

34
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

"VALIDACION DE UN METODO ESPECTRO-
FOTOMETRICO PARA CUANTIFICACION DE
RIFAMPICINA EN CAPSULAS"

TESIS CON
FIJACION DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A:
JOSE RICARDO MENDEZ LOPEZ



MEXICO, D. F.

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Introducción	1
I. Fundamentación del tema	3
A. Rifampicina, características fisicoquímicas	3
1. Descripción	3
a. Nombre	3
b. Fórmula molecular de la Rifampicina ...	3
c. Descripción física y química	4
d. Síntesis	5
e. Estabilidad de la Rifampicina	7
f. Farmacocinética	9
g. Mecanismo de acción	11
B. Espectrofotometría en el análisis farmacéutico ..	12
1. Bases teóricas del análisis espectro- fotométrico	12
a. Fundamentos	12
b. Absorción de la luz por las sustancias	14
2. Equipos de medición de absorción de energía radiante	21
C. Validación	27
1. Consideraciones teóricas	27
a. Definición	27
b. Importancia	27
c. Determinación de los parámetros de validación	27

d. Definición de los parámetros de validación	30
e. Formas de evaluación de los parámetros de validación	33
II. Planteamiento del problema	37
III. Objetivos	38
IV. Hipótesis	39
V. Material y métodos	40
A. Antecedentes del método	40
1. Proceso de producción de cápsulas de Rifampicina	40
a. Formulación unitaria	40
b. Equipo de fabricación	41
c. Precauciones	41
d. Procedimiento de fabricación	42
e. Análisis a producto terminado	42
B. Recursos físicos	44
1. Material	44
2. Equipo	44
3. Reactivos	45
4. Estándares	45
5. Materias primas	45
C. Procedimiento	46
1. Método general empleado para cuantificar Rifampicina en cápsulas	46
a. Preparación del estándar de Rifampicina	46

b. Preparación de la solución reguladora de fosfatos pH 7.4	47
2. Validación del método	47
a. Linealidad del sistema	47
b. Precisión del sistema	48
c. Exactitud del método al 100.00 %	48
d. Precisión del método (repetibilidad) ..	49
e. Precisión del método (reproducibilidad)	50
f. Linealidad del método	51
g. Especificidad	51
h. Estabilidad del la muestra	52
VI. Resultados	54
A. Linealidad del sistema	54
B. Precisión del sistema	56
C. Exactitud del método al 100.00 %	57
D. Precisión del método (repetibilidad)	58
E. Precisión del método (reproducibilidad)	59
F. Linealidad del método	61
G. Especificidad del método	63
H. Estabilidad del la muestra	65
VII. Discusión de resultados	67
VIII. Conclusiones	71
Anexo	72
1. Significado de los términos estadísticos empleados	72
a. Contraste de hipótesis	72

b. Regresión lineal	72
c. Términos estadísticos	72
2. Cálculos requeridos para obtener los datos de los parámetros de validación y sus criterios estadísticos de aceptación	73
a. Linealidad del sistema	73
b. Precisión del sistema	75
c. Exactitud del método al 100.00 %	76
d. Precisión del método (repetibilidad) ..	79
e. Precisión del método (reproducibilidad)	81
f. Linealidad del método	86
g. Estabilidad del la muestra	90
Referencias	93
Bibliografía	95

INTRODUCCION

La Rifampicina es el fármaco mas efectivo en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar; es administrado en asociación con antilepróticos tales como Dapsona y Clofazamina en el tratamiento de la lepra. Es usado también contra otras enfermedades no tuberculosas tales como brucelosis, endocarditis, gonorrea, histoplasmosis, leishmaniasis, osteomielitis y trachoma.

La demanda actual de Rifampicina en México es considerable, dada la incidencia de las enfermedades antes mencionadas en la población de varias zonas del país. Por esta razón, algunas empresas del ramo farmacéutico han orientado sus objetivos hacia la producción de medicamentos cuyo principio activo es la Rifampicina.

Durante la producción de estos medicamentos, es necesario controlar su calidad con el objeto de garantizar su seguridad y eficacia terapéutica, manteniendo todas las especificaciones de diseño.

Una de las herramientas fundamentales para lograr este propósito son los métodos analíticos de cuantificación del principio activo, los cuales deben proporcionar resultados con un alto grado de confiabilidad.

Para que un método cumpla con esta función tiene que ser valido; razón por la cual el presente trabajo tiene la finalidad de proporcionar la información correspondiente al

estudio de validación de un método espectrofotométrico para determinar Rifampicina en cápsulas.

El desarrollo del trabajo incluye la recopilación bibliográfica del fundamento teórico concerniente a la cuantificación de sustancias químicas en solución por vía espectrofotométrica; una reseña de las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la Rifampicina; así como el diseño de un esquema de validación para el método y sus correspondientes bases teóricas.

El estudio de validación del presente trabajo permitió concluir que el método para cuantificar Rifampicina en cápsulas tiene capacidad para proporcionar resultados confiables, por lo cual puede ser empleado para propósitos de control de calidad durante la producción de cápsulas de Rifampicina.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. Rifampicina, características fisicoquímicas

1. DESCRIPCION

a. Nombre

La Rifampicina es conocida como 3-(((4-metil-1-piperazínil) imino) metil-Rifamicina), de acuerdo a la nomenclatura original para Rifamicinas. (1)

b. Fórmula molecular de la Rifampicina.

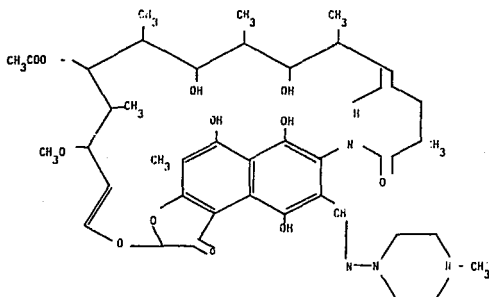


Fig 1. Fórmula molecular desarrollada de la Rifampicina (2)

c. Descripción física y química.

La Rifampicina es un polvo de color rojo, no tiene olor, tiene un peso molecular de 822.95 gr/mol, funde a 185°C con descomposición. Contiene nueve átomos de carbono asimétricos y tres enlaces dobles. La molécula de Rifampicina consiste de una parte cromofórica α -Naftohidroquinona, una cadena alifática y un grupo piperazina adyacente.

1). Propiedades de ionización. La Rifampicina se ioniza en agua debido a la presencia de dos grupos:

Tabla 1. Constantes de ionización de la Rifampicina (3)

	pka	Atribución
Protón perdido	1.7	Hidroxilo c-8
Protón ganado	1.9	Piperazina N-4

Se ioniza también en solventes no acuosos como el ácido acético glacial, donde el nitrógeno de la piperazina básica puede titularse con ácido perclórico.

2). Solubilidad. Es soluble en agua, cloroformo y metanol, su solubilidad se incrementa a valores de pH bajos.

Tabla 2. Solubilidades de la Rifampicina (4)

Solvente	mg/ml	Temperatura
Cloroformo	349.0	25°C
Etil acetato	216.0	
Dioxano	39.0	
Metanol	16.0	
Agua pH 7.3	2.5	
Agua pH 7.5	2.8	
Agua pH 2.0	99.5	

d. Síntesis.

La Rifampicina es un antibiótico semisintético derivado de la Rifamicina B, el cual es un metabolito producido por las cepas de Streptomyces mediterranei (ver figura 2).

De acuerdo a la figura, la Rifampicina es obtenida por condensación de 1-amino-4-metil-piperazina con 3-formil-rifamicina SV en tetrahidrofurano libre de peróxidos a una temperatura entre 10°C - 15°C. La 3-formil-rifamicina es obtenida de la Rifamicina B el cual es el producto de fermentación por el procedimiento reportado en la figura 2. Existe otro procedimiento que consiste en hacer reaccionar la Rifamicina S directamente con formaldehído, ter butil amina y dióxido de manganeso condensado con 1-amino-4-metil-piperazina. (4).

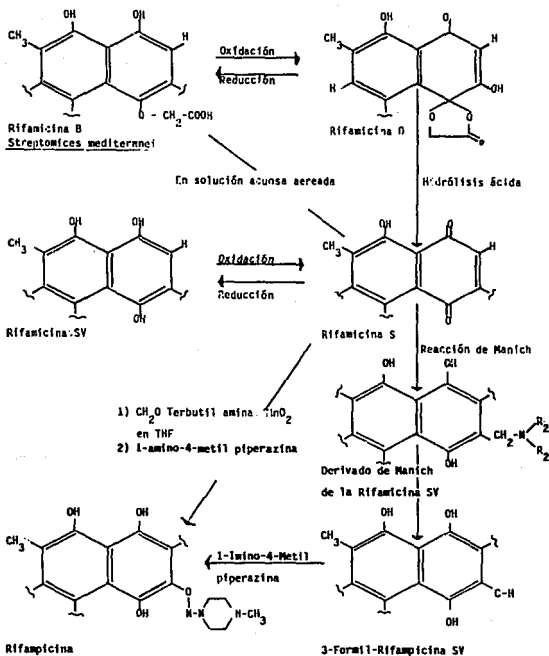


Fig. 2. Síntesis de la Rifampicina.

e. Estabilidad de la Rifampicina.

1). Estabilidad como polvo. La Rifampicina es muy estable en el estado sólido, sus propiedades físicas y químicas se mantienen constantes por mas de cinco años (10).

Tabla 3. Estabilidad de la Rifampicina en el estado sólido a la temperatura ambiente (11).

	Inicio		12 meses		21 meses		30 meses		41 meses	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Rifampicina	99.5	98.6	100.1	96.4	99.0	100.0	100.2	95.4	97.3	95.9
3-formil rifamicina SV.	Trazas		Trazas		Trazas		Trazas		Trazas	
Rifamicina quinona	Ausente		1.0-1.5%		1.5-2.0%		1.5-2.0%		2.5-3.0%	
Rifampicina N-oxido	Trazas		1.0-1.5%		1.0-1.5%		1.0-1.5%		1.0-1.5%	
25-desacetil 21-acetil-rifamicina	Ausente		Trazas		Trazas		Trazas		0.5-1.0%	
25-desacetil rifamicina	0.5-1.0%		1.5-2.0%		1.5-2.0%		1.0-1.5%		1.0-1.5%	
25-desacetil 23-acetil-rifamicina	Ausente		Ausente		Ausente		Trazas		Trazas	

2). Estabilidad en solución. En solución acuosa la Rifampicina es poco estable. Los productos de degradación son reportados en la figura 3. En forma general, pierde aproximadamente el 20% de su actividad biológica en diez

horas a temperatura ambiente; su descomposición se ve disminuida por la adición de un agente reductor (ácido ascórbico por ejemplo).

Como otras rifamicinas, la Rifampicina sufre una desacetilación en medio alcalino dando el correspondiente 25-desacetil derivado, sin pérdida sustancial de su actividad antibacteriana.

