.18916E-3	4.40655E-5
641.0	2.63786E-3	3.72948E-5
642.0	4.00257E-3	2.14666E-5
643.0	3.09134E-3	2.89598E-5
644.0	2.54154E-3	3.56800E-5
645.0	2.81286E-3	4.02864E-5
646.0	2.71940E-3	4.27155E-5
647.0	2.18725E-3	3.46577E-5
648.0	1.86825E-3	3.21016E-5
649.0	2.12479E-3	2.74694E-5
650.0	2.60925E-3	3.39619E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 5 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
419.0	3.11613E-3	7.83422E-5
420.0	3.34024E-3	6.32147E-5
421.0	3.51191E-3	5.82220E-5
422.0	3.46613E-3	6.91973E-5
423.0	3.20482E-3	7.64681E-5
424.0	2.99072E-3	6.44577E-5
425.0	2.95687E-3	5.99318E-5
426.0	3.03984E-3	5.02368E-5
427.0	3.37505E-3	5.60076E-5
428.0	3.34978E-3	4.73139E-5
429.0	3.14283E-3	4.53121E-5
430.0	3.60537E-3	7.21333E-5
431.0	3.01981E-3	8.16061E-5
432.0	2.63548E-3	5.99441E-5
433.0	3.08180E-3	6.12917E-5
434.0	3.60537E-3	5.33845E-5
435.0	2.88010E-3	5.54916E-5
436.0	3.14188E-3	7.09927E-5
437.0	3.30257E-3	7.21349E-5
438.0	3.14426E-3	6.79455E-5
439.0	3.25823E-3	7.69586E-5
440.0	3.05223E-3	6.61189E-5
441.0	3.55768E-3	5.24488E-5
442.0	3.37458E-3	5.03340E-5
443.0	2.94971E-3	5.76293E-5
444.0	3.05414E-3	7.10599E-5
445.0	2.94638E-3	6.11803E-5
446.0	2.93112E-3	5.99982E-5
447.0	2.92110E-3	7.85147E-5
448.0	2.87008E-3	6.56911E-5
449.0	3.20148E-3	6.24129E-5
450.0	3.07131E-3	9.21765E-5
451.0	3.00217E-3	6.27870E-5
452.0	2.94924E-3	5.60532E-5
453.0	2.97356E-3	6.34175E-5
454.0	3.05271E-3	5.95359E-5
455.0	3.16954E-3	5.15326E-5
456.0	3.10326E-3	6.87208E-5
457.0	3.15237E-3	6.18750E-5
458.0	3.31593E-3	6.89965E-5
459.0	3.29781E-3	5.65831E-5
460.0	2.96879E-3	6.19081E-5
461.0	2.92635E-3	9.60279E-5
462.0	3.06463E-3	7.35953E-5
463.0	3.33738E-3	8.83398E-5
464.0	3.60394E-3	9.21987E-5
465.0	3.61347E-3	9.27543E-5
466.0	3.33452E-3	6.87225E-5
467.0	2.95258E-3	8.11366E-5
468.0	3.23534E-3	7.08115E-5
469.0	3.22723E-3	5.33504E-5
470.0	3.22771E-3	5.95789E-5
471.0	3.52240E-3	6.88877E-5
472.0	3.73888E-3	8.27337E-5
473.0	3.71838E-3	9.64791E-5
474.0	3.57294E-3	9.25482E-5
475.0	3.62825E-3	7.46962E-5
476.0	3.68214E-3	5.63556E-5



