



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE MOXIFLOXACINA,  
POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN, PARA MATERIA  
PRIMA UTILIZADA EN LA PRODUCCIÓN DE SOLUCIONES OFTÁLMICAS.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DIANA KARINA GARCÍA GUZMÁN**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** MUÑOZ PADILLA CAROLINA  
**VOCAL:** MAYA RUIZ GEORGINA MARGARITA  
**SECRETARIO:** GARCÍA ESCANDÓN DANIEL  
**1er. SUPLENTE:** PEÑA ÁLVAREZ ARACELI PATRICIA  
**2° SUPLENTE:** RODRÍGUEZ JUAN MANUEL

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Alcon Laboratorios S. A. de C. V.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Q.B.P. Daniel García Escandón**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.F.B. Luz Ma. Espinosa Colín**

**SUSTENTANTE:**

---

**Diana Karina García Guzmán**



## ÍNDICE

Tema	Pág.
<b>Capítulo I. Introducción</b>	
<b>1. Objetivos.</b>	<b>7</b>
<b>2. Hipótesis.</b>	<b>7</b>
<b>3. Justificación.</b>	<b>7</b>
<b>4. Marco teórico.</b>	<b>8</b>
<b>4.1. Validación de Métodos analíticos</b>	
4.1.1. Definición e importancia.	8
4.1.2. Normatividad y regulación.	9
4.1.3. Parámetros de desempeño y criterios de calidad.	10
<b>4.2. Cromatografía.</b>	<b>17</b>
4.2.1. Tipos de cromatografía.	17
4.2.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.	18
4.2.3. Parámetros cromatográficos.	19
4.2.4. Análisis cualitativo y cuantitativo.	22
4.2.5. Instrumentación general.	23
4.2.5.1. Depósito de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes.	24
4.2.5.2. Sistema de bombeo.	25
4.2.5.3. Inyectores.	26
4.2.5.4. Columnas.	26
4.2.5.5. Fases estacionarias.	28

4.2.5.6. Fases móviles.	29
4.2.5.7. Detectores.	31
4.2.5.8. Sistema para el tratamiento de datos y registrador.	34
<b>4.3. Moxifloxacin</b>	
4.3.1. Propiedades físicas y químicas.	35
4.3.2. Síntesis.	37
4.3.3. Propiedades biológicas.	40
4.3.4. Uso en soluciones oftálmicas.	40
<b>Capítulo II. Desarrollo de la validación.</b>	
1. Equipo y reactivos.	43
2. Preparación de disoluciones.	44
3. Condiciones de operación.	46
4. Parámetros cromatográficos del sistema.	46
5. Desarrollo de experimentos.	46
<b>Capítulo III. Cálculos.</b>	60
<b>Capítulo IV. Resultados.</b>	91
<b>Capítulo V. Análisis de resultados.</b>	100
<b>Capítulo VI. Conclusiones.</b>	108
<b>Capítulo VII. Bibliografía.</b>	109

<b>Anexo 1. Gráfico Linealidad del sistema.</b>	<b>111</b>
<b>Anexo 2. Gráfico Linealidad del método.</b>	<b>111</b>
<b>Anexo 3. Cromatogramas de Especificidad.</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 4. Glosario de términos médicos.</b>	<b>115</b>

## Capítulo I. INTRODUCCIÓN

### 1. OBJETIVOS

#### ***Objetivo general:***

Validar el método analítico para cuantificar clorhidrato de moxifloxacin a la concentración de moxifloxacin base libre de 0.1 mg/mL por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, utilizando una columna Metachem Fenil Inertsil, 5 µm, 4.0 x 250 mm a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, utilizando un detector UV a una longitud de onda de 295 nm y un volumen de inyección de 25 µL.

#### ***Objetivos específicos:***

- Realizar y llevar a cabo el Protocolo Específico de Validación de moxifloxacin.
- Confirmar que el sistema analítico sea lineal, preciso, exacto, robusto, tolerante, específico y que la adecuabilidad del sistema cumple con los parámetros de exactitud, de acuerdo a los lineamientos básicos establecidos en la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB´s”.

### 2. HIPÓTESIS

Se verificará que el método para cuantificar moxifloxacin, materia prima por CLAR cumple con los parámetros establecidos en el Protocolo Específico de Validación, realizado previa investigación y que es adecuado para su utilización en el Laboratorio de Control Fisicoquímico.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La validación de los métodos analíticos utilizados en las actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos. En éste caso se trata de un método analítico desarrollado por el laboratorio en casa matriz para cuantificar moxifloxacin materia prima, ya que no se encuentra compendiado en ninguna farmacopea, es necesario su validación en el laboratorio donde se utiliza.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **2.1.1. Definición e importancia.**

La validación de un método se puede definir como el proceso de demostración experimental y documentada de que un método analítico satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada [2]. Las exigencias de validación de estos métodos a efectos del cumplimiento de normas, incluyen estudios de exactitud, precisión, linealidad, selectividad, tolerancia, límite de detección, límite de cuantificación y robustez, los cuales se detallarán más adelante y se deben especificar como se realizarán en el Protocolo específico de la validación, que es el documento de planeación de experimentos y/o pruebas específicas para demostrar que el método cumple con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra, denominado analito [3]. Todo proceso de medición debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido, de manera que puedan ser reproducidos satisfactoriamente siguiéndolos correctamente, por lo que se crea la necesidad para la estandarización de los métodos que permiten la calidad de productos, materias primas y procesos, como un sistema crítico en el Aseguramiento de Calidad en una empresa farmacéutica, ya que impactan de manera directa en la calidad de un producto.

Los métodos analíticos se pueden denominar en función de:

Su estado regulatorio	La naturaleza de la respuesta analítica:	Su propósito analítico
<ul style="list-style-type: none"><li>• Métodos farmacopeicos. aquellos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, Europea, entre otras).</li><li>• Métodos no farmacopeicos. Son los métodos no compendiados en una farmacopea.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones <math>-OH</math> o consumo de un acomplexante).</li><li>• Métodos biológicos. Cuya respuesta depende del crecimiento de algún microorganismo o su inhibición.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Métodos para cuantificar un analito (contenido o potencia).</li><li>• Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.</li><li>• Métodos para identificar el analito.</li></ul>

Esta última clasificación es la que se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico.

### 2.1.2. Normatividad y Regulación.

Diferentes organismos europeos y americanos como la FDA (*Food and Drug Administration*) y EPA (*Environmental Protection Agency*) relacionados con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL's) recomiendan que los métodos analíticos sean sometidos a validación, con el objetivo de demostrar que los datos obtenidos con dichos métodos son aceptables para el fin que se pretende. Por ejemplo, para métodos analíticos aplicados a muestras farmacéuticas existen guías de validación establecidas por diferentes organismos, como la ICH (International Conference on Harmonization) sometida a consulta de las partes regulatorias de la Unión Europea, Japón y Estados Unidos o para nuestro país la guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos que es en la que se basa este trabajo. En México, el Reglamento de Insumos para la Salud publicado en el Diario Oficial el 4 de febrero de 1998 referente a los establecimientos que se destinan a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos) establece, en su artículo número 15 la validación de las técnicas empleadas.

Entre las Normas que contemplan la validación están:

- NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, de acuerdo con lo establecido en el numeral 9.12 “control del laboratorio analítico”, se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).
- NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos, menciona la validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, compendiados o no.
- NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de medicamentos, refiere que los métodos analíticos para este tipo de estudios deben de estar validados o en caso de cambiar de método durante el estudio de estabilidad se debe demostrar que los dos métodos son equivalentes mediante el proceso de validación.

Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos.

### **2.1.3. Parámetros de desempeño y criterios de calidad.**

Los parámetros de desempeño son aquellos parámetros analíticos específicos a estudiar en un protocolo de validación [3]. Los criterios de calidad son los aspectos cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico, dado que son la materialización o expresión numérica de características o indicadores de calidad de los métodos para las pruebas a realizar [20].

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar.