En solución alcalina, en presencia de oxígeno atmosférico y a temperatura ambiente, la Rifampicina se transforma en Rifampicina quinona, esta oxidación puede ser prevenida con ascorbato de sodio. Bajo las mismas condiciones a 60°C - 70°C. la Rifampicina tiene tres productos de degradación significativos los cuales son: 25-desacetil-rifamicina, 25-desacetil-23-acetil-rifamicina y 25-acetil-21-acetil-rifamicina (6).

Se ha estudiado la estabilidad de la Rifampicina en solución acuosa a diferente pH, observándose que se descompone rápidamente en condiciones ácidas o alcalinas, pero lentamente en medio neutro. La 3-formil-rifamicina es el principal producto de descomposición en el medio ácido (7).

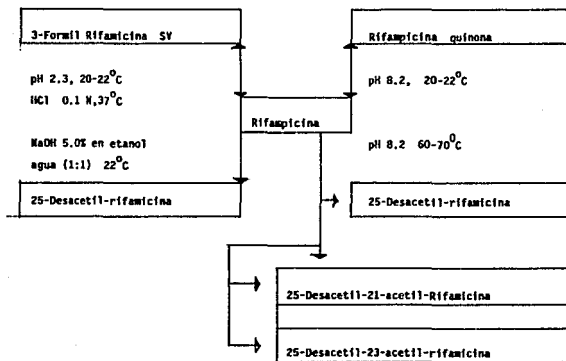


Fig. 3. Estabilidad de la Rifampicina en solución acuosa (4).

f. Farmacocinética.

La sustancia activa se absorbe rápida y completamente de las cápsulas o suspensión penetrando en diversos fluidos y tejidos orgánicos, inclusive los huesos y el sistema nervioso central. La fijación a proteínas plasmáticas es de alrededor del 80.0%. Una dosis única de 600 mg en ayunas alcanza, al cabo de dos horas, concentraciones plasmáticas máximas de 10ug/ml.

La Rifampicina se metaboliza principalmente en el hígado, siendo el metabolito 25-desacetil-rifamicina, el cual es menos lipofílico que la Rifampicina y es excretado fácilmente en la orina sin reabsorción; este metabolito posee

la misma actividad antibacteriana que la Rifampicina. La Rifampicina acelera su propio metabolismo debido a su efecto inductor enzimático en el hígado de modo que el aclaramiento sistémico, que es de unos 6 litros/hora después de la primera toma, asciende a cerca de 9 litros/hora tras repetir la toma.

La eliminación de la Rifampicina se considera lenta y se lleva a cabo por vía biliar y urinaria. La vida media de la eliminación desde el plasma depende de la dosis y es de dos horas y media aproximadamente después de la administración de 300 mg, de tres a cuatro horas después de la administración de 600 mg y de unas cinco horas después de 900 mg. La cantidad total de Rifampicina eliminada en la bilis no es proporcional a la dosis como ocurre por vía urinaria. La eliminación por vía urinaria sí depende de la dosis.

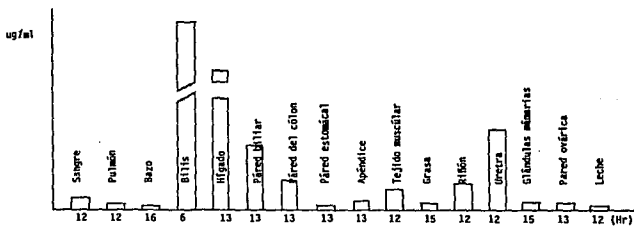


Fig. 4. Distribuci6n de la Rifampicina en tejidos y fluidos humanos despu6s de la administraci6n de una dosis de 450 mg (10).

g. Mecanismo de acción.

Entre los agentes que actúan inhibiendo a la propia RNA-polimerasa hay un grupo de antibióticos bacterianos llamados rifamicinas, los cuales son inhibidores poderosos de las RNA-polimerasas bacterianas (algunas RNA-polimerasas nucleares eucarióticas no son afectadas por ellas).

El más usado de estos compuestos es la Rifampicina, la cual se liga mediante unión no covalente a la subunidad B de la RNA-polimerasa de algunas especies y bloquea la formación del complejo de iniciación sin afectar la prolongación del RNA (12).

* Enzima dependiente del DNA capaz de formar polímeros de RNA a partir de ribonucleosido-5'-trifosfato en las células.

B. Espectrofotometría en el análisis farmacéutico

1. BASES TEORICAS DEL ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO

La espectrofotometría de absorción, es indudablemente una de las técnicas analíticas más interesantes de las descubiertas hasta la fecha. A pesar de los nuevos avances en la química analítica, probablemente permanecerá como un instrumento útil debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de muchos problemas; estas ventajas son entre otras: rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad (9).

Las mediciones espectrofotométricas son aplicadas ampliamente en química analítica, farmacéutica y orgánica. Por definición, las técnicas espectrofotométricas son métodos fisicoquímicos que consisten en la medición de la absorción de energía radiante por una sustancia que se encuentra en solución.

a. Fundamentos.

La materia está compuesta por átomos, los cuales constan de un núcleo eléctricamente positivo alrededor del cual se encuentran los electrones en diferentes órbitas según su nivel de energía, los electrones poseen carga eléctrica negativa, y la carga eléctrica del núcleo está dada por los protones que en cantidad igual a los electrones mantienen el balance neutral del átomo. Los electrones se encuentran distribuidos en capas energéticas u órbitas alrededor del núcleo llamadas generalmente orbitales, los que se van

distribuyendo según su nivel de energía (regla de Hund). El movimiento de electrones o tránsito de un nivel energético a otro superior está acompañado de una absorción de energía y la emisión de ésta para regresar a su forma inicial o estado basal. Es evidente que la energía absorbida por los electrones será una cantidad exacta dependiendo de cada paso particular, y este fenómeno constituye la base elemental de la espectrofotometría.

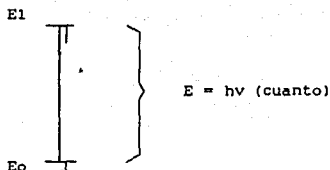
1). Propiedades de la energía radiante. La radiación ultravioleta visible comprende sólo una pequeña porción del espectro electromagnético, el cual incluye otras formas de radiación como son las ondas de radio, rayos gama, infrarrojos, etc.

La radiación electromagnética se describe más fácilmente en términos que sugieren dos modelos, es decir cuando se parte del supuesto de que muestra propiedades dualísticas. La difracción, reflexión, refracción y efectos similares se justifican sólo si se considera que la radiación se comporta como un campo oscilante, con un campo magnético asociado que viaja a través del espacio con movimiento ondulatorio. Por otra parte, los efectos fotoeléctricos sugieren que la radiación se compone de partículas discretas de energía denominadas fotones o cuantos. Aunque cada concepto se ha preferido por épocas, ambos parecen esenciales para una descripción completa de la radiación y sus efectos.

2). Espectro electromagnético. El ordenamiento secuencial de las diferentes formas de radiación electromagnética es conocido como espectro electromagnético y se extiende desde los 10 nm para los rayos gamma y los rayos X hasta más de 25 cm para las ondas de radio. Otras formas que son de interés incluyen las radiaciones infrarroja y ultravioleta.

b. Absorción de la luz por las sustancias.

Puesto que la luz es una forma de energía, la absorción de un fotón por una molécula de una sustancia causa un incremento en su contenido energético; este incremento es igual a la energía del fotón. Si la molécula se encuentra en su estado basal o fundamental (E_0) antes de la interacción, el proceso de absorción eleva su contenido energético a un estado superior o "excitado" (E_1). Los experimentos han demostrado que los cambios energéticos debidos a la absorción de la luz no son funciones continuas, sino que ocurren solamente en múltiplos enteros de la unidad de energía -llamada cuanto- característica de cada especie química. Para que un fotón sea absorbido por una molécula, la energía del mismo debe corresponder precisamente a la diferencia entre dos niveles energéticos de la molécula (figura 5).



Energía del fotón = diferencia de energía

Fig. 5. Diferencia entre dos niveles energéticos.

La energía potencial de una molécula, excluyendo su energía nuclear, puede considerarse como la suma de sus energías electrónica, rotacional y vibracional. Las energías electrónicas se asocian con las transiciones de los electrones dentro del átomo o molécula (ver figura 6).

Las energías rotacionales o vibratoriales se asocian con las rotaciones y/o vibraciones de los átomos o grupos de átomos respecto a ellos mismos en la molécula (ver fig 6).

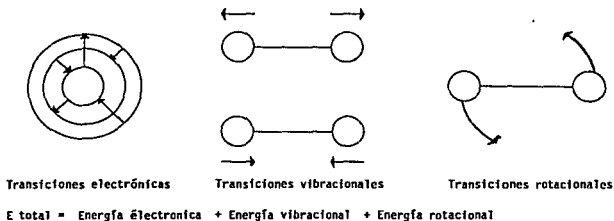


Fig. 6. Tipos de transiciones en los átomos.

Las diferencias entre estados energéticos rotacionales de una molécula son relativamente pequeñas, mucho menores que las diferencias energéticas entre niveles electrónicos. Las diferencias energéticas entre estados vibracionales son intermedias. Consecuentemente, la absorción de la luz asociada con energías rotacionales se halla situada por lo general en la región de baja energía o longitud de onda larga del espectro electromagnético, esto es, el infrarrojo lejano. Absorciones asociadas con diferencias electrónicas, se encontrarán en la región del espectro de alta energía o longitud de onda corta (ultravioleta y visible). Absorciones debidas a diferencias vibracionales se encontrarán entre las dos, principalmente en el infrarrojo cercano.

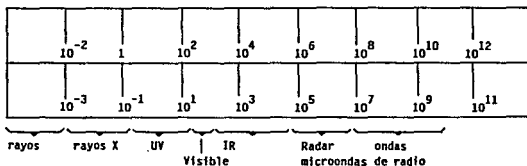


Fig. 7. Espectro electromagnético.

En la práctica, cuando la luz entra en contacto con algún cuerpo colorido, algunas de sus longitudes de onda componentes son absorbidas y las restantes son reflejadas o transmitidas según sus características fisicoquímicas. A este fenómeno se le denomina absorción diferencial.

En contraste, los cuerpos negros y blancos no siguen este comportamiento, ya que los primeros absorben todas las longitudes de onda, en tanto que los segundos sólo las reflejan pero no las absorben. Es de suponer que, desde el punto de vista de la espectrofotometría, el interés se centra en el tipo y cantidad de energía absorbida. La naturaleza y magnitud de las radiaciones absorbidas constituye una importante información concerniente a las propiedades del material analizado.

En el caso de las sustancias semitransparentes, la alternativa consiste en graficar la intensidad de la luz transmitida como una función de la longitud de onda; con ello se obtiene lo que se conoce como espectro de absorción de la sustancia estudiada. Un uso importante de los espectros de absorción es el de servir como guía para la selección de una longitud de onda adecuada para el análisis cuantitativo. Por lo general, la longitud de onda elegida es una región en la cual la sustancia a determinar absorbe fuertemente, mientras que otras lo hacen en proporción insignificante. En este caso encontramos que la absorción diferencial es la base para la aplicación de la espectrofotometría de absorción al análisis cuantitativo y cualitativo (ver figura 8).