Hardcopy view

Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 3 of 17

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
303.0	0.208449	1.05576E-4
304.0	0.208832	1.10150E-4
305.0	0.209324	6.33081E-5
306.0	0.209861	5.47543E-5
307.0	0.210415	9.03452E-5
308.0	0.211633	9.84412E-5
309.0	0.212551	8.44594E-5
310.0	0.213979	5.95684E-5
311.0	0.215737	8.04641E-5
312.0	0.217543	9.58953E-5
313.0	0.219803	7.20103E-5
314.0	0.221694	6.86298E-5
315.0	0.223160	6.48569E-5
316.0	0.223489	5.88821E-5
317.0	0.222289	7.84466E-5
318.0	0.219582	7.77683E-5
319.0	0.215944	7.00788E-5
320.0	0.211775	8.16979E-5
321.0	0.207515	6.03524E-5
322.0	0.203823	5.81077E-5
323.0	0.200805	7.62448E-5
324.0	0.198662	6.20841E-5
325.0	0.197455	7.21901E-5
326.0	0.197177	5.89950E-5
327.0	0.197493	4.54048E-5
328.0	0.198305	5.63586E-5
329.0	0.198321	5.59832E-5
330.0	0.196565	4.77623E-5
331.0	0.192512	3.91892E-5
332.0	0.185775	5.88966E-5
333.0	0.177180	5.79421E-5
334.0	0.167429	4.49025E-5
335.0	0.157807	6.03675E-5
336.0	0.148621	5.85346E-5
337.0	0.140401	6.37982E-5
338.0	0.133121	6.70105E-5
339.0	0.126665	7.31009E-5
340.0	0.120900	7.50530E-5
341.0	0.115785	6.43960E-5
342.0	0.111075	6.48043E-5
343.0	0.106574	6.95218E-5
344.0	0.102341	6.78618E-5
345.0	9.82041E-2	6.80709E-5
346.0	9.42812E-2	7.91176E-5
347.0	9.03897E-2	7.29015E-5
348.0	8.65183E-2	4.89635E-5
349.0	8.28238E-2	6.48025E-5
350.0	7.92103E-2	7.23741E-5
351.0	7.55372E-2	5.80783E-5
352.0	7.19585E-2	7.18965E-5
353.0	6.87470E-2	6.99067E-5
354.0	6.53267E-2	6.94727E-5
355.0	6.24433E-2	6.38321E-5
356.0	5.94821E-2	6.48253E-5
357.0	5.65867E-2	6.02364E-5
358.0	5.31178E-2	7.93042E-5
359.0	4.97494E-2	7.23427E-5
360.0	4.71263E-2	9.74243E-5



Hardcopy view Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 4 of 17  
ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
361.0	4.46630E-2	7.42382E-5
362.0	4.19874E-2	1.07283E-4
363.0	3.94998E-2	1.02754E-4
364.0	3.73192E-2	8.07095E-5
365.0	3.51567E-2	1.12307E-4
366.0	3.31450E-2	7.72770E-5
367.0	3.10636E-2	6.34408E-5
368.0	2.88105E-2	9.96898E-5
369.0	2.69055E-2	8.16019E-5
370.0	2.52585E-2	9.63164E-5
371.0	2.35372E-2	9.48534E-5
372.0	2.19622E-2	7.58696E-5
373.0	2.06351E-2	7.67678E-5
374.0	1.91441E-2	7.13505E-5
375.0	1.82638E-2	6.01155E-5
376.0	1.67780E-2	7.04348E-5
377.0	1.55392E-2	7.93572E-5
378.0	1.47295E-2	7.92210E-5
379.0	1.37854E-2	8.09486E-5
380.0	1.26200E-2	1.01500E-4
381.0	1.17383E-2	8.50790E-5
382.0	1.10879E-2	1.00523E-4
383.0	1.02267E-2	7.74857E-5
384.0	9.53865E-3	1.05108E-4
385.0	8.86583E-3	8.46490E-5
386.0	8.31604E-3	1.01399E-4
387.0	7.94029E-3	6.51332E-5
388.0	7.50446E-3	6.60536E-5
389.0	6.78062E-3	1.05985E-4
390.0	6.32000E-3	9.47671E-5
391.0	6.23989E-3	1.18267E-4
392.0	6.02531E-3	8.77277E-5
393.0	5.65434E-3	9.13339E-5
394.0	5.07632E-3	8.42276E-5
395.0	4.85373E-3	8.81955E-5
396.0	4.61149E-3	7.78604E-5
397.0	4.75454E-3	6.72053E-5
398.0	4.67682E-3	9.48702E-5
399.0	4.21095E-3	6.51716E-5
400.0	3.46947E-3	8.61836E-5
401.0	3.69406E-3	1.01863E-4
402.0	3.78132E-3	7.56670E-5
403.0	3.76320E-3	7.20356E-5
404.0	3.84283E-3	7.65483E-5
405.0	3.71552E-3	8.30696E-5
406.0	3.40271E-3	9.48391E-5
407.0	3.02839E-3	7.37527E-5
408.0	3.23296E-3	9.52553E-5
409.0	3.54052E-3	7.15208E-5
410.0	3.31688E-3	5.52411E-5
411.0	3.33681E-3	6.30814E-5
412.0	3.40176E-3	7.80849E-5
413.0	3.50142E-3	7.71209E-5
414.0	3.03268E-3	6.45282E-5
415.0	3.09229E-3	5.55479E-5
416.0	3.21198E-3	3.78635E-5
417.0	3.20148E-3	4.65020E-5
418.0	3.13616E-3	8.73979E-5