<b>Parámetro de desempeño</b>	<b>Contenido/ Potencia/ Valoración</b>	<b>Pruebas de impurezas</b>		<b>Identificación</b>
		<b>Contenido/Valoración</b>	<b>Límite</b>	
Precisión del sistema	Sí	Sí	Sí	*
Linealidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Exactitud y repetibilidad	Sí	Sí	No	No
Linealidad del método	Sí	Sí	No	No
Precisión del método o precisión intermedia	Sí	Sí	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

### ***Precisión.***

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles:

- *Repetibilidad:* Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por un único analista en un tiempo breve.
- *Precisión intermedia (o del método):* Grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por dos analistas en dos días diferentes.
- *Reproducibilidad:* Grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por analistas distintos en laboratorios diferentes y en distintos días.

En los estudios de precisión se deben analizar por lo menos seis porciones representativas de una muestra a la concentración normal de trabajo, para la precisión del sistema un analista debe realizar todo el ensayo preparadas por dilución o por pesadas independientes; mientras que para la precisión del método un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra a la cantidad equivalente a una muestra analítica por sextuplicado. La precisión se expresa como la desviación estándar absoluta (de), varianza (cuadrado de la desviación estándar), desviación estándar relativa (DER) ó coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos.

### ***Linealidad.***

Capacidad de un método para dar respuestas relacionadas linealmente con la concentración del analito dentro de un determinado intervalo o rango de concentraciones. Para estimar esta capacidad con la que los datos experimentales se ajustan a una línea recta.

- *Linealidad del sistema:* La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método, el intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido/potencia /valoración. Se calcula el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ).
- *Linealidad del método:* Un analista debe preparar el placebo analítico, con los componentes que generalmente se encuentran en la muestra. A la cantidad de placebo equivalente a una muestra analítica, por triplicado adicionarle la cantidad de analito equivalente al 100% de éste en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles (superior e inferior) y analizar por triplicado cada nivel por un solo analista. Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada, calcular los mismos criterios que el linealidad el sistema más el intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC(\beta_0)$ ) y el coeficiente de variación de regresión ( $CV_{y/x}$ ). De los porcentajes de recobro calcular promedio ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional  $IC(\mu)$ .

### ***Especificidad.***

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis. Si se dispone de las impurezas se deben adicionar éstas al analito y/o a la muestra analítica. Cuando no se dispone de éstas, la muestra que contiene al analito debe someterse a condiciones que generan su inestabilidad química (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación) y aplicar el método a la muestra resultante.

### ***Exactitud.***

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia. Cuando se conocen los componentes de la muestra se debe preparar un placebo analítico con los componentes que generalmente se encuentran en la muestra, a la cantidad equivalente a una muestra de placebo por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito correspondiente al 100%, se debe analizar por un mismo analista bajo las mismas condiciones y se determina la cantidad recuperada del analito.

Se calcula el promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC ( $\mu$ ) del porcentaje de recobro.

### ***Estabilidad analítica de la muestra.***

Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. El analista debe establecer el período de análisis en el cual se desea evaluar la estabilidad y determinar si es posible fraccionar (muestras dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Calcular la media aritmética del análisis inicial ( $\bar{y}_0$ ) y de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial ( $|d_i|$ ).

### ***Límite de detección.***

Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Existen diferentes métodos para estimar el límite de detección (LD), con base en:

- Señal de ruido.
- Curva de calibración y desviación estándar de los blancos.
- Curva de calibración y la desviación estándar de regresión.
- Curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

El primer método aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y presentan una señal ruido, mientras que los demás métodos también aplican a métodos no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos tres concentraciones menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite y se miden las respuestas analíticas. El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

### ***Límite de cuantificación.***

Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. Para la estimación del límite de cuantificación se sugieren los siguientes métodos:

- Señal de ruido.
- Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos.
- Con base en la curva de calibración basado en la desviación estándar de la regresión.
- Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

El método de señal de ruido aplica a métodos que utilizan instrumentos que presentan una señal de ruido basal, en el cual se determinan respuestas de muestras blanco y la respuesta de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones del analito inferiores o que incluya la especificación de prueba de impurezas límite, mientras que los demás métodos para LC aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales, un analista prepara por triplicado tres concentraciones de la sustancia de interés a valores menores o que incluyan la especificación de la prueba de impurezas límite. Se miden las respuestas analíticas y se miden distintos parámetros de la regresión lineal obtenida.

**Robustez.**

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse, pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

Se deben establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión de la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, volúmenes de solventes orgánicos para una extracción, entre otros), relacionados al propio método, que se considere críticos. En cada condición de operación distinta: así como a la condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado. Se reporta el contenido, potencia o valoración del analito, según sea el caso del método. Calcular la media aritmética de la condición normal de operación ( $\bar{y}_0$ ) y para las muestras de las otras condiciones ( $\bar{y}_1$ ), también se calcula la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ( $|d_i|$ ).

**Tolerancia.**

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos del método.

Se deben establecer los factores ajenos al método, que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso, se fijan por lo menos dos condiciones de uso y se analizan una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Se calcula la media aritmética ( $\bar{y}_0$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido, potencia o valoración.

## 4.2 CROMATOGRAFÍA.

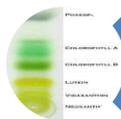
La cromatografía es un procedimiento físico-químico de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada fase estacionaria, está inmovilizada en una columna y la otra, llamada fase móvil, se desplaza al contacto de la primera [17].

La elución cromatográfica es el proceso mediante el cual la fase móvil pasa continuamente a través de la fase estacionaria, en la cual se introduce la muestra en una cantidad conocida. Los diferentes componentes de la muestra en función de las diferentes afinidades que presentan por ambas fases, se mueven a diferentes velocidades y eluyen, por tanto, a distintos tiempos [20]. Como consecuencia de esta diferencia de afinidad, los componentes se separan en bandas diferenciadas que, al pasar por el detector, darán una señal que se registrará en forma de bandas o picos.

### 4.2.1. Tipos de cromatografía.

Las técnicas cromatográficas se pueden dividir de acuerdo a la naturaleza física de las fases, según el procedimiento utilizado o según el fenómeno físico-químico originario del coeficiente de distribución.

- De acuerdo al procedimiento utilizado, algunos ejemplos son:



Cromatografía Plana: Fase estacionaria sostenida en papel o capa fina. La fase móvil se desplaza por capilaridad



Cromatografía en columna: Fase estacionaria contenida en un tubo estrecho, la fase móvil se hace pasar por gravedad.

- De acuerdo a naturaleza física de las fases y tipo de equilibrio.

#### Cromatografía Líquida

- Líquido-sólido (o de adsorción) ; la fase estacionaria es un sólido se da el fenómeno de adsorción.
- Iónica; en la fase estacionaria se encuentran sitios iónicos , separa especies ionizadas.
- De exclusión; fase estacionaria porosa con dimensiones para tamiz molecular.
- Líquido-Líquido (o de reparto); fase estacionaria líquida inmovilizado en material inerte.
- De afinidad; técnica de inmovilización por enlace, se fijan definitivamente las especies por enlaces covalentes.

#### Cromatografía de Gases

- Gas-Líquido ; fase móvil es un gas y fase estacionaria un líquido.
- Gas-Sólido; fase móvil es un gas y fase estacionaria un sólido poroso.

#### Cromatografía de fluidos supercríticos

- La fase móvil es un fluido supercrítico, como dióxido de carbono a 50°C y 150 bares, la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

### 4.2.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) presenta un gran campo de aplicación al poder ser utilizada en el análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes o polares, ya que actúa de forma precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, en tiempos relativamente cortos de análisis.

Los aspectos considerados a optimizar la CL fue incrementar la velocidad de la fase móvil mediante la utilización de bombas adecuadas y mejorar la resolución al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria, lo cual, reduce el término *A* de la ecuación de Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Donde *H*; es la altura del plato; *u*, es la velocidad lineal de flujo y *A*, *B* y *C* son constantes para una columna y una fase estacionaria dadas. En cuanto a la difusión

longitudinal  $B/u$ , sólo es significativo cuando la velocidad de flujo es excesivamente lenta. El término de resistencia a la transferencia de masa,  $Cu$ , es fundamental, ya que con velocidades de flujo elevadas, se conseguirán bajas resoluciones, a menos que la transferencia de solutos entre las fases móvil y estacionaria sea muy rápida, lo cual se soluciona con la reducción del tamaño de partícula de la fase estacionaria [9].