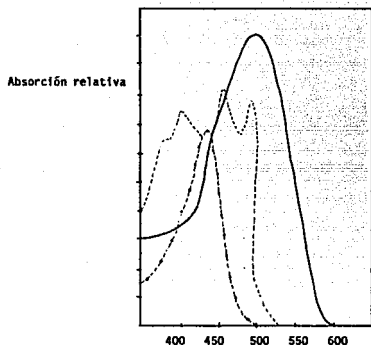


Fig. 8. Espectros de absorción visibles de tres pigmentos carotenoides

Los estudios de espectros de absorción contribuyen enormemente al conocimiento de las fórmulas, estructura y estabilidad de muchas especies químicas; así como al establecimiento de las condiciones más favorables para el análisis del mismo.

Es de suponerse que la cantidad de luz absorbida por una proporción fija de la especie absorbente dependerá del número de moléculas de la misma.

Consideremos el diagrama de la figura 9 en el que se muestra un caso hipotético en el cual un haz de luz monocromática incide sobre una celda llena con una solución transparente que contiene una sustancia absorbente. Si 100 fotones de radiación penetran en la solución y sólo emergen

50 al otro lado, decimos que la transmitancia de la solución es de 0.5.

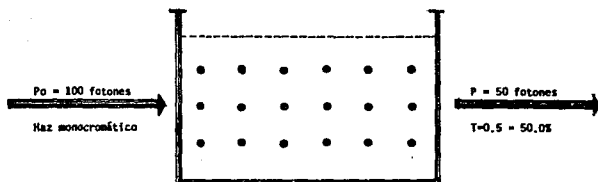


Fig. 9. Fundamento de la Ley de Lambert-Beer.

La potencia radiante, P_o , que cruza la muestra, es reducida en intensidad. La potencia emergente, P , es medida con objeto de estimar la magnitud de la reducción debida a la absorción. Por lo tanto, la transmitancia, T , es el cociente de la potencia radiante emergente dependiente de la muestra y el valor de la potencia radiante incidente que alcanza la muestra. El porcentaje de transmitancia es simplemente el producto de la transmitancia en relación al factor 100.

$$T = (P / P_o) \times 100 \quad (1)$$

La absorbancia, A , es el logaritmo base 10 del recíproco de la transmitancia.

$$A = \log (1 / T) = \log (P_o / P) \quad (2)$$

Resulta obvio que cuando se desea determinar cuantitativamente la concentración en una solución midiendo la cantidad de radiación que transmite, es necesario contar con alguna relación de trabajo entre la concentración en la solución y su capacidad de transmisión de radiación. La Ley de Lambert-Beer constituye tal relación.

1). Ley de Lambert-Beer. Beer postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria.

$$abc = \log (P_o / P) \quad (3)$$

Donde:

a = absortividad molar

b = longitud de la celda

c = concentración

P = potencia radiante emergente

P_o = potencia radiante incidente.

La absorptividad, a , se define como:

$$a = A / bc \quad (4)$$

Es ésta una constante física, fundamental para una especie química definida a una longitud de onda específica. A diferencia de la longitud y de la concentración, no puede ser cambiada por el experimentador. Tiene las dimensiones de litros/(gramo-centímetro) cuando la longitud interna de celda, b , se expresa en centímetros; y la concentración, c , en gramos/litro. Si las unidades de concentración son moles/litro, la absorptividad recibe el nombre de coeficiente de absorptividad molar.

2. EQUIPOS DE MEDICION DE ABSORCION DE ENERGIA RADIANTE.

Los espectrofotómetros se han convertido en piezas fundamentales en los laboratorios científicos e industriales en todo el mundo y se encuentran entre los instrumentos analíticos más utilizados. En la práctica, proveen datos de absorción, transmisión e incluso reflexión de un sinnúmero de sustancias químicas, información esencial para su caracterización cualitativa y cuantitativa.

Aunque el conocimiento completo de los instrumentos espectrofotométricos no es indispensable para su uso, el entendimiento básico de su diseño y operación es muy útil para la obtención de datos consistentes y reproducibles.

Esencialmente, un espectrofotómetro produce una banda angosta de radiación espectral -llamada radiación monocromática- y luego mide el grado de interacción entre esta radiación y una muestra química.

Para lograr ésto, el espectrofotómetro está formado por varios componentes mayores integrados en un solo sistema. Como se muestra en el diagrama de la figura 10, los componentes principales incluyen: la fuente de radiación, el monocromador, el detector, el amplificador y el instrumento de lectura. La unión de los tres últimos forma el sistema fotométrico. Los espectrofotómetros también incluyen un compartimiento para alojar la muestra y se ubica entre el monocromador y el detector.

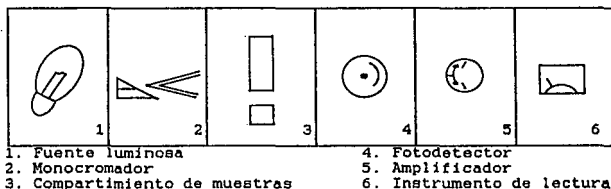


Fig. 10. Componentes básicos de un espectrofotómetro.

El diagrama anterior ilustra una medición espectrofotométrica típica. La luz que emana de la fuente penetra el monocromador, el cual aísla una banda espectral angosta y la dirige hacia la muestra. Dependiendo del grado de interacción (proceso de absorción), parte de la radiación

es transmitida al detector sensible a la luz, que la convierte en una señal eléctrica proporcional al nivel de potencia de radiación. Esta señal eléctrica es entonces amplificada y registrada por dispositivos de lectura apropiados.

El primer componente por mencionar es la fuente luminosa. En forma ideal, las fuentes deben proveer radiación intensa y estable sobre un rango espectral amplio y con salida comparable para toda longitud de onda. También deben ser dimensionalmente estables, de tamaño óptimo, durables y económicas.

La radiación emitida por cualquier fuente está constituida por un grupo de longitudes de onda. La Ley de Beer requiere, para su cumplimiento, que las estimaciones espectrofotométricas se lleven a cabo en presencia de radiación monocromática. La propiedad de separar entre sí las diferentes longitudes de onda para, subsecuentemente, aislar de manera selectiva una angosta banda de radiación, es atributo del sistema monocromador, el segundo componente de la figura.

Un sistema monocromador consta de un mínimo de dos piezas:

- * **Dispensor:** son prismas o rejillas, capaces de separar las longitudes de onda que integran el haz original sin su intensidad.
- * **Serie de ranuras.**

Además de las ranuras, se encuentran comunmente espejos y lentes cuyas funciones son, entre otras, la de aislar y dejar pasar hacia la muestra sólo las longitudes de onda de interés.

En tercer lugar está el compartimiento para muestras. En los equipos más sencillos sólo da cabida a una celda de dimensiones adecuadas; en equipos más completos puede aceptar varias celdas y permitir el desplazamiento del conjunto a fin de situar cada una de ellas en la trayectoria luminosa. Resulta común que exista un dispositivo mecánico que obstruya el paso de luz hacia el detector en ausencia de celdas en el compartimiento.

Las determinaciones espectrofotométricas son, en esencia, estimaciones sustractivas de potencia radiante; dado un cierto nivel de potencia emergente, a una cierta longitud de onda, se puede conocer el monto de la pérdida sufrida por absorción de la muestra. Esto se logra por la introducción de un cuarto componente: el detector.

Idealmente un detector debe ser capaz de convertir eficientemente la radiación en señal eléctrica; pero para que esta función sea de utilidad real, debe hacerlo de manera rápida, sin introducir perturbaciones y, mejor aún, debe mantener este comportamiento a través de un amplio intervalo de longitudes de onda.

Sin embargo, desde el punto de vista práctico, es necesario considerar el efecto neto de la combinación fuente-detector dado que la confiabilidad de las medidas depende en

buena parte de su grado de compatibilidad. Así entonces, una correcta elección de la fuente, permite compensar las deficiencias en respuesta que caracteriza a algunos detectores. Por tanto, es recomendable que el usuario se familiarice con las posibles combinaciones fuente-detector y sus cualidades.

Por ejemplo, la combinación lámpara de hidrógeno-tubo fotomultiplicador muestra un buen comportamiento desde aproximadamente 370 nm a poco menos de 200 nm.

La señal eléctrica que genera el detector en respuesta a la radiación recibida necesita ser procesada con objeto de que rinda una información útil. El examen espectrocópico requiere que se produzca una señal en ausencia de la muestra y otra en su presencia. Toca al sistema fotométrico realizar las operaciones pertinentes para lograr una apreciación cuantitativa de la diferencia entre dichas señales, ya que los métodos visuales son muy susceptibles a errores.

Los circuitos electrónicos más sencillos sólo pueden indicar puntos nulos o de balance de corriente valiéndose de ingeniosos ordenamientos de válvulas, potenciómetros y un galvanómetro. Las lecturas se toman de las escalas graduadas integradas a las perillas de operación, no existiendo una clara separación entre el amplificador y el instrumento de lectura.

Nuevas técnicas y un mejoramiento continuo de los circuitos hacen posible contar con galvanómetros graduados que permiten una lectura directa en unidades de uso común,

separándose así el instrumento de lectura del circuito amplificador. Hoy en día, es común observar instrumentos equipados con registradores automáticos e indicadores digitales.

C. Validación

1. CONSIDERACIONES TEORICAS.

a. Definición.

La validación de un método analítico puede definirse como el programa científico por medio del cual queda documentada la influencia de las variables físicas, químicas, cinéticas, instrumentales y aleatorias en su capacidad para proporcionar resultados analíticos.

b. Importancia.

Los resultados que se obtienen por medio de un método analítico se encuentran influidos por diferentes factores tales como: el medio ambiente (temperatura y luz), el uso de diferentes reactivos, analistas, laboratorios, equipos, materiales, etc. La validación tiene por objeto evaluar la influencia de todas estas variables en la capacidad del método para medir una propiedad física o química de la muestra en estudio y así poder emitir un juicio para decidir si el método puede o no ser aplicado a una situación particular.

c. Determinación de los parámetros de validación.

El escoger cuáles son los puntos para validar un método depende de las necesidades del laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales y del

criterio de la persona que lo realiza. Como existen muchas aplicaciones de los métodos, cada uno debe tener un esquema de validación particular.

Las categorías de métodos más comunes que requieren ser validados son:

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II. Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

Categoría III. Métodos analíticos para determinar características físicas. (V. gr. disolución y liberación del principio activo).

Tabla 4. Datos requeridos para la validación de métodos analíticos. (12)

Parámetro analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III
		a	b	
Precisión	+	+	-	+
Exactitud	+	+	*	*
Límite de detección	-	-	+	*
Límite de cuantificación	-	+	-	*
Especificidad	+	+	+	*
Rango	+	+	*	*
Linealidad	+	+	-	*
Tolerancia	+	+	+	+

- a. Cuantitativo
- b. Pruebas límite
- +. Necesario
- . No necesario

*. Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Atendiendo a lo anterior y dada la importancia de la determinación, se pueden proponer los experimentos que se harán para documentar de una manera apropiada la validación de un método.