Hardcopy view

Date 12/3/2008 Time 10:22:40 Page 1 of 17

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CIPROFLOXACINA

Tabular Data of Overlaid Sample Spectra[1]

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)	Std.Dev.
190.0	0.251550	3.25166E-3
191.0	0.250703	3.76153E-3
192.0	0.248072	2.38418E-3
193.0	0.253335	2.20472E-3
194.0	0.251929	1.90671E-3
195.0	0.253562	1.60112E-3
196.0	0.254163	2.11432E-3
197.0	0.253187	2.15609E-3
198.0	0.252845	1.19151E-3
199.0	0.278295	8.68227E-4
200.0	0.298947	2.47625E-4
201.0	0.303866	1.61588E-4
202.0	0.301772	1.39732E-4
203.0	0.299032	1.23072E-4
204.0	0.297166	1.04090E-4
205.0	0.296069	6.90904E-5
206.0	0.295088	6.26220E-5
207.0	0.293542	6.52396E-5
208.0	0.291184	7.80004E-5
209.0	0.287726	5.85278E-5
210.0	0.283320	4.98688E-5
211.0	0.278253	4.08455E-5
212.0	0.272418	4.50516E-5
213.0	0.266207	3.90839E-5
214.0	0.259329	3.99307E-5
215.0	0.252315	4.13393E-5
216.0	0.245312	5.31144E-5
217.0	0.238104	3.95315E-5
218.0	0.231149	4.63870E-5
219.0	0.225104	3.90199E-5
220.0	0.220218	4.55673E-5
221.0	0.216445	3.93737E-5
222.0	0.212977	3.98252E-5
223.0	0.209143	2.97384E-5
224.0	0.204517	3.83972E-5
225.0	0.199136	4.26843E-5
226.0	0.193342	5.52689E-5
227.0	0.187257	4.90598E-5
228.0	0.181654	5.19479E-5
229.0	0.176645	4.51084E-5
230.0	0.172562	4.26656E-5
231.0	0.169257	4.79370E-5
232.0	0.166559	4.52430E-5
233.0	0.164382	4.39687E-5
234.0	0.162790	5.19348E-5
235.0	0.161674	3.90985E-5
236.0	0.161031	3.82660E-5
237.0	0.160907	3.50759E-5
238.0	0.160993	3.90417E-5
239.0	0.161396	4.67738E-5
240.0	0.162073	3.32198E-5
241.0	0.163007	4.37185E-5
242.0	0.164199	4.12602E-5
243.0	0.165973	5.12539E-5
244.0	0.168256	4.98095E-5



Hardcopy view

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE

Quantification Report

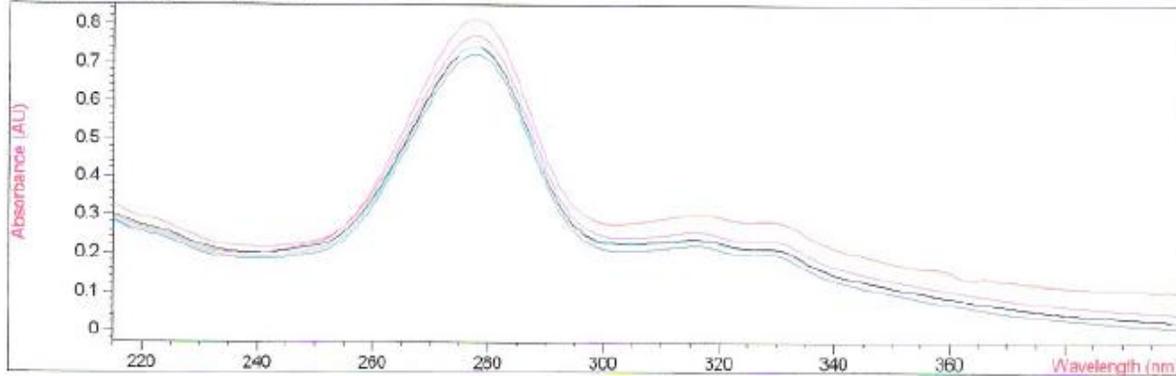
Date 12/4/2008 Time 17:07:59 Page 1 of 1