#### 4.2.3. Parámetros cromatográficos.

La separación efectuada se conserva en un registro individual llamado cromatograma, que es la expresión gráfica de las variaciones de composición de la fase eluida con el transcurso del tiempo y que es un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna [17].

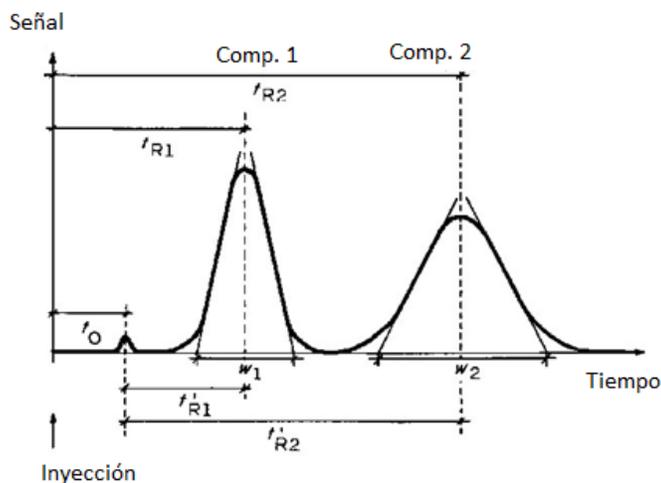


Fig. 2. Ejemplo de cromatograma con dos analitos.

El tiempo de elución se lleva al eje de abscisas y la intensidad de la señal detectada, al eje de las ordenadas. La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluido.

El tiempo de retención  $T_R$ , de un componente es el tiempo que transcurre desde la inyección de una mezcla en la columna hasta que ese componente llega al detector, la cantidad correspondiente, volumen de retención,  $V_R$  es el volumen de fase móvil necesaria para eluir un soluto determinado de la columna.

La fase móvil no retenida atraviesa la columna en el mínimo tiempo posible, designado como tiempo muerto,  $t_M$ . El tiempo de retención ajustado de un soluto es la diferencia entre el tiempo que tarda un soluto en atravesar toda la columna y el que emplea un disolvente no retenido:

$$T'_R = t_R - t_M$$

Si hay dos componentes, 1 y 2, la retención relativa,  $\alpha$ , es el cociente de sus tiempos de retención ajustados

Retención relativa:  $\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$

Donde  $t'_{R2} > t'_{R1}$  y por tanto  $\alpha > 1$ . Cuanto mayor es la retención relativa, mayor es la separación entre los dos componentes.

Para cada pico de un cromatograma se define el factor de capacidad,  $k'$  como:

Factor de capacidad:  $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

Cuanto más tiempo permanece un componente en la columna, mayor es su factor de capacidad.

Un pico de elución ideal en un cromatograma tiene el mismo aspecto que la función representativa de la ley de distribución normal de los errores aleatorios (curva de Gauss). Se trazan las tangentes en los puntos de inflexión a los dos lados del pico cromatográfico y se prolongan para formar un triángulo con la línea base. Se puede demostrar que el área de éste triángulo es casi 96% del área total bajo el pico, si éste es gaussiano se encuentra dentro del intervalo comprendido entre más o menos dos desviaciones estándar ( $\pm 2\sigma$ ) de su máximo. Las formas habituales de medir la anchura de banda son (1) la anchura  $w_{1/2}$ , medida a una altura igual a la mitad de la altura del pico, y (2) la anchura en la base  $w$ , medida en la línea base.

La resolución  $R$  proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos, lo cual se define como:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2}$$

En análisis cuantitativo es muy conveniente que la resolución sea  $> 1.5$ , para evitar traslapes en las señales de los analitos.

La altura de plato es la constante de proporcionalidad entre la varianza ( $\sigma^2$ ) de la banda y la distancia que ha recorrido ( $x$ ). El nombre está tomado de la teoría de destilación en la que la separación se lleva a cabo en pasos discretos llamados platos. En cromatografía no existen platos físicos, de manera que se debe considerar la altura de plato como un término que relaciona la anchura de una banda con la distancia que ha recorrido a través de la columna.

La capacidad de una columna para separar componentes de una mezcla mejora al disminuir la altura de plato. Decimos que una columna eficaz tiene más platos teóricos que una columna ineficaz. La altura de plato es la longitud  $\sigma^2/x$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la banda gaussiana, para un soluto que sale de una columna de longitud  $L$ , el número de platos teóricos ( $N$ ) en toda la columna es la longitud  $L$  dividida por la altura de plato:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{16L^2}{w^2}$$

Porque  $x=L$  y  $\sigma=w/4$ . En esta expresión,  $w$  tiene unidades de longitud y el número de platos es adimensional. Se obtiene la expresión más útil de  $N$  de la siguiente forma

Número de platos teóricos en una columna:

$$N = \frac{16t_R^2}{w^2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención del pico y  $w$  es la anchura en la base, en unidades de tiempo.

#### 4.2.4. Análisis cualitativo y cuantitativo.

La cromatografía ha llegado a ser el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí [21]. Además se puede emplear para la identificación cualitativa y para la determinación cuantitativa de las especies separadas.

Un cromatograma proporciona sólo un elemento de información cualitativa a cerca de cada una de las especies de la muestra, su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras un cierto periodo de elución, por lo cual la especie separada se puede comparar con un estándar.

La cromatografía en columna cuantitativa se basa en la comparación de la altura o del área del pico del analito con la de uno o más patrones. En cromatografía en plano, el área ocupada por las especies separadas sirve como parámetro analítico. Si se controlan las condiciones adecuadamente, esos parámetros varían linealmente con la concentración.

- **Análisis basados en la altura del pico.** Se obtiene uniendo las líneas base a cada lado del pico por una línea recta, y midiendo la distancia vertical desde esta línea al pico. Es importante considerar que las alturas de pico están inversamente relacionadas con las anchuras de pico, por ello sólo se obtienen resultados exactos si las variaciones en las condiciones no alteran las condiciones del pico. Las variables que deben controlarse estrechamente son la temperatura de la columna, el caudal del eluyente y la velocidad de inyección de la muestra.
- **Análisis basados en las áreas de los picos.** El área del pico es independiente de los efectos del ensanchamiento debido a las variables anteriores. Los instrumentos cromatográficos modernos están equipados con integradores electrónicos digitales, los cuales permiten una precisa estimación de las áreas de pico.

#### 4.2.5. Instrumentación.

Un equipo de CLAR se compone de varios módulos con funciones definidas, donde la circulación de la fase móvil entre éstos módulos se hace a través de conductos tubulares cortos de pequeño diámetro interno (0.1 mm).

Como algunas fases móviles usadas en CLAR pueden ser químicamente activas, como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes a esos posibles ataques. La mayoría de las partes del cromatógrafo en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable, previamente pasivado con ácido nítrico 6 M. Las mayores ventajas del acero residen en su coste relativamente bajo, la facilidad para construir con él distintos componentes y la resistencia mecánica, lo que permite operar a presiones muy elevadas [9].

Los componentes básicos de un sistema para CLAR son:

- Depósitos para fase móvil
- Sistema de bombeo
- Inyector
- Columna cromatográfica
- Detector
- Sistema para el tratamiento de datos y registrador

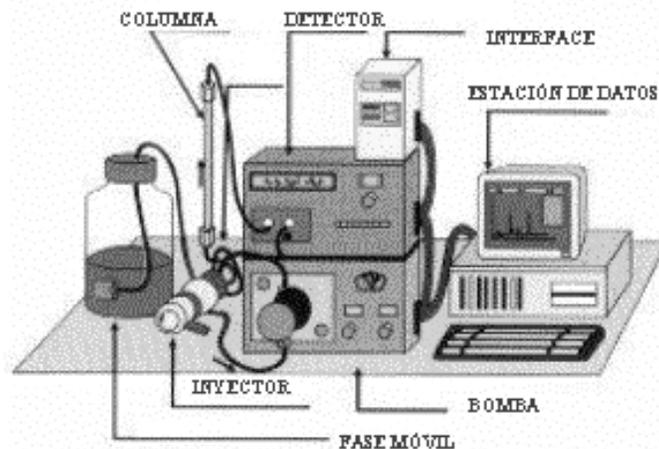


Fig. 1. Partes de un equipo CLAR.