Uno debe preguntarse ¿a qué está destinado el método? ¿qué se pretende determinar con él? ¿bajo qué condiciones se va a efectuar la determinación? ¿sobre qué forma farmacéutica? o ¿qué componentes de la forma farmacéutica podrían afectar la determinación?. La respuesta a cada una de estas preguntas dará el margen para diseñar el protocolo de validación.

Los métodos no sólo son utilizados para determinar principios activos o durante el proceso de producción de un medicamento, sino que muchas veces son utilizados para estudios de preformulación, estabilidad, estudios biofarmacéuticos, etc.

Así, para estudios de estabilidad es necesario contar con métodos específicos; y para estudios biofarmacéuticos se necesitan métodos selectivos para fármacos y metabolitos en fluidos biológicos.

En nuestro caso, el método para determinar Rifampicina en cápsulas es utilizado para fines de control de calidad, para evaluar el grado de mezclado de Rifampicina con excipientes en producto a granel, determinación de uniformidad de contenido y valoración de cápsulas en producto terminado; por lo que los parámetros que fueron seleccionados para su validación son: exactitud, precisión (repetibilidad y

reproducibilidad), linealidad (del método y del sistema de medición), especificidad ante excipientes y tolerancia de la muestra (estabilidad de la misma).

Al finalizar una validación se obtienen conclusiones de cómo será usado el método, bajo qué circunstancias funcionará, para qué tipo de muestras y qué variables habrá que controlar; es decir, se deben detectar todas las fuentes de variación que existan durante la realización del método para tratar de controlarlas al máximo.

d. Definición de los parámetros de validación.

1). Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de una sustancia. Las condiciones en las que el experimento debe efectuarse deben ser controladas; esto es: misma muestra, mismo analista, mismos instrumentos, etc.

2). Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto. Las mediciones de la precisión deben calificarse en términos de sus dos fuentes de variación que son repetibilidad y reproducibilidad.

a). Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, tiempo, etc.).

b). Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analistas, días, equipo, laboratorio, etc.).

3). Linealidad. La linealidad de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados -los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida- son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. También puede definirse como una relación que se establece mediante una línea recta entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada).

Cuando se determina la linealidad se obtiene el rango analítico de la determinación, el cual indica la mas alta y la mas baja concentración de la sustancia a ser determinada.

Es importante que el sistema de medición tenga linealidad; es decir, que sea capaz de obtener respuesta proporcional a la cantidad de sustancia introducida para su determinación. Por esta razón, dentro de la validación de un método analítico, se investiga la linealidad del sistema y a

veces también la precisión, pues por medio de estos parámetros se obtiene la información concerniente a la calibración del equipo. La calibración y la validación del sistema de medición es de suma importancia, ya que ello asegura que las variaciones que se obtendrán en los resultados serán debidas únicamente a variables del método y no del equipo.

4). Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

La especificidad de un método analítico puede dividirse como sigue:

a). Especificidad ante excipientes. Capacidad del método para obtener respuesta del principio activo y no de otro componente de la formulación.

b). Especificidad ante productos de degradación. Capacidad del método para obtener respuesta del principio activo y no del producto o productos de degradación.

5). Estabilidad de la muestra. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

e. Forma de evaluación de los parámetros de validación.

1). Exactitud al 100 %. Se determina de cuando menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto, haciendo el análisis bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

2). Precisión (repetibilidad). Analizar seis muestras preparadas por adición de la sustancia de interés en 80 %, 100 % y 120 % de la concentración de la muestra a placebos del producto.

3). Precisión (reproducibilidad). Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica. Debe ser determinada por lo menos por dos analistas en dos diferentes días, tres determinaciones por analista para dar un total de 12 resultados. Sin embargo, es posible estudiar la reproducibilidad del método con otras variables tales como equipo, laboratorio, etc., dependiendo del criterio de la persona que está validando.

4). Linealidad del método. Se determina a partir de placebos adicionados de, cuando menos, tres diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 %.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad o estabilidad) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

5). Linealidad del sistema. Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método, para control de calidad o para estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica. Deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %.

6). Precisión del sistema. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

7). Especificidad del método:

a). Especificidad ante excipientes. Analizar los placebos del producto con el método propuesto e identificar la respuesta del(los) activo(s), excipientes y otras sustancias presentes. Para este caso es de gran utilidad el uso de los espectros electromagnéticos.

b). Especificidad ante productos de degradación:

1.- Exponer las muestras por analizar a condiciones degradativas con el objeto de forzar su descomposición y analizarlas con el método.

2.- Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación) utilizando técnicas cromatográficas.

3.- En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebo y la sustancia de interés y se analizan con el método.

4.- Verificar que cada producto de degradación puede ser separado de la sustancia de interés por medio del método.

5.- Si lo anterior no ocurre, calcular el porcentaje de interferencia.

8). Estabilidad de la muestra. Se determina mediante la comparación de los resultados del análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo diferentes condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por el mismo analista.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria farmacéutica aún no se encuentran validados todos los métodos que son empleados en el control de calidad de los productos. Sin embargo, en la producción de un medicamento, por razones económicas y de regulación sanitaria, es necesario contar con métodos analíticos validados que, de manera sencilla, proporcionen resultados confiables, seguros y reproducibles. Por esta razón se validará un método espectrofotométrico para cuantificar Rifampicina en cápsulas. Dicho método es utilizado en el área de control de calidad para evaluar el grado de mezclado de Rifampicina con los excipientes en productos a granel, determinación de uniformidad de contenido y valoración de cápsulas como producto terminado durante la fabricación de cápsulas de Rifampicina.

III. OBJETIVOS

a. Objetivo general.

Establecer evidencia documentada de la validez del método analítico para determinar Rifampicina en cápsulas por espectrofotometría.

b. Objetivo específico.

Determinar: especificidad, exactitud, estabilidad de la muestra, linealidad del sistema, linealidad del método y precisión (repetibilidad y reproducibilidad), mediante el diseño de una metodología que permita concluir si el método tiene la capacidad de proporcionar resultados confiables.

IV. HIPOTESIS.

Si el método espectrofotométrico para la cuantificación de Rifampicina en cápsulas resulta ser preciso, lineal, reproducible, exacto y específico, entonces podrá considerarse como válido para ser empleado en pruebas de rutina en el área de control de calidad con un alto grado de confiabilidad.

V. MATERIAL Y METODOS.

A. Antecedentes del método

1. PROCESO DE PRODUCCION DE CAPSULAS DE RIFAMPICINA ^b.

El presente trabajo se enfocó a cápsulas de Rifampicina por lo cual se incluyó el siguiente preámbulo con la finalidad de conocer excipientes, equipo y precauciones usadas durante el proceso de producción, ya que es de importancia en el diseño del esquema de validación y permitió visualizar en qué etapas tiene aplicación el método validado.

a. Formulación unitaria.

Las cápsulas de Rifampicina, de acuerdo a la orden maestra de fabricación tienen la siguiente formulación unitaria.

Tabla 5. Formulación unitaria de las cápsulas de Rifampicina.

Materia prima	Cantidad	Unidad
Rifampicina	300.00	mg
Almidón de maíz	162.00	mg
Lactosa USP	40.00	mg
Lauril sulfato de sodio	5.00	mg
Estearato de magnesio	3.00	mg

^b Esta información fué proporcionada por Laboratorios Euromex S.A. de C. V.

b. Equipo de fabricación.

Durante el proceso de fabricación de las cápsulas se utiliza el siguiente equipo:

- 1.- Tamiz No. 22
- 2.- Mezclador romboidal de 240 Kg. de capacidad
- 3.- Horno de 240 Kg. de capacidad
- 4.- Máquina llenadora de cápsulas
- 5.- Charolas y contenedores de plástico

c. Precauciones.

Todo el proceso de fabricación se conduce de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura farmacéutica, observándose particularmente las siguientes:

- 1.- Antes de iniciar la fabricación, un supervisor del área de control de calidad verifica la limpieza del área de trabajo y del equipo empleado en la producción.
- 2.- Todo el personal que interviene en la fabricación usa: uniforme de trabajo, guantes, cofia, cubreboca, y zapatos adecuados.
- 3.- Durante todo el proceso se protege al producto de la luz ^o, y por lo mismo, el área de trabajo se encuentra diseñada para este propósito.

^o Debe protegerse el producto de la luz porque la Rifampicina es fotosensible.

d. Procedimiento de fabricación.

- 1.- En el horno de charolas, se seca el almidón de maiz y lactosa durante 14 horas a una temperatura de 60°C.
- 2.- Se pesa y tamiza por malla número 22: Rifampicina, almidón de maiz, lactosa, laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio y se mezcla durante 40 minutos.
- 3.- Se informa al departamento de control de calidad para la toma de muestra, para que éste evalúe el grado de mezclado de Rifampicina con los excipientes.
- 4.- Aprobada la mezcla, se llenan cápsulas de gelatina dura del número cero al peso calculado según la valoración del antibiótico.
- 5.- Durante el proceso de llenado el operador lleva gráficas con los controles de peso de las cápsulas llenas.
- 6.- Se informa al departamento de control de calidad para la toma de muestra del producto a granel para efectuar la valoración de las cápsulas.
- 7.- Una vez aprobado el producto a granel se procede al acondicionamiento del mismo.

e. Análisis a producto terminado.

Una vez obtenido el producto terminado, es necesario que cumpla con las especificaciones y requerimientos de calidad siguientes:

Tabla 6. Especificaciones de calidad de cápsulas de Rifampicina

Requerimientos	Especificaciones
1. Descripción	Cápsulas de gelatina dura del número cero conteniendo polvo rojo, libre de materia extraña.
2. Identidad: Infrarrojo Ultravioleta Cromatográfica	Positiva Positiva Positiva
3. Desintegración	No mas de 30 minutos
4. Uniformidad de contenido	90.0 % - 110.0 %
5. Perdida por secado	No mas de 3.0 % de humedad
6. Sustancias relacionadas	Pasa la prueba
7. Valoración Microbiológica Química	90.0 % - 130.0 % ^a 95.5 % - 107.5 % ^b

^a Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 5a edición, Secretaría de Salud, Mexico, 1989. p 1493.

^b The British Pharmacopoeia Vol II. London, Her majestic's stationery office, Ireland, England, 1988. p 646.