ANALISIS DE ROBUSTEZ DE CIPROFLOXACINA

Wavelength (nm) Absorb

245.0 Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 12/4/2008 Time 5:04:25 PM  
 246.0 Information : factor 1.110  
 247.0  
 248.0 Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.SD Created : 12/4/08 17:00:45  
 249.0  
 250.0

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/4/2008 Time 5:04:25 PM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	MTA 6ug/ml	1.00000	6.00820	0.71519	2.3748E-2
2	MTA 6ug/ml	1.00000	5.96100	0.70957	9.9654E-2
3	MTA 6ug/ml	1.00000	5.96670	0.71025	8.8840E-3
4	MTA 6ug/ml	1.00000	6.01470	0.71596	2.2925E-2
5	MTA 6ug/ml	1.00000	6.05110	0.72030	4.5382E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

*HCl 0.5 N.*

285.0	0.572488	6.20713E-5
286.0	0.532780	1.17930E-4
287.0	0.491268	9.11819E-5
288.0	0.450022	6.77646E-5
289.0	0.410644	6.85519E-5
290.0	0.374075	5.66424E-5
291.0	0.340996	5.73851E-5
292.0	0.311889	5.42045E-5
293.0	0.287518	7.25561E-5
294.0	0.267283	6.99164E-5
295.0	0.250726	7.11031E-5
296.0	0.237562	8.19120E-5
297.0	0.227407	5.65439E-5
298.0	0.219991	4.92217E-5
299.0	0.214671	6.37751E-5
300.0	0.211276	7.15192E-5
301.0	0.209271	1.04481E-4
302.0	0.208489	9.00882E-5

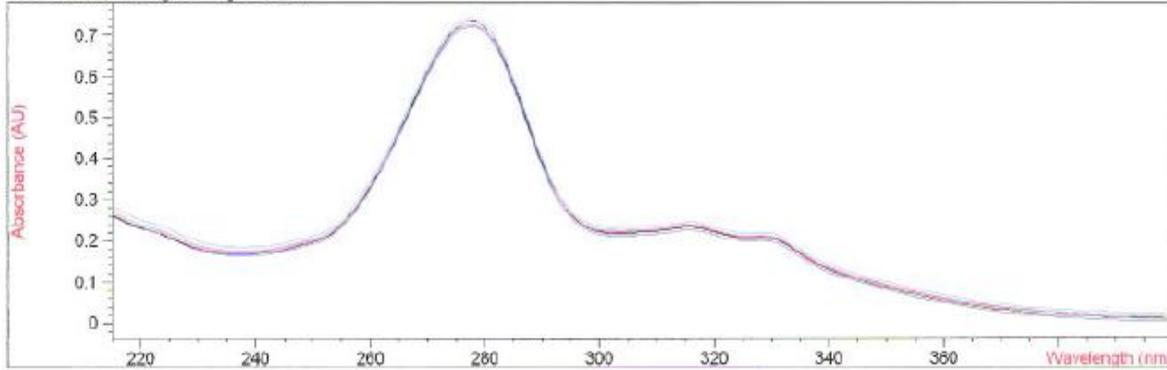


Quantification Report Date 12/4/2008 Time 17:31:22 Page 1 of 1  
 ANALISIS DE ROBUSTEZ DE CIPROFLOXACINA

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 12/4/2008 Time 5:04:25 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROB2.SD Created : 12/4/08 17:16:08

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/4/2008 Time 5:04:25 PM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	Sample	1.00000	6.08040	0.72378	8.5073E-3
2	Sample	1.00000	6.03720	0.71864	1.4123E-2
3	Sample	1.00000	6.04480	0.71954	5.6553E-4
4	Sample	1.00000	6.07160	0.72274	1.9400E-2
5	Sample	1.00000	5.97930	0.71174	1.3596E-2

Report generated by : BIANKA G.