#### **4.2.5.1. Depósito de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes.**

Los equipos para CLAR cuentan con uno o más depósitos de vidrio o acero inoxidable, debido a que son materiales resistentes e inertes a diversos disolventes. A menudo se incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y las partículas en suspensión.

Los solventes deben ser filtrados y desgasificados directamente antes de ser usados en el CLAR. La filtración previa no es esencial, si un filtro (generalmente de metal) se monta en el lado de donde se succiona el disolvente por la bomba de alta presión. Sin un filtro el disolvente debe ser filtrado antes de ser usado para evitar que ciertas partículas puedan ocasionar un daño en las válvulas de la bomba.

El aire no debe ser permitido en columnas que contienen material semi-rígido ya que podría derivarse un daño grave. Se debe evitar la formación de burbujas en el detector dado que el oxígeno disuelto podría absorber la luz ultravioleta por debajo de 260 nm o interferir en el detector de fluorescencia. El agua y alcoholes pueden disolver cantidades relativamente grandes de aire y siempre deben ser desgasificados. La desgasificación puede llevarse a cabo por ebullición, expulsión por helio, usando una unidad de desgasificación en línea con una membrana de gas-permeable o por medio de un baño de ultrasonidos. La ebullición no se recomienda si el disolvente contiene un aditivo o es en sí mismo una mezcla, ya que su composición se ve afectada. [12]

Existen dos alternativas respecto a la composición de la fase móvil:

-Modo isocrático: composición constante durante el proceso cromatográfico. Puede tratarse de un disolvente puro de una mezcla de dos o más disolventes, de disoluciones de concentración fija.

-Modo de gradiente: formación de un gradiente de composición de la fase móvil durante el proceso de separación que amplía enormemente la capacidad de discriminación de la CLAR. [22]

Se realizan gradientes de elución para disminuir la polaridad del eluyente durante la separación. [17]

Los instrumentos de CLAR están equipados con válvulas de mezcla que introducen líquidos desde dos ó más recipientes a velocidades variables de forma continua.

#### **4.2.5.2. Sistema de bombeo.**

Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, que fuerzan el paso de la fase móvil, a través de la columna cuyo relleno, muy compacto es responsable de una sobrepresión que puede alcanzar los 20.000 kPa (200 bares) según el caudal de la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de las partículas. Estas bombas pueden ser de un solo pistón o bien llevar dos pistones que funcionen en oposición y situados en serie para evitar las interrupciones de caudal.

Para mejorar la regulación del caudal, se intercala entre la/s bomba/s y el inyector un amortiguador de pulsos que funciona siguiendo el principio mecánico de equilibración de presiones.

Para obtener microcaudales (por ejemplo, 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) se utilizan las mismas bombas añadiendo a la salida un “by pass” para dividir el flujo en dos fracciones, de modo que la más pequeña de ellas se dirige a la columna. Además para resistir el pH ácido de muchas mezclas de elución las piezas y revestimientos al contacto de la fase móvil deben ser inertes. De este modo los pistones o válvulas son de teflón o aleaciones especiales e incluso de piedras preciosas como el zafiro o el ágata.

Dependiendo de su diseño, los cromatógrafos incluyen a su entrada o salida de la/s bomba/s una cámara de mezcla, que permiten liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático) o de composición variable para hacer un gradiente de elución.

Las bombas empleadas en la CLAR son de tres tipos:

\* Bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno. [21]

\* Bombas neumáticas o de presión constante, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. [9]

\* Bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL. [8]

Cuando el equipo incorpora una única bomba, esta viene precedida de una cámara de mezcla de baja-presión en la que unas electroválvulas introducen los diferentes disolventes cuya composición está programada. En el montaje de alta presión hacen falta tantos cabezales de bombas diferentes, como de disolventes. La mezcla final se obtiene a la salida en una pieza de “T” situada delante de la columna.

#### **4.2.5.3. Inyectores.**

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido en la columna y el detector. Para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías, manual o automatizada. Funciona en dos tiempos:

- Posición de carga: la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce a presión atmosférica, con la ayuda de una jeringa, en un pequeño depósito tubular denominado bucle.

-Posición de inyección: la muestra se introduce en el flujo de la fase móvil por rotación de 60 ° de una palanca que permite invertir el sentido de circulación en el bucle.

#### **4.2.5.4. Columnas.**

La columna es un tubo calibrado de acero que mide entre 3 y 30 cm. de longitud. Tradicionalmente se utiliza un diámetro interno de 4.6 mm que exige un flujo de fase móvil de 0.5 a 2 mL/min. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados entre sus extremidades.

En la columna se generan tantas equilibrios particulares entre la fase móvil, fase estacionaria y analitos en la muestra. Para elegir una columna puede decirse que la polaridad de la fase estacionaria debe ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utiliza entonces una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. [9]

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible. [8]

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

### ***Efecto de la temperatura.***

Un aumento de temperatura reduce el tiempo de retención y por tanto del análisis. Esto significa que la viscosidad de la fase móvil se reduce y por lo tanto la transferencia de masa mejorara a temperaturas elevadas, el número de platos teóricos aumenta en consecuencia. El uso del aumento de la temperatura como medio para mejorar la resolución es más adecuado para intercambio iónico y cromatografía de pares iónicos que para el método de adsorción. Un aumento en la temperatura reduce el valor de  $k'$  y por lo tanto la fuerza de la fase móvil posiblemente tiene que ser menor [12]. Sin embargo, aumentando la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y reducir la vida de la columna. Usando un horno a una temperatura a pocos grados por encima de la temperatura ambiente mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención y la precisión del análisis cuantitativo.

La temperatura máxima es de alrededor de 120 °C para columnas de sílice y no debe superar los 80 °C para las fases químicamente enlazados.

#### 4.2.5.5. Fases estacionarias.

La fase estacionaria es el medio en el cual los compuestos (analitos) inicialmente disueltos en la fase móvil van a interaccionar, por lo cual debe ser insoluble en la fase móvil. Entre los diferentes materiales se encuentran:

Gel de sílice	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sólido amorfo y rígido <math>\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n</math> en forma de microesferas con diámetro regular de 2 a 5 <math>\mu\text{m}</math>, es un polímero con distribución de red tridimensional muy polar.</li></ul>
Sílices modificados (con fase enlazada)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Para disminuir la polaridad del sílice, se aprovecha la reactividad de los grupos silanoles presentes en la superficie para fijar moléculas orgánicas a través de enlaces covalentes. El mecanismo de separación es por medio de coeficientes de reparto.</li><li>• Fases monoméricas. (10-15 <math>\mu\text{m}</math> de espesor); resultan, de la reacción de un monoclorosilano obteniéndose fases con cadenas lineales alquilo de 8 a 18 átomos de carbono</li><li>• Fases poliméricas (25 <math>\mu\text{m}</math>); se utiliza un di- o triclorosilano en presencia de vapor de agua que provoca una polimerización en disolución del reactivo se obtiene una capa polimérica reticulada antes de enlazarse al sílice.</li></ul>
Fases de polaridad variable	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polímeros estireno/divinilbenceno o hidroximetilestireno</li><li>• Aluminio y óxido de zirconio (<math>\text{ZrO}_2</math>) como esqueleto para depósitos reticulados a base de polibutadieno.</li></ul>

La calidad de un gel de sílice para cromatografía depende de varios parámetros como por ejemplo la estructura interna, el tamaño de las partículas, la porosidad abierta (dimensión y distribución de los poros), la superficie específica, la resistencia a la compresión y la polaridad.

El mecanismo de acción del gel de sílice se basa en la adsorción, fenómeno que consiste en la acumulación de un compuesto en una interfase [17]. En los casos más sencillos hay una formación de una monocapa (isoterma de Langmuir), pero a menudo se crea también una atracción entre las moléculas ya adsorbidas y las que han quedado en disolución, es la razón principal de la no simetría de los picos de elución.

La sílice, por lo normal, se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que no puede utilizarse por encima de ese pH. Para analizar por cromatografía compuestos

básicos se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno. La fase estacionaria está unida covalentemente al polímero [8].