B. Recursos físicos.

1. MATERIAL

- 15 Matraz volumétrico de 100 ml Pyrex
- 5 Vaso precipitado 100 ml Pyrex
- 5 Pipeta volumétrica 2 ml Pyrex
- 2 Probeta graduada 100 ml Pyrex
- 10 Embudo filtración tallo corto Pyrex
- 1 Piseta
- 5 Soporte universal
- 1 Bolsa polietileno
- Papel aluminio
- 2 Pipeta volumétrica 1 ml Pyrex
- 2 Pipeta volumétrica 3 ml Pyrex
- 2 Pipeta volumétrica 4 ml Pyrex
- 2 Pipeta volumétrica 5 ml Pyrex
- 1 Matraz aforado 200 ml Pyrex

2. EQUIPO

- Balanza analítica Fisher Scientific XA
- Estufa Precisión Thelco model 10
- Espectrofotómetro Bush & M Modelo Spectronic 2000
- Equipo tamizador Ro - Tap
- Malla No 20
- Potenciómetro Modelo Conductronic pH 20

3. REACTIVOS

Acido clorhídrico R.A. J.T. Baker
Cloroformo reactivo "Baker Analyzed"
Fosfato disódico R.A. J.T. Baker
Fosfato monosódico R.A. J.T. Baker
Metanol absoluto reactivo "Baker analyzed"

4. ESTANDARES

Rifampicina USP. Reference standard USPC Inc.

5. MATERIAS PRIMAS

Rifampicina USP
Almidón de maiz FEUM
Lactosa FEUM
Lauril sulfato de sodio USP
Estearato de magnesio USP

C. Procedimiento.

1. METODO GENERAL EMPLEADO PARA CUANTIFICAR RIFAMPICINA EN CAPSULAS.

1.- Se mezcló el contenido de 10 cápsulas o se utilizó la mezcla de polvos del producto a granel para pesar el equivalente a 100 mg de Rifampicina.

2.- Se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml cubierto previamente con papel aluminio y se disolvió con ayuda de 30 ml de metanol, se aforó con el mismo disolvente, se agitó y se filtro utilizando papel whatman No. 4, descartando los primeros 5 ml.

3.- Del filtrado se tomó una alícuota de 2.0 ml y se transfirió a un segundo matraz volumétrico de 100 ml, el cual se aforó con solución reguladora de fosfatos pH 7.4

4.- Se determinó la absorbancia de esta solución a una longitud de onda de 475 nm, utilizando como blanco la solución reguladora de fosfatos pH 7.4

5.- Se determinó la concentración de la solución anterior por comparación de la absorbancia obtenida por una solución estándar de Rifampicina de concentración conocida.

a. Preparación del estándar de Rifampicina.

Se disolvió aproximadamente 100 mg de Rifampicina estándar en 30 ml de metanol absoluto, llevándose a un volumen de 100 ml y se mezcló. Se tomó una parte alícuota de 2 ml, transfiriéndose a un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al volumen con solución reguladora de fosfatos pH 7.4.

b. Preparación de la solución reguladora de fosfatos pH 7.4 .

Se disolvieron 2.38 g de fosfato disódico y 0.19 g de fosfato monosódico en 100 ml de agua, aforándose la solución a 1 litro. Se ajustó el pH utilizando ácido clorhídrico concentrado.

2. VALIDACION DEL METODO

a. Linealidad del sistema

1). Solución patrón. Se pesó aproximadamente 133.32 mg de Rifampicina estándar y se colocó en un matraz aforado de 200 ml, se disolvió con metanol absoluto y se llevó al volumen con el mismo disolvente.

2). De la solución anterior se tomaron por duplicado partes alícuotas (indicadas en la tabla 7) y se colocaron en matraces aforados de 100 ml, llevando al volumen con solución reguladora de fosfatos pH 7.4.

Tabla 7. Diluciones de la solución patrón

Porcentaje %	Volúmenes ml	Concentración ug/ml	Resultados	
33.33	1	6.66	Y11	Y12
66.66	2	13.33	Y21	Y22
100.00	3	20.00	Y31	Y32
133.33	4	26.66	Y41	Y42
166.65	5	33.33	Y51	Y52

3). Se continuó con el paso (4) del método general para obtener las lecturas de las soluciones.

En este caso los porcentajes de la concentración no son exactamente 50, 80, 100, 120 y 150 por ciento, sin embargo conservan su proporcionalidad con respecto al volumen y concentración, que deben permanecer constantes para evaluar sólo la respuesta del equipo a la concentración que se le introdujo.

b. Precisión del sistema.

- 1.- Se pesó 100 mg de Rifampicina USP estándar y se disolvieron con metanol llevando a un volumen de 100 ml.
- 2.- De la solución anterior se tomaron por sextuplicado, alícuotas de 2 ml las cuales fueron llevadas a un volumen de 100 ml con solución reguladora pH = 7.4.
- 3.- Se continuó con el paso (4) del método general para obtener las lecturas de las soluciones.

c. Exactitud del método al 100.00 %

- 1) Preparación del placebo.

Tabla 8. Composición del placebo de cápsulas de Rifampicina.

Excipientes	Cantidades (g) /cápsula-
Almidón de maiz	324.0
Lactosa USP	80.0
Lauril sulfato sódico	10.0
Estearato de magnesio	6.0

El peso de una cápsula con 100 mg de Rifampicina es de 530 mg

- 1.- Se secó el almidón de maíz y lactosa en horno de charolas durante 14 horas a una temperatura de 60°C. por separado.
- 2.- Se tamizó por malla numero 20 almidón de maíz y lactosa.
- 3.- Se mezcló almidón de maíz y lactosa tamizados con lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio durante 40 minutos, usando una bolsa de polietileno simulando un mezclador romboidal.

2) Determinación.

- 1.- Se pesó por duplicado las cantidades de Rifampicina USP indicadas en la tabla 9, de manera independiente.
- 2.- Se agregó a cada muestra 410 mg del placebo.
- 3.- Se analizó cada muestra de acuerdo al método general.

Tabla 9. Cantidad de Rifampicina pesada.

Muestra No.	Cantidad adicionada de Rifampicina USP.	Cantidad recuperada		porcentaje recuperado
1	100 mg	X11	X12	X1
2	100 mg	X21	X22	X2
3	100 mg	X31	X32	X3
4	100 mg	X41	X42	X4
5	100 mg	X51	X52	X5

d. Precisión del método (repetibilidad).

- 1.- Se pesó por quintuplicado las cantidades de Rifampicina USP indicadas en la tabla 10, de manera independiente.
- 2.- Se agregó a cada muestra 410 mg del placebo.
- 3.- Se analizaron de acuerdo al método general.

Tabla 10. Cantidades pesadas en repetibilidad.

Nivel %	Cantidad adicionada mg	Cantidad recuperada mg					Porcentaje recuperado
80	80	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y1
100	100	Y21	Y22	Y23	Y24	Y25	Y2
120	120	Y31	Y32	Y33	Y34	Y35	Y3

e. Precisión del método (reproducibilidad).

Como este parámetro se evalúa en una mezcla homogénea, se fabricó un lote piloto de cápsulas de Rifampicina y se tomó una muestra del mezclado de polvos para realizar lo siguiente:

Se efectuaron 12 determinaciones pesando 0.515 de la muestra y se analizaron de acuerdo al método general por dos analistas en dos días diferentes por triplicado (ver tabla 11).

Tabla 11. Esquema para evaluación del método

Reproducibilidad.

	Día 1	Día 2
Analista 1	Y111	Y211
	Y112	Y212
	Y113	Y213
Analista 2	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

f. Linealidad del método.

- 1.- Se pesaron por triplicado aproximadamente las cantidades de Rifampicina que se indican en la tabla 12, de manera independiente.
- 2.- Se agregó a cada muestra 410 mg de placebo.
- 3.- Se analizaron de acuerdo al método general para obtener las cantidades recuperadas correspondientes

Tabla 12. Esquema para evaluación de linealidad del método.

Rifampicina %	Rifampicina mg	Cantidad recuperada mg			Porcentaje recuperado
50	50	Y11	Y12	Y13	Y1
80	80	Y21	Y22	Y23	Y2
100	100	Y31	Y32	Y33	Y3
120	120	Y41	Y42	Y43	Y4
150	150	Y51	Y52	Y53	Y5

g. Especificidad.

1) Especificidad ante excipientes.

- 1.- Se obtuvo el espectro de absorción de un estándar de 100 mg de Rifampicina USP, tratado de acuerdo al método propuesto.
- 2.- Se obtuvo el espectro de absorción (zona visible) de 410 mg del placebo tratado de acuerdo al método propuesto y se comparó con el obtenido en el punto anterior.

h. Estabilidad de la muestra.

1) Condiciones de almacenamiento.

Las muestras se sometieron a estabilidad ante la luz a la temperatura ambiente, para lo cual se sometieron muestras a la acción de la luz y otras protegidas de la misma con papel aluminio.

2) Procedimiento.

1.- Se pesaron tres muestras de aproximadamente 100 mg de Rifampicina USP.

2.- Se pesaron tres muestras de 410 mg de placebo.

3.- Se mezcló cada muestra de Rifampicina con el placebo y se analizaron de acuerdo al método general

4.- Se colocaron tres muestras a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz y tres no protegidas (ver tabla 13).

5.- Se midió la absorbancia de las tres muestras a cada hora, durante un intervalo de dos horas las primeras y a una hora las segundas, utilizando un nuevo estándar a cada tiempo del análisis.

6.- Se corrió una placa cromatográfica para la muestra protegida y otra para la no protegida.

Tabla 13. Protocolo para la estabilidad de la muestra.

Muestra	Abs.inicial	Abs. 1 hora protegida	Abs. 2 horas protegida	Abs. 1 hora no protegida
1	Y1	Y4	Y7	Y10
2	Y2	Y5	Y8	Y11
3	Y3	Y6	Y9	Y12

Cromatografía.

Fase móvil: cloroformo-metanol (85 : 15)

Fase estacionaria: soporte: gel de sílice preparada con solución reguladora de citrofosfato pH 6.0

Método: aplicar en carriles separadas 100 microlitros de la muestra protegida, no protegida y estándar. Dejar que la fase móvil ascienda 12 cm sobre la línea de aplicación y observar.

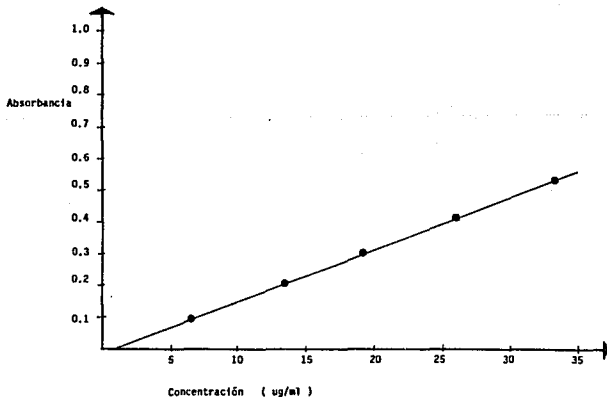
VI. RESULTADOS

A. Linealidad del sistema

Tabla 14. absorbancia de cinco diluciones de una solución patrón de Rifampicina USP estándar.