Signature: .....

*Hcl 0,10 N.*

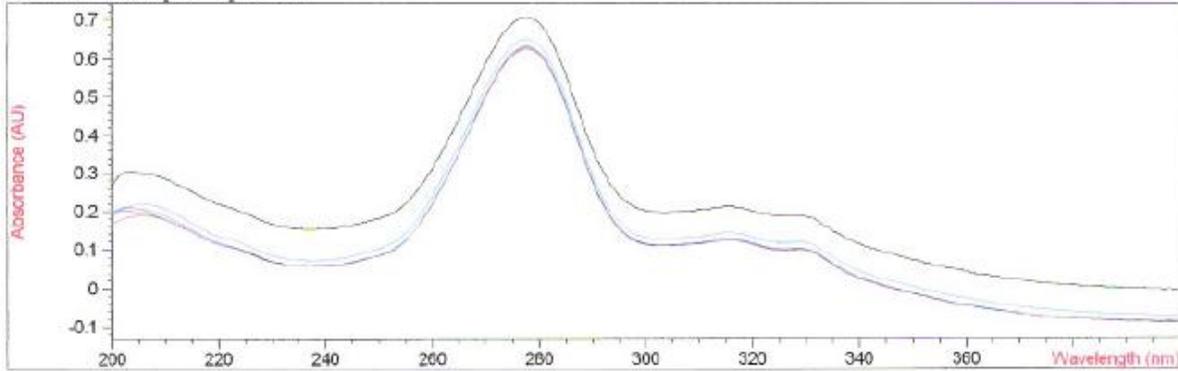


Quantification Report Date 12/11/2008 Time 10:11:05 Page 1 of 1  
ensayo de robustez de ciprofloxacina de 500mg

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 12/3/2008 Time 9:48:39 AM  
Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROB2.SD Created : 12/11/08 8:48:23

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/3/2008 Time 9:48:39 AM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	0.15N HCL	1.00000	5.95300	0.70862	-4.0569E-3
2	0.15N HCL	1.00000	6.00090	0.71432	-9.0845E-2
3	0.15N HCL	1.00000	6.03220	0.71804	-8.9708E-2
4	0.15N HCL	1.00000	6.05850	0.72118	-7.3636E-2
5	0.15N HCL	1.00000	6.01290	0.71575	-9.0792E-2

Report generated by : BLANKA G.

Signature: .....

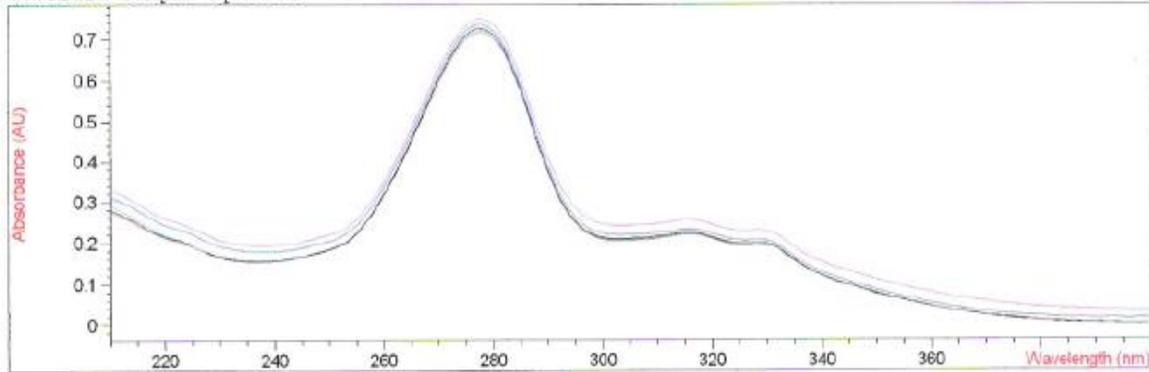


Quantification Report Date 12/11/2008 Time 15:02:38 Page 1 of 1  
 ENSAYO DE ROBUSTEZ CIPROFLOXACINA DE 500mg