La polaridad de la fase estacionaria puede distinguir dos situaciones:

#### Fase normal

- Fase estacionaria polar, en la estructura del siloxano puede tener grupos ciano ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ), amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ), dimetilamino [ $-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ], entre otros.
- Fase móvil no polar, como etiléter, cloroformo o n-hexano.

#### Fase inversa o hidrófoba

- Fase estacionaria es no polar, frecuentemente hidrocarburos n-octilo ( $\text{C}_8$ ) o n-octadecilo ( $\text{C}_{18}$ ) entre otras fases enlazadas.
- Fase móvil polar, como disoluciones acuosas, metanol o acetonitrilo.

Al modificar la polaridad de la fase móvil se actúa directamente sobre el coeficiente de distribución  $K$  ( $C_S/C_M$ ), es decir, sobre el factor de retención  $k$  de los compuestos.

La cromatografía en fase normal se utiliza extensamente para el análisis de sustancias, tales como vitaminas, pigmentos, aceites esenciales, aditivos no polares en distintos productos comerciales; mientras que la cromatografía de fase inversa y particularmente de fase enlazada es más utilizada para el análisis de vitaminas,  $\beta$ -bloqueante, alcaloides, esteroides, tetraciclinas, prostaglandinas, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como pesticidas y herbicidas [9].

#### 4.2.5.6. Fases móviles.

La selección de la fase móvil debe estar basada en diferentes criterios:

- Inerte y de alta pureza: la fase móvil no debe reaccionar con ningún componente de la muestra.
- Viscosidad, una baja viscosidad del solvente produce una menor caída de presión que un disolvente con alta viscosidad para una velocidad de flujo específico.
- Punto de ebullición, se requiere un bajo punto de ebullición, por el contrario solventes con alta presión de vapor producen burbujas de vapor en el detector si opera con temperatura.
- Baja inflamabilidad y toxicidad.

- No corrosivo.
- No detectable por UV o índice refractivo, según sea el caso del detector a utilizar.

Las características de mayor trascendencia cromatográfica son la fuerza eluyente y la selectividad. Para disolventes no electrolíticos la fuerza del disolvente es sinónimo de polaridad para la cromatografía en fase normal, mientras que si se habla de cromatografía de fase inversa la relación es invertida. La selectividad se refiere a la capacidad de una fase móvil para provocar una diferenciación en el comportamiento de varios solutos en el sistema cromatográfico [22].

Una serie eluotrópica es un listado de disolventes ordenados según su capacidad relativa para desplazar solutos de un adsorbente dado. Una forma de cuantificar la fuerza de los disolventes es utilizar el parámetro denominado fuerza eluyente,  $\epsilon^\circ$ , que se define como la energía de adsorción del disolvente por unidad de área.

***Fuerza de los disolventes utilizados como fases móviles:***



Sin embargo, con frecuencia, un disolvente solo no resulta adecuado para una determinada separación, recurriéndose en éstos casos a mezclas binarias o ternarias, con el objetivo de encontrar la más adecuada en cuanto a su fuerza eluyente.

Hay cuatro tipos de interacciones entre las moléculas de disolvente y de soluto:

- Iónico cuando el soluto y el disolvente tienen ambos momentos dipolares.
- De dispersión debida a la atracción entre sí de las moléculas vecinas.

- Dieléctricas que favorecen la disolución de los solutos iónicos en los disolventes polares.
- Por puentes de hidrógeno.

#### 4.2.5.7. Detectores.

Un detector ideal en CLAR deberá reunir las siguientes características:

- Sensibilidad elevada, y tener poco ruido de fondo
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Amplio margen de respuesta lineal.
- Pequeño tiempo de respuesta.
- Insensible a los cambios de presión y temperatura.
- Respuesta independiente de la composición de la fase móvil
- No destructivo.

En CLAR se utilizan distintos tipos de detección que pueden clasificarse de la siguiente forma:



Los detectores basados en una propiedad del soluto responden a una propiedad físico-química del soluto, y que generalmente no la presenta la fase móvil. Estos detectores suelen ser bastante selectivos y muy sensibles. Por su parte, los detectores basados en una propiedad de la disolución comparan el cambio global de alguna propiedad física de la fase móvil con y sin soluto eluido. Estos detectores suelen ser poco sensibles [9].

- Detectores de absorbancia UV.

La fase móvil pasa a través de una celda, donde se encuentra el haz de radiación de un espectrofotómetro UV / visible lo cual genera una señal que es proporcional a la

concentración del soluto. Sólo compuestos de absorción de UV, tales como alquenos, compuestos aromáticos y compuestos que tienen enlaces múltiples entre C y O, N o S se detectan. Los componentes de la fase móvil deben ser seleccionados cuidadosamente de modo que absorban poca o ninguna radiación [14].

La absorción de la radiación como una función de la concentración,  $c$ , es descrita por la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon lc$$

Donde:

$A$  = absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente de absorción molar

$l$  = Longitud de la celda.

Existen tres tipos de detectores de absorbancia disponibles:

-Longitud de onda fijo; utiliza una lámpara de mercurio con longitudes de onda para seleccionar de 254, 280, 313, 334 y 365 nm. Es el más sensitivo de los tres y menos caro pero es inflexible para la selección de longitud de onda.

-Longitud de onda variable; utiliza una lámpara de deuterio y un policromador que permite realizar un barrido de longitudes de onda, cuando los picos están suficientemente separados se puede elegir una longitud de onda para cada pico.

-Montaje de fotodiodos; en estos dispositivos se hace pasar a través de la muestra toda la radiación procedente de la fuente (lámpara de deuterio), la radiación emergente de la celda de flujo se dispersa por una red de difracción halográfica en radiaciones monocromáticas que se focalizan simultáneamente sobre un conjunto de fotodiodos constituido por varios centenares de elementos fotosensibles, que generan una señal eléctrica que se procesa para proporcionar datos de absorbancia.

- Detectores de fluorescencia.

Ciertos compuestos químicos pueden absorber radiación electromagnética de una determinada longitud de onda y emitir radiación fluorescente a longitud de onda más larga, son compuestos típicamente fluorescentes aquellos sistemas cíclicos con un alto grado de conjugación. Tal es el caso de hidrocarburos aromáticos polinucleares, quinoleínas, esteroides y alcaloides [9].

Para aumentar la utilidad de este tipo de detectores, se puede enlazar covalentemente al analito grupos fluorescentes, este proceso de *derivatización* se puede llevar a cabo en la muestra antes de hacer la cromatografía o añadiendo los reactivos al eluato entre la columna y el detector (derivatización postcolumna). Su selectividad y sensibilidad son de gran ventaja en comparación que los detectores UV.

- Detectores electroquímicos.

Este tipo de detección ofrece ciertas ventajas en cuanto a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad. En este sentido cualquier especie capaz de ser oxidada o reducida sobre un electrodo es susceptible a la detección por esta vía. Así fenoles, aminas, peróxidos y mercaptanos pueden detectarse por oxidación, mientras que los hidrocarburos no saturados, cetonas, aldehídos y nitrocompuestos aromáticos pueden ponerse en manifiesto mediante procesos de reducción. Las técnicas electroquímicas más utilizadas son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría [9].

La intensidad de la corriente es proporcional a la concentración en varios órdenes de magnitud, se requieren disolventes acuosos o polares, que contengan electrolitos disueltos y deben estar rigurosamente exentos de oxígeno.

- Detectores de índice de refracción.

Un detector de índice de refracción responde a casi cualquier soluto y es el que más se aproxima al detector universal, ya que el índice de refracción (IR) de la fase móvil

deberá modificarse por la presencia de cualquier soluto que tenga un índice de refracción diferente de ella.

Aunque este tipo de detectores son muy versátiles, tienen problemas significantes ya que su sensibilidad es menor que los detectores UV, además de ser dependientes de la temperatura y variaciones de presión, además de no ser adecuados para trabajar con la modalidad de elución por gradiente, ya que el detector es afectado por variaciones en la fase móvil [19].

- Detectores de conductividad.

Este tipo de detectores es más utilizado cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos o bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de intercambio iónico. La medida de conductividad de los líquidos se lleva a cabo aplicando un potencial eléctrico entre dos electrodos, lo cual origina un movimiento de los aniones y cationes presentes en la disolución. La resistencia (o conductividad) de la disolución depende de la naturaleza y concentración de las especies iónicas presentes.