Porcentaje	Volúmenes ml	Concentraciones ug/ml	Resultados		Promedio
33.33	1ml	6.66	0.111	0.112	0.1115
66.60	2	13.32	0.223	0.222	0.2225
99.90	3	19.98	0.334	0.334	0.3340
133.20	4	26.64	0.445	0.444	0.4445
166.65	5	33.33	0.556	0.556	0.5560

Gráfica 1. Curva estándar de Rifampicina USP. donde se representa la absorbancia en función de diferentes concentraciones.



$$r = 0.999999189$$

$$r^2 = 0.999998378$$

$$m = 0.016666659$$

$$b = 0.000600135$$

$$CV = 0.52973$$

El sistema se considera lineal debido a que cumple con lo establecido en los criterios estadísticos de aceptación *

* Las fórmulas utilizadas para la obtención de los resultados así como los criterios de aceptación para cada parámetro de validación se encuentran en el anexo A.

B. precisión del sistema.

Tabla 15. Absorbancias obtenidas de seis muestras de una solución estándar al 100.00 %.

Muestra	Absorbancia
1	0.382
2	0.380
3	0.381
4	0.380
5	0.382
6	0.379

$$DE = 0.00110554$$

$$X = 0.38066667$$

$$CV = 0.29042252 \%$$

El sistema tiene precisión pues el coeficiente de variación (CV) resultó ser menor a 1.5 %.

C. Exactitud al 100.00 %

Tabla 16. Porcentaje de recuperación de placebos de Rifampicina cargados al 100.00 %.

Cantidad adicionada (g)	Cantidad recuperada (g)	Porcentaje recuperado (%)
0.1064	0.1051	98.78
0.1009	0.1042	103.27
0.1044	0.1044	100.00
0.1063	0.1053	99.06
0.0999	0.0995	99.60
0.1019	0.1018	99.90
0.1012	0.1013	100.10
0.1015	0.1005	99.01
0.1026	0.1025	99.90
0.1086	0.1085	99.91

1. EVALUACION ESTADISTICA DE LA EXACTITUD DEL METODO.

$$X \% = 99.953$$

$$DE = 1.192518763$$

$$CV = 1.19307951$$

$$IC = (99.585 - 100.321)$$

a. Prueba de contraste de hipótesis t-student.

$$H_0 : u = 100.00 \%$$

$$H_a : u = 100.00 \%$$

$$t \text{ calc} = - 0.09709$$

$$t \text{ tab} = 22.57$$

Area de aceptación de H_0 : ($t_{\alpha/2} = -2.57$ --- $t_{1-\alpha/2} = 2.57$)

$$\alpha = 0.05 \%$$

El método se considera exacto al 100.00 %, pues cumple con los criterios de aceptación correspondientes.

D. Precisión (repetibilidad)

Tabla 17. Porcentaje de recuperación de placebos cargados a diferentes niveles con Rifampicina USP.

Nivel %	Cantidad adicionada (g)	Cantidad recuperada (g)	porcentaje recuperado %
80.00	0.0828	0.08120	98.07
	0.0817	0.08093	99.06
	0.0808	0.08093	100.16
	0.0800	0.08093	101.16
	0.0818	0.07986	97.63
100.00	0.1005	0.09969	99.19
	0.1015	0.10210	100.59
	0.1084	0.10854	100.13
	0.1064	0.10157	95.46
	0.1070	0.11390	106.45
120.00	0.1209	0.11870	98.18
	0.1217	0.11970	98.36
	0.1218	0.11490	94.33
	0.1210	0.11870	98.10
	0.1211	0.12030	99.34

1. Evaluación estadística de la precisión del método.

$$X_i \% = 99.080666700$$

$$DE = 2.637558138$$

$$CV = 2.662031077$$

a. Prueba de contraste de hipótesis X_i^2

$$H_0 : 2.0 \%$$

$$H_a : 2.0 \%$$

$$g_l = 9.0$$

$$\alpha = 0.05\%$$

$$X_i^2 \text{ calc} = 13.15$$

$$X_i^2 \text{ tab} = 16.919$$

Area de aceptación de H_0 : ($X^2 \text{ calc} \leq X^2 \text{ tab}$)

E. Precisión del método (reproducibilidad)

Tabla 18. Porcentaje de recobro de muestras de un lote piloto de cápsulas de Rifampicina obtenidos por dos analistas en dos días diferentes.

	Día 1	Día 2
Analista 1	99.30	98.90
	99.40	100.19
	99.02	100.73
Analista 2	98.94	99.31
	100.43	101.03
	103.68	100.09

1. Evolución estadística de la reproducibilidad.

X %	=	100.085
DE	=	1.287720855
CV	=	1.286627222

a. Prueba de contraste de hipótesis F.

Ho :	μ_1	=	μ_2
Ha :	μ_1	=	μ_2

Tabla 19. Resultados del análisis de varianza de los datos de reproducibilidad.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc	Ftab $\alpha = 0.05$
Analista	1	0.07009	0.07009	2.9812	161.40
Día	1	0.4962	0.4962	2.1105	161.40
Anal-día	1	0.2351	0.2351	0.0560	5.32
Error	8	33.5532	4.1941		

Debido a que el CV es menor al 3.0 % y Fcalc es menor que Ftab, se admite la hipótesis nula; lo cual indica que no hay efecto observable en la variable de respuesta (porcentaje

de recuperación) por diferente analista en diferente día.
Considerándose, consecuentemente, al método como preciso.

F. Linealidad del método

Tabla 20. Cantidad recuperada de placebos de Rifampicina cargados en niveles de 50, 80, 100, 120 y 150 %.

Nivel %	Cantidad adicionada (g)	Cantidad recuperada (g)
50.00	0.0503	0.0501
	0.0537	0.0530
	0.0495	0.0487
	0.0593	0.0373
	0.0509	0.0503
80.00	0.0509	0.0503
	0.0819	0.0809
	0.0789	0.0771
	0.0800	0.0804
100.00	0.1088	0.1082
	0.1004	0.0977
	0.1029	0.1002
	0.1080	0.1061
	0.1034	0.0919
120.00	0.1221	0.1187
	0.1208	0.1187
	0.1222	0.1189
	0.1216	0.1206
	0.1224	0.1200
150.00	0.1514	0.1415
	0.1514	0.1508
	0.1505	0.1511
	0.1502	0.1511
	0.1509	0.1471

1. EVALUACION ESTADISTICA DE LA LINEALIDAD DEL METODO.

a. Cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

m	=	0.973445
b	=	7.9688 * (10E-4)
r	=	0.996431
r ²	=	0.992875
CV	=	1.1509463
R	=	98.74

b. Prueba estadística de contraste de hipótesis para la pendiente t-student.

H_0 : $m = 1$
 H_a : $m = 1$
 α = 0.05
 t_{tab} = 2.069
 t_{calc} = 1.464123

Area de aceptación de H_0 : ($t_{a/2} = -2.069$ -- $t_{a/2} = 2.069$)

c. Prueba estadística de contraste de hipótesis para la ordenada al origen t-student.

H_0 : $a = 0$
 H_a : $a = 0$
 α = 0.05
 t_{tab} = 2.069
 t_{calc} = 1.898

Area de aceptación de H_0 : ($t_{a/2} = -2.069$ -- $t_{a/2} = 2.069$)

El método se considera lineal, pues el análisis estadístico demostró que la pendiente puede considerarse como 1 (uno) y la ordenada al origen puede considerarse como cero. Además los parámetros del punto 'a' cumplen con los criterios estadísticos de aceptación.

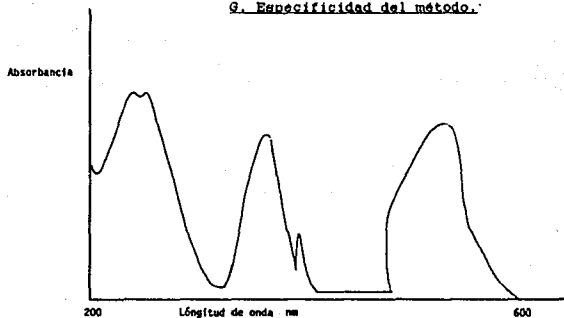
G. Especificidad del método.

Fig 11. Espectro de absorción de un estándar de Rifampicina USP Conc. 20.0 ug/ml en solución reguladora de fosfatos pH. 7.4

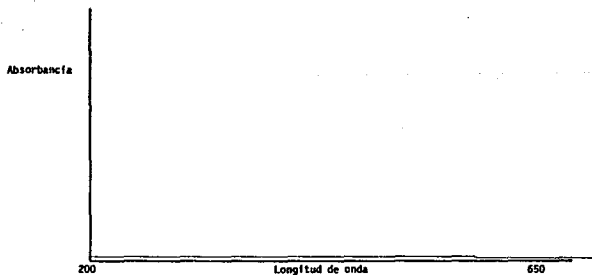


Fig 12. Espectro de absorción en un placebo en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 (zona visible).

Tabla 21. Absorbancia de los excipientes que integran la formulación de las cápsulas de Rifampicina, tratados de acuerdo al método general.

No de muestra	Absorbancia a 475 nm
1	0.001
2	0.002
3	0.000
4	0.003
5	0.002
Estándar Rifampicina	0.380

H. Estabilidad de la muestra.

Tabla 22. Absorbancias obtenidas para soluciones sometidas a estabilidad.

Muestra	Abs Inicial	Abs 1 hora protegida	Abs 2 horas protegida	Abs 1 hora no protegida
1	0.376	0.376	0.376	0.360
2	0.377	0.378	0.378	0.350
3	0.386	0.381	0.380	0.342
Estándar	0.376	0.375	0.378	0.374

Tabla 23. Porcentaje de recobro de soluciones de Rifampicina sometidas a estabilidad.

Muestra	Abs Inicial	Abs 1 hora protegida	Abs 2 horas protegida	Abs 1 hora no protegida
1	99.40	99.37	99.37	95.09
2	99.67	99.90	99.89	92.47
3	100.56	99.23	98.96	89.83

Tabla 24. Intervalos de confianza para muestras de Rifampicina sometidas a estabilidad

Condición	IC		Conclusión
Temperatura ambiente 1 hora, protegida	-1.1497	0.3965	Si es estable
Temperatura ambiente 2 horas, protegida	-1.3124	0.3724	Si es estable
Temperatura ambiente 1 hora, no protegida	-4.4453	-10.3878	No es estable

Tabla 25. Factor I para diferentes condiciones de almacenamiento de muestras de Rifampicina sometidas a estabilidad.

Condición	I	Conclusión
Temperatura ambiente 1 hora, protegida	99.62	Si es estable
Temperatura ambiente 2 horas, protegida	99.52	Si es estable
Temperatura ambiente 1 hora, no protegida	92.58	No es estable

Figura 13. Placa cromatográfica obtenida en el estudio de estabilidad de muestras de Rifampicina después de una hora

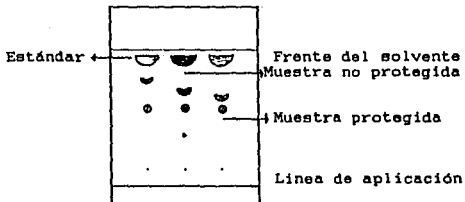
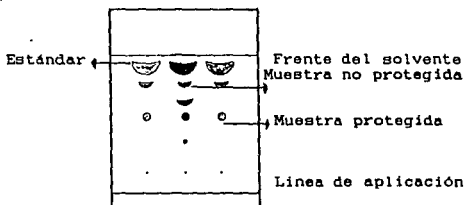


Figura 14. Placa cromatográfica obtenida en el estudio de estabilidad de muestras de Rifampicina después de dos horas



VII. DISCUSION DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el estudio de validación para el método de cuantificación de Rifampicina en cápsulas permitieron visualizar que los datos analíticos obtenidos por medio de esta metodología de trabajo son confiables, ya que presentan exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad ante excipientes y estabilidad de las muestras.