Method file : CIPROFLO.M Last update: Date 12/11/2008 Time 1:55:21 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.SD Created : 12/11/08 14:56:58

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.40090 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/11/2008 Time 1:55:21 PM Operator: GUSTAVO ORTIZ

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	0.05N HCL	1.00000	6.08330	0.72412	9.9325E-4
2	0.05N HCL	1.00000	6.00360	0.71464	6.4468E-4
3	0.05N HCL	1.00000	6.06220	0.72161	1.2977E-2
4	0.05N HCL	1.00000	6.04670	0.71977	-4.0340E-4
5	0.05N HCL	1.00000	6.00120	0.71436	3.3585E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

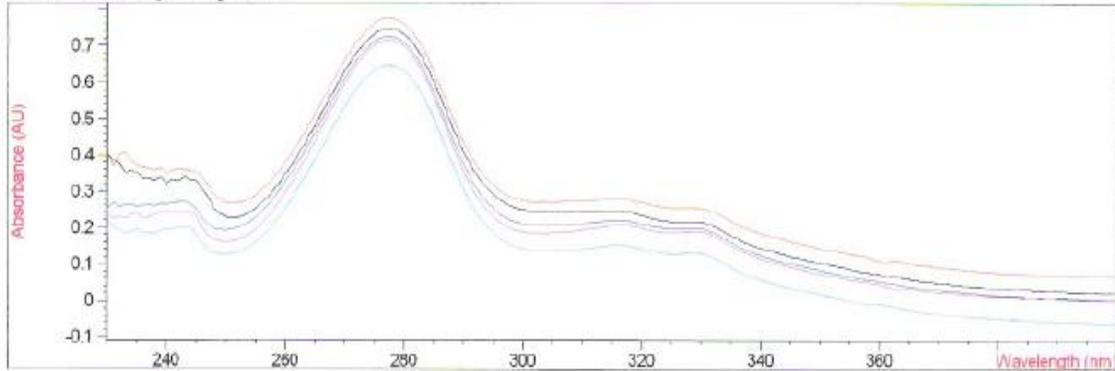


Quantification Report Date 12/22/2008 Time 14:52:25 Page 1 of 1  
 ENSAYO DE ROBUSTEZ DE CIPROFLOXACINA DE 500 MG

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 12/22/2008 Time 2:52:03 PM  
 Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.SD Created : 12/22/08 14:43:58

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
 Calibration equation: Conc. = 8.34470 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/22/2008 Time 2:52:03 PM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina(ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	HNO3 0.1N	1.00000		6.05540	0.72565	2.1125E-2
2	HNO3 0.1N	1.00000		5.92890	0.71050	6.5653E-2
3	HNO3 0.1N	1.00000		6.03510	0.72322	2.3222E-3
4	HNO3 0.1N	1.00000		5.93400	0.71111	-6.3302E-2
5	HNO3 0.1N	1.00000		5.93800	0.71159	5.6200E-3