Los detectores de conductividad son simples, baratos, robustos y de prolongada duración, sin embargo su principal limitación proviene de que la elevada conductividad de los componentes de las fases móviles tienden a enmascarar la de los analitos, reduciendo la sensibilidad [9].

#### **4.2.5.8. Sistema para el tratamiento de datos y registrador**

El procesamiento de datos en cromatografía incluye tres objetivos:

- ✓ Colectar y procesar la señal proveniente del detector de modo de producir un cromatograma y la información correspondiente como área de los picos, tiempos de retención y ancho de picos.
- ✓ Colectar y analizar los datos para obtener información cualitativa y cuantitativa así como generar los reportes correspondientes.
- ✓ Optimizar los parámetros cromatográficos.

## 4.3 MOXIFLOXACINA

### 4.3.1. Propiedades físicas y químicas

Fórmula molecular  $C_{21}H_{24}FN_3O_4 \cdot HCl$

Peso molecular: 437.90

Solubilidad: soluble en agua, etanol, acetona.

Intervalo de fusión: 238-242 °C

pKa: 6.4 y 10.6

Log P: 2.8

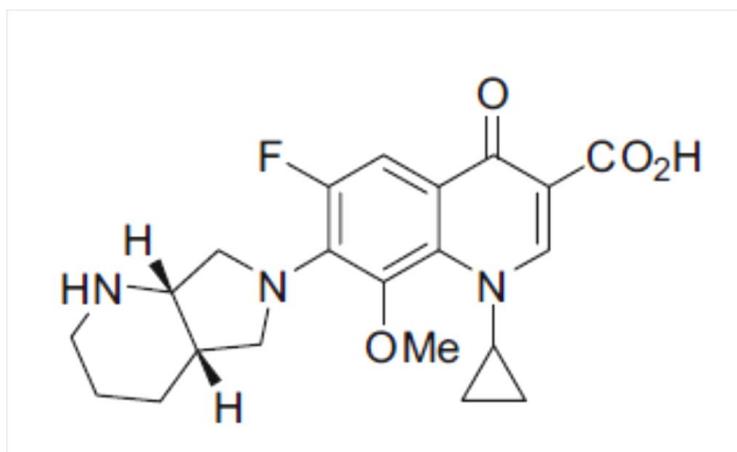


Fig. 3. Molécula de moxifloxacina

Moxifloxacin es una quinolona; que químicamente son estructuras bicíclicas heteroaromáticas, constituidas por un núcleo de piridona-β-ácido carboxílico y un anillo aromático.

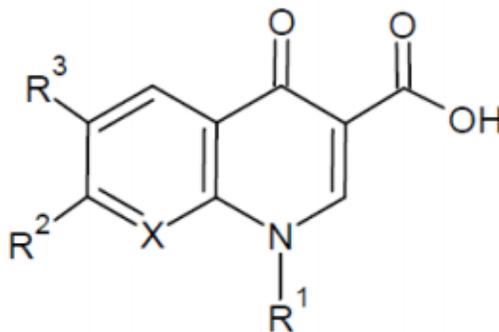
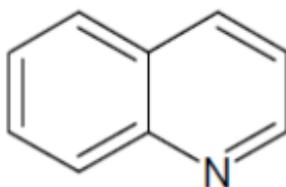


Fig. 4. Estructura general de las quinolonas: X= C o N; R<sup>1</sup>=ciclopropil, etil, fluoroetil, metilamino, fluorofenilo, anillo tiazínico u oxacínico; R<sup>2</sup>= piperacino-4-ilo, 3-metilpiperacino-1-ilo y R<sup>3</sup>= flúor.

La denominación de este grupo como quinolona se debe al hecho de que la mayor parte de los nuevos antimicrobianos del grupo eran derivados de la quinolina sustituida (4-quinolona).



*Fig. 5. 4-Quinolona*

La relación entre la estructura química y la actividad biológica de las quinolonas dio lugar a la síntesis de compuestos con distintos radicales en la estructura básica con objeto de mejorar su actividad. Uno de los criterios más ampliamente aceptados hoy en día es el de clasificar a las quinolonas en generaciones, dependiendo del momento de su síntesis y de los radicales utilizados [11].

- Primera generación: son las moléculas más antiguas y con núcleos químicos básicos; entre ellas se encuentran el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacino, ácido pipemídico y flumequina.
- Segunda generación: se caracterizan por la presencia constante de flúor en la posición 6 y de piperazina o metil piperazina en la posición 7; se incluyen ciprofloxacino, norfloxacino, enoxacino, lomefloxacino, entre otros.
- Tercera generación: comprende compuestos caracterizados por la presencia de grupos cíclicos aminados en la posición 7, son bi o trifluorados, entre ellos se encuentra levofloxacino, tosufloxacino, gatifloxacino y grepafloxacino. En ellos se mejoró la biodisponibilidad oral, vida media y acción contra bacterias Gram-positivas.
- Cuarta generación: muestran mayor actividad frente a organismos Gram-positivos y buena actividad frente a los anaerobios. Entre ellos están trovafloxacino, clinafloxacino, gemifloxacino y moxifloxacino.

### 4.3.2. Síntesis

El clorhidrato de moxifloxacinina o por su nombre químico ácido (4 aS-cis)-1-Ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-8-metoxi-7-(octahidro-6-pirrolol [3,4-b]piridina-6-yl)-oxo-3-carboleincarboxílico monoclóridato, es un antibiótico sintético derivado de las fluoroquinolonas. Es sintetizado por varios procedimientos los cuales comúnmente recurren a dos fases: (a) síntesis del núcleo de quinolona y (b) introducción de varios sustituyentes [5].