De lo anterior se deriva que este método sí puede ser empleado en el área de control de calidad para verificar el proceso de producción de cápsulas de Rifampicina, tanto en fase de granel como en producto terminado.

El método presenta ventajas tales como rapidez, sencillez y bajo costo; sin embargo, una de sus desventajas es que no da idea de la potencia de la Rifampicina, ya que sólo proporciona resultados con respecto a la concentración de ésta en una muestra y no hay forma de establecer una correlación entre la concentración de Rifampicina en cápsulas, calculada por vía espectrofotométrica, y la potencia microbiológica, puesto que en la validación no es posible establecer una comparación de métodos microbiológicos con métodos de tipo químico.

Para el caso presente, la parte cromófora de la molécula de Rifampicina -la cual es la base para su determinación espectrofotométrica a una longitud de onda de 475 nm- puede absorber luz y no necesariamente tener actividad biológica.

pues para que ésta se dé, es necesaria una serie de factores fisicoquímicos tales como la conformación estereoquímica de la molécula, las fuerzas eléctricas intramoleculares, la influencia del medio fisiológico, etc.; por lo cual, si hay necesidad de averiguar la potencia del antibiotico, se tiene que recurrir al método microbiológico.

Mediante esta validación, pudo comprobarse científicamente el efecto de las variables físicas, químicas, instrumentales y aleatorias sobre el método; logrando concluir que estas variables no afectan la capacidad del mismo para proporcionar resultados, ya que estadísticamente se demostró que no son significativas.

Intrínsecamente, el método es reproducible y repetible, lo cual garantiza que bajo diferentes condiciones de análisis (tal como analista día) se obtienen resultados consistentes, aún cuando no se logren controlar variables tales como reactivos empleados, material utilizado, calibración del mismo y temperatura del medio ambiente; que para el caso particular se consideraron constantes debido a que en un laboratorio generalmente no se tiene control sobre estos aspectos. Sin embargo, si el método quisiera emplearse en otro laboratorio tendría que evaluarse su reproducibilidad.

Uno de los parámetros importantes en un método analítico es la linealidad, pues ello proporciona la seguridad de obtener una respuesta proporcional con respecto a la concentración de la sustancia problema en la muestra; y esto es de suma importancia en este caso, ya que muchas veces

durante el proceso de producción de las cápsulas. en el producto a granel en el mezclado de polvos, existe un exceso o un faltante de Rifampicina por causa de un mal mezclado. Y este problema podrá detectarse mediante el empleo de este método.

El método es exacto y con esto se asegura que la influencia de variables tales como la concentración de la muestra, equipo analista, reactivos y materiales no influyen en las condiciones de medición de la propiedad del sistema (absorbancia), lo cual garantiza que si una serie de resultados durante la validación resultó ser exacto, cuando se realice una determinación independiente, se tendrá la confianza suficiente para considerar al dato también como exacto, basándose en la estadística inferencial.

Un punto importante es la especificidad del método, ya que de acuerdo a la literatura no es selectivo para cuantificar exclusivamente a la molécula de Rifampicina, debido a que los productos de degradación son también Rifamicinas, las cuales poseen la estructura cromofórica que absorbe luz a la longitud de onda utilizada. Sin embargo, considerando que el polvo de Rifampicina es muy estable, que las posibles vías de degradación de la molécula son de tipo oxido-reducción, que la temperatura de almacenamiento y fabricación de las cápsulas no sobrepasa los 25°C (temperatura promedio de la Ciudad de México), que durante la fabricación de las mismas se protege al producto de la luz y no hay etapas de granulación sino un mezclado con excipientes

sólidos, se considera que no existe degradación de Rifampicina. Sin embargo se recomendaría efectuar la prueba de identidad cromatográfica al final del proceso.

Sin embargo, como puede apreciarse en las figuras 11 y 12, el método sí resulta específico ante los excipientes de la formulación, ya que son eliminados durante la fase de filtrado.

Por lo anterior queda restringida la aplicabilidad del método para obtener resultados en pruebas de estabilidad, pudiéndose utilizar sólo para pruebas de rutina (control de calidad).

Con respecto a la estabilidad de las muestras, puede afirmarse que no hay probabilidad de que ocurra una degradación de la Rifampicina en un lapso de dos horas a temperatura ambiente, siempre y cuando se encuentren protegidas de la luz.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio del presente trabajo y tomando en cuenta los parámetros de validación, se concluye que los resultados analíticos obtenidos por el método para determinar Rifampicina en cápsulas por espectrofotometría son exactos, reproducibles y repetibles. El método es específico ante excipientes y presenta linealidad. Por lo tanto puede ser empleado con un alto grado de confiabilidad en el área de control de calidad para pruebas de rutina.

ANEXO

1. Significado de los términos estadísticos empleados

a. Contraste de hipótesis.

Ho	Hipotesis nula
Ha	Hipótesis alterna
χ^2	Prueba estadística de contraste "Chi" cuadrada
F	Prueba estadística de contraste "F" Fisher
t-student	Prueba estadística de contraste "t" estudent
gl	Grados de libertad
α	Nivel de significancia

b. Regresión lineal

b	Ordenada al origen
m	Pendiente
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
X_n	Variable independiente enesima
Y_n	Variable dependiente enesima

c. Términos estadísticos

CV	Coefficiente de variación
\bar{X}	Media aritmética del porcentaje de recobro
IC	Intervalo de confianza
DE	Desviación estándar
n	Número de datos

2. Cálculos requeridos para obtener los datos de los parámetros de validación y sus criterios estadísticos de aceptación.

a. Linealidad del sistema

Cálculos requeridos: ΣX , ΣY , ΣY^2 , ΣX^2 , ΣXY , DE.

$$m = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma Y - m(\Sigma X)}{n}$$

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

$$CV = \frac{DE * 100}{X \%}$$

$$DE = \sqrt{\frac{(\Sigma X_n - X \%)^2}{n}}$$

Criterio: si el sistema cumple con las siguientes condiciones será lineal:

CV \leq 1.50 %

r \geq 0.99

r² \geq 0.98

m \approx 1.00

b \approx 0.00

b. Precisión del sistema**Criterio de aceptación:****CV \leq 1.50 %**

c. Exactitud al 100 %.

$$PR = \frac{\text{Cantidad recuperada} * 100}{\text{Cantidad adicionada}}$$

PR = Porcentaje recuperado

$$X \% = \frac{\sum PR_n}{n}$$

PR n = Porcentaje recuperado enésimo

$$DE = \sqrt{\frac{(\sum X_n - X \%)^2}{n}}$$

a). Intervalo de confianza

$$IC = X\% \pm t_{\alpha/2} DE / \sqrt{n}$$

Donde:

X% = Media del porcentaje recuperado

ta/2 = Valor teórico del estadígrafo de contraste
con una probabilidad acumulada de 0.975

n = Número de datos.

b). Coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE * 100}{X \%}$$

c) Por medio de la prueba de contraste de hipótesis t-student

Ho $\mu = 100.00 \%$. La media del porcentaje recuperado es igual al 100 %.

Ha $\mu = 100.00 \%$. La media del porcentaje de recobro es diferente del 100%.

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ calc} = \frac{X \% - \mu}{DE / \sqrt{n}}$$

Donde:

t calc = valor calculado del estadígrafo de contraste

X % = Media poblacional del porcentaje de recobro

DE = Desviación estándar

μ = Media poblacional

n = Número de datos

t tab = Valor teórico del estadígrafo de contraste a un nivel de significancia de 0.975 con n - 1 grados de libertad.

Criterios de aceptación: Si el método cumple con lo siguiente se llamará lineal.

+ El intervalo de confianza para la media debe incluir al 100.00 %

+ El coeficiente de variación $\leq 3.0 \%$

- + El promedio de recobro debe estar en el intervalo de 97.0 % - 103.0 %.
- + En la prueba de contraste de hipótesis para la media t calc \leq t tab.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

d. Precisión del método (repetibilidad)

1). Por medio del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE * 100}{X \%}$$

Donde:

DE = Desviación estándar del porcentaje recuperado

X% = Media aritmética del porcentaje recuperado

2). Por medio de la prueba de contraste de hipótesis X^2 .

Ho $\sigma^2 \leq 3.0 \%$. La varianza es menor o igual al 3.0 %

Ha $\sigma^2 > 3.0 \%$. La varianza es mayor del 3.0 %

Estadígrafo de contraste

$$X^2 \text{ calc} = \frac{(n - 1) DE^2}{\sigma^2}$$

Donde:

$X^2 \text{ calc}$ = Valor calculado del estadígrafo de contraste

n = Número total de datos

DE^2 = Varianza del porcentaje de recobro

σ^2 = Varianza poblacional

$X^2 \text{ tab}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste con una probabilidad acumulada de 0.975 y n - 1 grados de libertad.

Criterio: Si el método cumple con lo siguiente se llamará repetible.

- + El coeficiente de variación $\leq 3.0 \%$
- + El promedio de recobro debe encontrarse en un intervalo de 97.0% - 103.0%
- + El valor del estadígrafo de contraste calculado debe encontrarse en el intervalo:

$$X^2_{a/2} \leq X^2_{\text{calc}} \leq X^2_{\text{tab } 1-a/2}$$

e. Precisión del método (reproducibilidad)

1). Por medio del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE * 100}{X \%}$$

2). Por medio de la prueba estadística de contraste de hipótesis F.

Esta prueba se emplea para establecer la fuente de variación del método, pero no constituye un requisito mínimo dentro de la validación ^v.

La prueba se aplica para el caso particular del análisis de dos analistas en dos días diferentes y con tres replicaciones cada uno.

El modelo hipotético es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + d_j(i) + E_k(ij)$$

Donde:

- Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la k-ésima muestra analizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.
- μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.
- a_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$)
- $d_j(i)$ = Efecto del día analizado en el analista (donde $j = 1 \dots d$)

^v Información obtenida de: SSA. "Guías oficiales de validación". Dirección general de control de insumos para la salud. México, 1991. p 55.

$E_{k(ij)}$ = Error del método analítico (donde $j = 1 \dots d$).

a = Número de analistas (donde $a = 2$)

d = Número de días (donde $d = 2$)

r = Número de replicaciones ($r = 3$)

Procedimiento

1). Tabular los resultados de acuerdo al siguiente formato:

	Analista 1	Analista 2
Día 1	Y111 Y112 Y113	Y221 Y212 Y213
Día 2	Y121 Y122 Y123	Y221 Y222 Y223

Cálculos preliminares.