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

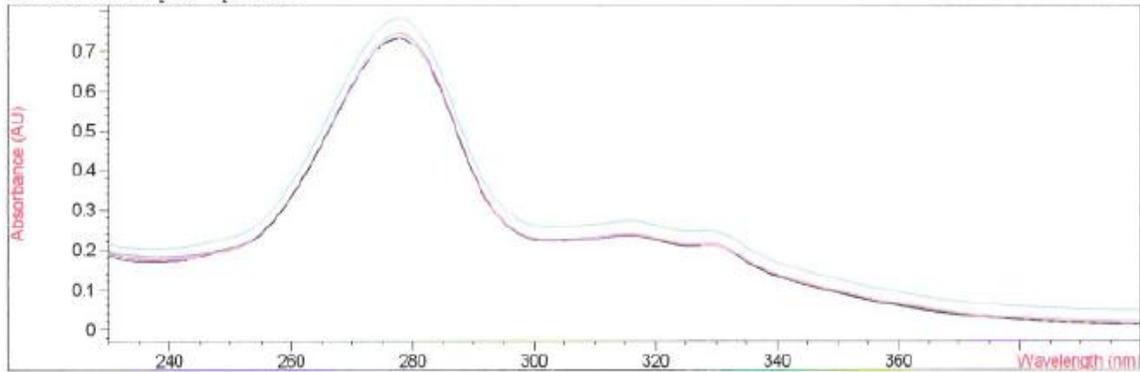


=====  
Quantification Report Date 12/22/2008 Time 14:55:05 Page 1 of 1  
ENSAYO DE ROBUSTEZ DE CIPROFLOXACINA DE 500 MG  
=====

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 12/22/2008 Time 2:54:23 PM  
Information : factor 1.110

Data File : C:\HPCHEM\1\DATA\CIPROGG2.D Created : 12/22/08 11:13:32

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacina  
Calibration equation: Conc. = 8.34470 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/22/2008 Time 2:54:23 PM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut.	Factor	Ciprofloxacina (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	H2SO4 0.1N	1.00000		6.00130	0.71918	1.1703E-2
2	H2SO4 0.1N	1.00000		6.03950	0.72375	1.7237E-2
3	H2SO4 0.1N	1.00000		6.01140	0.72038	1.0925E-2
4	H2SO4 0.1N	1.00000		6.10660	0.73179	4.6119E-2
5	H2SO4 0.1N	1.00000		6.09990	0.73099	1.0261E-2

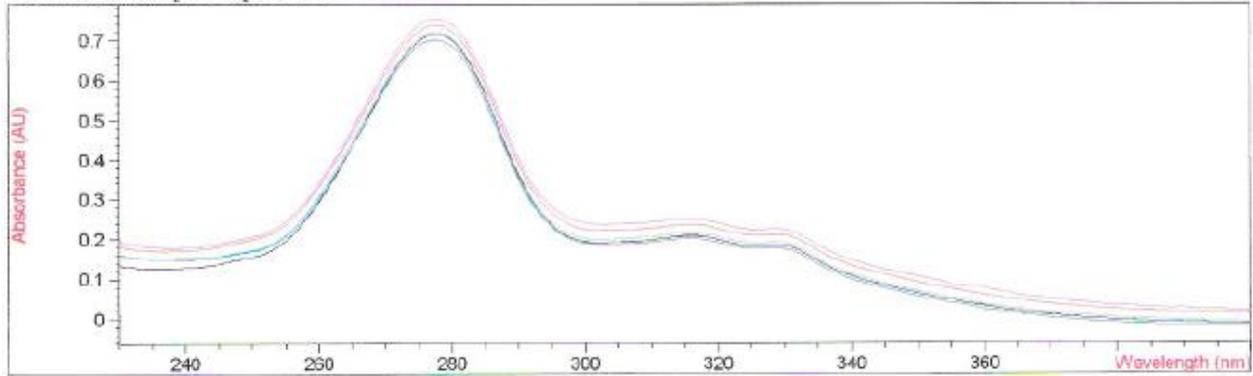
Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....

Method file : CIPROFLO.M ( modified ) Last update: Date 12/22/2008 Time 3:51:22 PM  
Information : factor 1.110

Data File : <untitled>

Overlaid Sample Spectra



Analyte name : Ciprofloxacin  
Calibration equation: Conc. = 8.34470 ug/ml \* net Abs

Calibrated at : Date 12/22/2008 Time 3:51:22 PM Operator: GISELA GARCIA

#	Name	Dilut. Factor	Ciprofloxacin (ug/ml)	net Abs<277nm>	Bkgd<400nm>
1	HCL 0.1N	1.00000	6.05750	0.72591	-1.2513E-2
2	HCL 0.1N	1.00000	6.03810	0.72358	1.3162E-2
3	HCL 0.1N	1.00000	6.02370	0.72185	-2.1828E-2
4	HCL 0.1N	1.00000	6.07130	0.72757	-8.9664E-3
5	HCL 0.1N	1.00000	6.09270	0.73013	2.1850E-2

Report generated by : GISELA GARCIA

Signature: .....