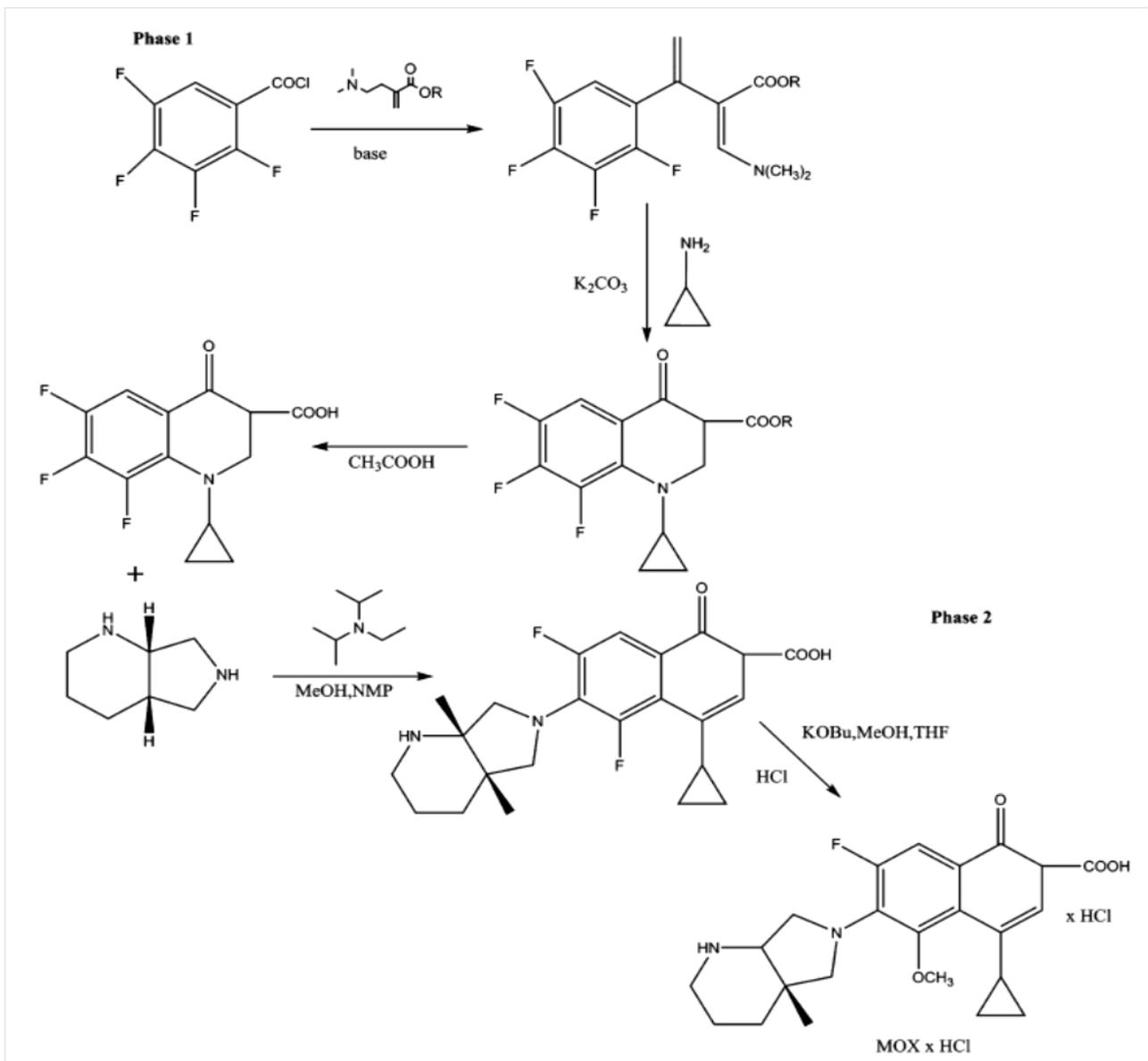


Fig. 6. Ruta de síntesis de moxifloxacina HCl. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50 (2009).

Durante la síntesis es común que también se obtengan ciertas impurezas o compuestos relacionados. Una degradación suele darse durante el proceso de formulación por lo que los medicamentos se someten a pruebas de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento acelerado y largo plazo.

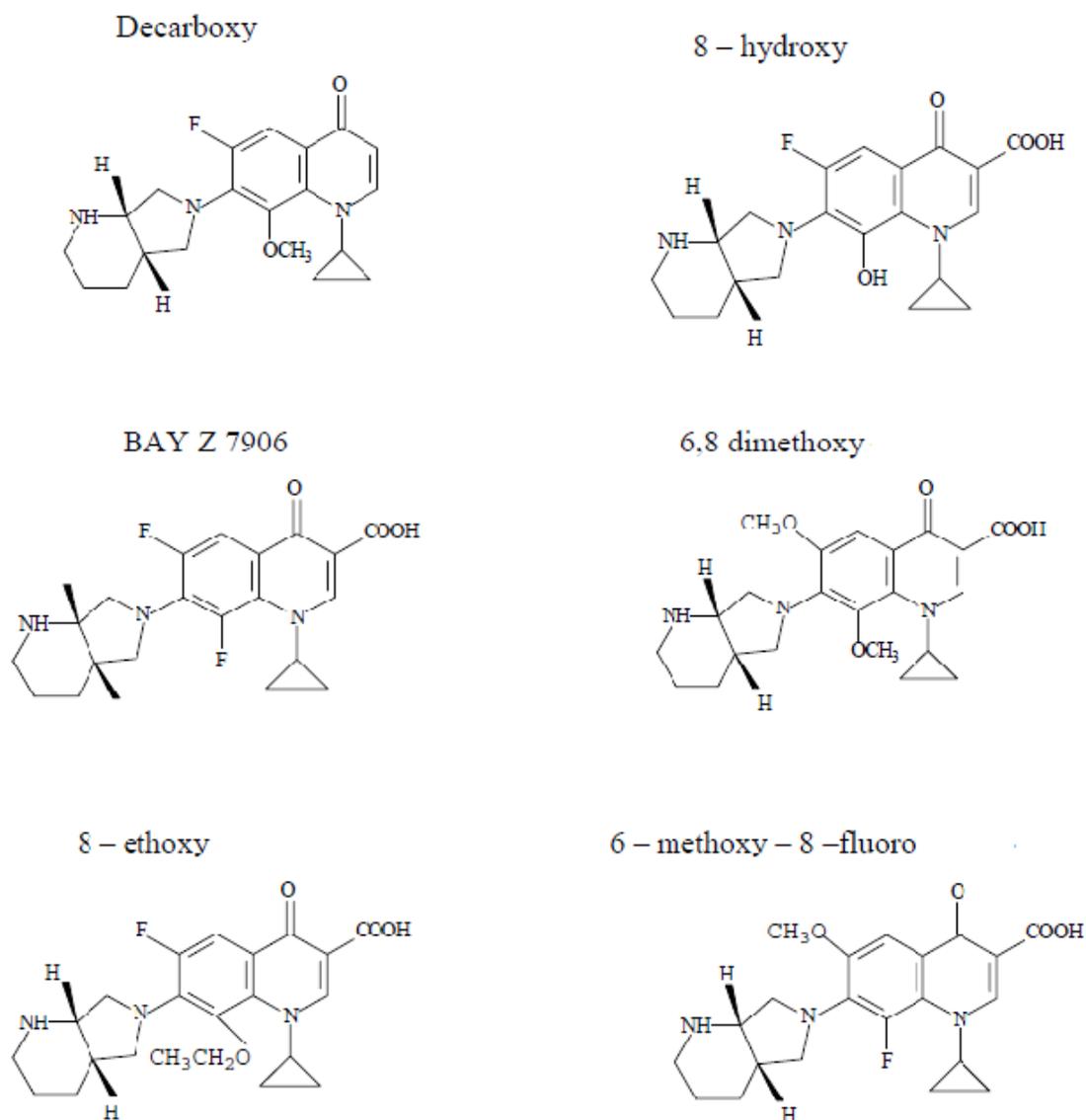


Fig. 7. Sustancias relacionadas o impurezas de moxifloxacina, en base libre.

### **4.3.3. Propiedades biológicas**

Las fluoroquinolonas son agentes bactericidas utilizados frecuentemente en oftalmología extremadamente efectivos, con amplio espectro y con especial actividad sobre los patógenos Gram negativos. Estas bloquean la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano por inhibición de las topoisomerasas II (ADN girasa) y IV [23]. Las topoisomerasas son las enzimas encargadas del superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, así como del corte, unión y separación de las hebras de ADN, necesarias para los procesos de síntesis de ADN y de partición del cromosoma a las células hijas cuando la bacteria se divide [2].

En general, las fluoroquinolonas se consideran muy buenas opciones para el tratamiento y prevención de diferentes infecciones oculares y ello explica su creciente uso en oftalmología [23]. Éste tipo de antibióticos son utilizados por una gran variedad de personas desde neonatos y pacientes geriátricos, por lo cual deben ser confortables e inocuos al ojo [18].

### **4.3.4. Uso en soluciones oftálmicas.**

Las formulaciones antibióticas de quinolonas precedentes son generalmente eficaces en el tratamiento de infecciones oftálmicas y tienen diferentes ventajas sobre previas formulaciones antibióticas oftálmicas, en especial aquellas que tienen espectros de actividad antimicrobiana relativamente limitados, como: neomicina, polimixina B, gentamicina y tobramicina, las cuales son útiles principalmente contra patógenos Gram negativos, y bacitracina, gramicidina y eritromicina, las cuales son activas principalmente contra patógenos Gram positivos.

El uso de éste antibiótico es profiláctico después de cirugía u otros traumatismos a los tejidos oftálmicos, pudiéndose también administrar a los tejidos afectados durante procedimientos quirúrgicos oftálmicos, para prevenir o aliviar las infecciones post-quirúrgicas.

Entre los ejemplos de estados oftálmicos que se pueden tratar con las formulaciones con moxifloxacin incluyen: conjuntivitis, queratitis, blefaritis, dacriocistitis, orzuelos y úlceras corneales (Ver anexo 4).

Las soluciones oftálmicas deben ser estériles y cumplir con ciertas propiedades físicas (por ejemplo, osmolaridad y pH) especialmente convenientes para su aplicación a tejidos oftálmicos.