1. Calcular la suma de las combinaciones analista-día (Y_{ij})

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

2. Calcular la suma para cada analista (Y_i)

$$Y_1 = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_2 = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

3. Calcular la suma total (Y_{\dots})

$$Y_{\dots} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

4. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$\sum Y_{ij}^2 = (Y_{11.})^2 + (Y_{12.})^2 + (Y_{21.})^2 + (Y_{22.})^2$$

5. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$(\sum Y_{i..})^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2$$

6. Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado.

$$\sum\sum Y^2_{ijk} = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + \dots + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

7. Calcular la suma de los cuadrados del analista (SC a), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SC\ a = \frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} - \frac{Y^2_{...}}{adr}$$

8. Calcular la suma de los cuadrados del día analizado en el analista (SC d).

$$SC\ d = \frac{\sum\sum (Y_{ij})^2}{r} - \frac{\sum (Y_i)^2}{dr}$$

9. Calcular la suma de los cuadrados del error (SC e) con la siguiente fórmula:

$$SC\ e = \sum\sum Y^2_{ijk} - \frac{\sum\sum Y^2_{ij}}{r}$$

Cálculos finales.

1. Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc	F 0.05
Analista	$gla = a - 1$	SC a	$MCa = \frac{MCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$	$Fgla/gld$
Día	$gld = (d-1)a$	SC d	$MCd = \frac{SCd}{gld}$	$Fd = \frac{MCd}{MCE}$	$Fgld/gle$
Error	$gle = (r-1)ad$	SC e	$MCE = \frac{SCE}{gle}$	—	—

Criterios. Si el método cumple con lo siguiente se llamará reproducible.

- + El coeficiente de variación $\leq 3.0 \%$
- + En la prueba estadística de contraste de hipótesis (ANADEV A) se debe cumplir:
 - $Fa < Fgla, gld, 0.05$ El método es reproducible por los analistas.
 - $Fa \geq Fgla, gld, 0.05$ El método analítico no es reproducible por los analistas.
 - $Fd < Fgld, gle, 0.05$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

$F_d \geq F_{gld, glc, 0.05}$

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

f. Linealidad del método.

1). Pruebas estadísticas para cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

Calcular m , b , r , r^2 , CV , R , como en la linealidad del sistema.

2). Prueba de contraste de hipótesis para la pendiente.

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - M) (DE y/x) \sqrt{(n-1)}}{DE y/x}$$

Donde:

t_{calc} = valor calculado del estadígrafo de contraste

m = Pendiente de la recta

M = Valor teórico de la pendiente

n = Número de datos

$DE y/x$ = Desviación estándar

a) Intervalo de confianza al 95 %.

$$m \pm t_{\alpha/2} \frac{DE_{y/x}}{DE_x \sqrt{(n-1)}}$$

Donde:

m = Pendiente de la recta

t_{α/2} = Valor teórico del estadígrafo de contraste con n - 2 grados de libertad y una probabilidad acumulada de α/2.

DE x = Desviación estándar

n = Número de datos

3). Contraste de hipótesis para la ordenada al origen

H₀ : a = 0 El valor de la ordenada al origen es cero

H_a : a ≠ 0 El valor de la ordenada al origen es diferente de cero.

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc}} = \frac{b - B}{DE_{y/x} \sqrt{[\sum X^2 / n - \sum (X_i - \bar{X})^2]}}$$

Donde:

b = Pendiente de la recta

B = Valor teórico de la pendiente de la recta igual a cero.

a) Intervalo de confianza al 95.0 %.

$$b \pm t_{a/2} \text{ DE } y/x \sqrt{[\Sigma X^2/n \Sigma (X_i - X)^2]}$$

Donde:

- b = Ordenada al origen calculada
 t a/2 = Valor teórico del estadígrafo de contraste con n - 2
 grados de libertad y probabilidad acumulada de a/2
 n = Número de datos

Criterios de aceptación:

Curva de linealidad; cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$r = 0.99$$

$$r^2 = 0.98$$

$$CV = 3.0 \%$$

$$R = 95.0 \% - 103.0 \%$$

2). Prueba de contraste de hipótesis para la pendiente

La pendiente de la recta se considera con valor 1 si:

$$t \text{ calc } \quad t (-0.975, n-2 \text{ gl })$$

$$t \text{ calc } \quad t (0.975, n-2 \text{ gl })$$

Para intervalo de confianza al 95 %

El intervalo de confianza debe incluir al valor 1

3). Prueba de contraste de hipótesis para la ordenada al origen.

La ordenada al origen de la recta de regresión se considera con valor de cero si:

t calc t (0.975, n-2 gl)

t calc t (0.975, n-2 gl)

Para el intervalo de confianza al 95.0 %

El intervalo de confianza debe incluir el valor cero.

g. Estabilidad de la muestra.

1). Tabular los resultados con base al siguiente formato y realizar los cálculos indicados.

Inicial	Condición-tiempo		
	1	2	m
Y1	Y4	Y7	Y n-2
Y2	Y5	Y8	Y n-1
Y3	Y6	Y9	Y n

2). Cálculos preliminares para el intervalo de confianza.

MEDIA	Y _o	Y ₁	Y ₂	Y _m
VARIANZA	DE ² o	DE ² 1	DE ² 2	DE ² m

Varianza ponderada

$$DE^2 p1 = \frac{2 DE^2 o + 2 DE^2 1}{2 (c + 1)}$$

$$DE^2 p2 = \frac{2 DE^2 o + 2 DE^2 2}{2 (c + 1)}$$

$$DE^2 pm = \frac{2 DE^2 o + 2 DE^2 m}{2 (c + 1)}$$

Donde

c = número de condiciones a las que se somete la muestra

3). Cálculos finales para el intervalo de confianza.:

Para condición por tiempo:

$$IC = (Y_i - Y_o) \pm t^* \times \sqrt{DE^2 i (2/3)}$$

Donde:

t^* = Valor de la t de Dunnet con c comparaciones y $2(c + 1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

4). Cálculos preliminares para el coeficiente de variación

Para la condición tiempo-muestra, calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra-condición-tiempo}) i * 100}{(\text{análisis inicial})}$$

$$I1 = Y4 / Y1 * 100$$

$$I2 = Y5 / Y2 * 100$$

$$I3 = Y6 / Y3 * 100$$

$$I4 = Y7 / Y1 * 100$$

$$I5 = Y8 / Y2 * 100$$

$$I6 = Y9 / Y3 * 100$$

$$I7 = Y(n - 2) / Y1 * 100$$

$$I8 = Y(n - 1) / Y2 * 100$$

$$I9 = Y(n) / Y3 * 100$$

Para cada condición-tiempo, calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{I (\text{condición-tiempo})}{N}$$

Donde:

N = Número de muestras por cada condición-tiempo

$$I1 = \frac{I1 + I2 + I3}{3}$$

$$I2 = \frac{I4 + I5 + I6}{3}$$

$$I3 = \frac{I7 + I8 + I9}{3}$$

Criterios de aceptación: si las muestras cumplen con los siguientes criterios se llamarán estables:

- * Los intervalos de confianza para cada condición-tiempo deben incluir al valor cero; y
- * la media del factor (I) para cada condición-tiempo debe estar incluida en el intervalo de 97.0 % -- 103.0 %.

REFERENCIAS

1. Prelog, V. Pure Appl. Chem, 7 , 551 (1963)
2. The merc index; and enciclopedia of chemical, drugs, and biological. 10A edition. Published by Meerc Co. N.J. USA, 1983. p. 1187.
3. Pasqualucci, C. Vigevani A. Farmaco (pavia) Ed prat. 24, 46 (1969)
4. Florey, K. Analytical profiles of drug substances. vol. 5, Academic press. New York, N.J. USA. 1976 pag 470 - 505
5. Clarke, E.G. Isolation and identification of drugs Vol. 2, first edition. The pharmaceutical press, London, Great Britain, 1975 p 1092
6. Maggi, N. Vigevani A. Journal of Medical Chemistry 11, 936 (1968)
7. Sano M. Tsunakawa. Shinryo, 23, 928 (1970)
8. Furezz, S. Scott, R. Arzneimittel - forsch. 17, 534 (1967)
9. Connors, K. Curso de analisis farmacéutico 2ª edición, Editorial Reverte. España, 1980 p. 145
10. USP, XXII. Seventeenth edition, United States pharmacopeial convention Inc. United States of América 1990, p. 1712

11. Lehninger, A. L. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular, 2ª edición, tr Dr. Fernando Colvets Prots y Dr. Jorge Bozal Fes. Editorial Omega S.A. Barcelona España 1984 p 934
12. British pharmacoposia Vol II. London her majestic's stationery office. Ireland, England 1988 p 647

BIBLIOGRAFIA

1. Brufani, M. Fideli, W. "The X-ray analysis of the structure of Rifamycin Y" Experientia. 23, 508 (1967)
2. Cricchio, R. Lancini, G. "Oximes of 3-formily rifamycin SV : synthesis, antibacterial activity, and other biological properties" Journal of Medical Chemistry. 17, 306 (1974)
3. Gallo, G. Chiessa, L. "Rifamycin XXIII: the polarographic behavior of rifamycin b, rifamycin O, rifamycin S, and rifamycin SV" Analytical Chemistry. 34, 423 (1962)
4. Gallo, G. Pasqualucci, C. "Improved differential spectrophotometric analysis of rifamycins" Journal of Pharmaceutical Sciences. 59, 5 (1970)
5. Hoover, J. Remington's pharmaceutical sciences. 5th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania USA. 1975. p 1598
6. Maggi, N. Pasqualucci C. "A new class of active semisintetic rifamycins N- substituted aminomethyl derivates of rifamycin SV" Journal of Medical Chemistry. 8, 790 (1965)
7. Maggi, N. "Rifampicin: a new orally active rifamycin" Chemoterapia. 11, 285 (1966)
8. Maggi, N. Vigevani, A. "Desacetyl-rifamycins: Preparation and antibacterial properties" Experientia. 24, 209, (1968)

9. Maggi, N. Vigevani, A. "Acetyl migration in rifamycin"
Journal of Pharmaceutical sciences, 11, 936. (1968)
10. Opolzer, W. Prelog, V. "Über die Konstitution und
Konfiguration der rifamycine B, O, S, und SV."
Helvetica Chemica Acta, 56, 2287 (1973)
11. Pasqualucci, C. Vigevani, A. "Analisi spettrofotometrica
della rifampicina" Farmaco (Pavia). ED. prat. 24, 46
(1969)
12. Sensi, P. Coronelli, C. "Chromatographic studies of some
products of transformation of rifamycins b" Journal of
Chromatography, 5, 519 (1961)
13. Rasgado, L. "Desarrollo y validación de un método
analítico para determinar Naproxen en granulado"
(Tesis). UNAM, México 1990.
14. SSA. Dirección General de Insumos para la Salud. "Guías
oficiales de validación". México. 1991.