La actividad antimicrobiana de los antibióticos se expresa generalmente como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno específico. Esta concentración se denomina también “concentración inhibitoria mínima” o “MIC” (por sus siglas en inglés). El término “MIC90” se refiere a la mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento del noventa por ciento (90%) de los tipos o variedades de una especie. La concentración de un antibiótico necesaria para eliminar completamente una bacteria específica se denomina “concentración bactericida mínima” o “MBC” (por sus siglas en inglés). En la tabla siguiente se proporcionan los datos de la concentración inhibitoria mínima de moxifloxacin para algunas bacterias asociadas comúnmente con infecciones oftálmicas:

Microorganismo	MIC90 (µg/mL)
<i>S. aureus</i> / sensible a la meticilina	0,13
<i>S. aureus</i> / resistente a la meticilina	4,0
<i>S. aureus</i> / resistente a la quinolona	4,0
<i>S. epidermidis</i> / sensible a la meticilina	0,25
<i>S. epidermidis</i> / resistente a la meticilina	4,0
<i>S. pneumoniae</i> / sensible a la penicilina	0,25
<i>S. pneumoniae</i> / resistente a la penicilina	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	8,0
<i>H. influenzae</i> / β-lactamasa positivo	0,06
<i>H. influenzae</i> / β-lactamasa negativo	0,06

La concentración de antibiótico apropiada para las formulaciones oftálmicas será, generalmente, una cantidad del antibiótico suficiente para proporcionar una concentración en el humor acuoso y en el fluido lacrimal del ojo igual o mayor que el nivel MIC90 para el antibiótico, respecto de los organismos Gram-negativos y Gram-positivos asociados comúnmente con las infecciones oftálmicas. Tales cantidades son denominadas “cantidades antimicrobianas eficaces”.

Las composiciones tendrán generalmente un pH en el intervalo de 4,5 a 8,0. Se pueden formular también las soluciones oftálmicas de modo que tengan valores osmóticos compatibles con el humor acuoso del ojo y los tejidos oftálmicos. Tales valores osmóticos variarán generalmente en el intervalo de 200 a 400 miliosmoles por kilogramo de agua (mOsm/kg), pero preferentemente serán aproximadamente 300 mOsm/kg [1].

El uso de antibióticos de quinolona para tratar infecciones representa actualmente lo último en el campo de las formulaciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento oftálmicos. La comercialización de las soluciones requiere de registros sanitarios y de varios requerimientos en su fabricación para poder asegurar su calidad. Algunas de las soluciones oftálmicas comerciales que contienen moxifloxacin al 0.5 %:

<b><i>Producto</i></b>	<b><i>Fabricante</i></b>
Vigadexa®	Alcon
Vigamox®	Alcon
Quimox®	Ophtha
Oftamox®	MK

## Capítulo II. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN.

### 1. EQUIPOS Y REACTIVOS.

Tabla de reactivos

Reactivo	Grado	Precaución
Moxifloxacina HCl	Estándar de referencia	Evitar contacto con la piel y ojos.
Moxifloxacina HCl	Materia prima	Evitar contacto con la piel y ojos.
Bay-Z	Estándar de referencia. Pureza 96.2 %	Evitar contacto con la piel y ojos.
Metanol	HPLC	Tóxico, absorbido a través de la piel.
Fosfato de potasio monobásico	Reactivo analítico	Irritante moderado de ojos, piel y nariz al contacto.
Tetrabutilamonio hidrógeno sulfato	Reactivo analítico	Es un irritante severo de ojos, piel y sistema respiratorio; no inhalar usar con adecuada ventilación.
Acido fosfórico	Reactivo analítico	Es un irritante severo de ojos y piel, no debe de ser inhalado.
Ácido clorhídrico	Reactivo analítico	Sus vapores son irritantes a los ojos y membranas mucosas.
Hidróxido de sodio al 50 %	Reactivo analítico	Es irritante y corrosivo de los tejidos, por contacto o inhalación.
Peróxido de hidrógeno al 30 %	Reactivo analítico	Altamente corrosivo y oxidante por lo que irrita mucosas.
Agua	Purificada	Ninguna

#### Equipos e Instrumentos (Marca y Modelo)

- Balanza analítica Mettler Toledo XS205DU.
- Estufa Lindenberg blue V0914A.
- HPLC equipado con un detector UV a 295 nm Waters.

Este método analítico utiliza una columna Metachem Fenil Inertsil, 5 µm, 4.0 x 250 mm o equivalente, a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, con detección a 295 nm, volumen de inyección de 25 µL.

NOTA<sub>1</sub>: Todos los equipos utilizados se encuentran calibrados en el momento de la realización de las pruebas.

NOTA<sub>2</sub>: El peso de clorhidrato de moxifloxacina x 0.9167= peso de moxifloxacina base libre.

Peso molecular de moxifloxacina HCl=437.90 g/mol

Peso molecular de moxifloxacina base libre= 401.44 g/mol

$$\text{Peso moxifloxacina HCL} \times \frac{\text{PM moxifloxacina base libre}}{\text{PM moxifloxacina HCl}} = \text{Peso moxifloxacina base libre}$$

$$\text{Peso moxifloxacina HCL} \times \frac{401.44 \text{ g/mol}}{437.90 \text{ g/mol}} = \text{Peso moxifloxacina base libre}$$

$$\text{Peso moxifloxacina HCL} \times 0.9167 = \text{Peso moxifloxacina base libre}$$

NOTA<sub>3</sub>: Las soluciones de moxifloxacina y Bay Z 7906 muestran fotosensibilidad, proteger las soluciones estándar y muestras de la luz.

## 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

### *SOLUCIÓN BUFFER PARA FASE MÓVIL*

Disolver 0.5 g de tetrabutilamonio hidrógeno sulfato, 1.0 g de fosfato de potasio monobásico y 2 mL de ácido fosfórico al 85% en un volumen final de 1 L de agua purificada (pH ~ 2.0) Pasar a través de un filtro de 0.45 µm antes de usar.

### *PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL, SOLUCIÓN BUFFER: METANOL (72:28 v/v)*

Mezclar 720 mL de solución buffer con 280 mL de metanol, pasar a través de un filtro de 0.45 µm antes de usar.

### *PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE REFERENCIA STOCK (5 mg/mL moxifloxacina base libre) Solución A.*

Pesar 57 mg de clorhidrato de moxifloxacina estándar secundario en un matraz volumétrico de 10 mL diluir y llevar a volumen con agua purificada. Ésta concentración se utilizará para el estudio de degradaciones y para solución de trabajo de moxifloxacina Preparar 20 mL de ésta solución.

*PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE REFERENCIA (0.5 mg/mL moxifloxacina base libre) Solución B.*

De la solución stock de 5 mg/mL de clorhidrato de moxifloxacina tomar una alícuota de 10 mL en un matraz volumétrico de 100 mL diluir y llevar a volumen con agua purificada. Ésta solución se utilizará en la determinación del parámetro de linealidad.

*PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE TRABAJO DE MOXIFLOXACINA (0.1 mg/mL) Solución C.*

Tomar una alícuota de 1.0 mL de la solución de 5 mg/mL (Solución A) del estándar de moxifloxacina en un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con solución buffer.

*PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE BAJA CONCENTRACIÓN DE MOXIFLOXACINA (0.002 mg/mL) Solución D.*

Estándar para análisis de impurezas. Tomar una alícuota de 1.0 mL de la solución estándar de trabajo de moxifloxacina (solución C) en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con solución buffer y mezclar bien.

*PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE SENSITIVIDAD DE MOXIFLOXACINA (0.05 µg/mL) Solución E.*

Tomar una alícuota de 2.5 mL de solución de concentración de 0.002 mg/mL (solución D) en un matraz volumétrico de 100 mL llevar a volumen con solución buffer y mezclar bien. Se puede almacenar a 4°C en un frasco ámbar por 6 meses.

*PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA PRUEBA DE RESOLUCIÓN Solución F.*

Preparar solución stock de Bay Z 7906. Pesar con exactitud aproximadamente 12.5 mg de Bay Z estándar de referencia analítico en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con solución buffer y mezclar bien (concentración 0.25 mg/mL). Ésta solución también se utilizará en las pruebas de límites. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL en un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con solución buffer. Tomar una alícuota de 2.0 mL de la solución estándar stock de moxifloxacina (5 mg/mL) y 4.0 mL de solución de Bay Z de 0.025 mg/mL en un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al volumen con solución buffer y mezclar bien.

### ***PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.***

Pesar exactamente 57 mg de clorhidrato de moxifloxacin en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con agua purificada. Tomar una alícuota de 1.0 mL de ésta solución en un matraz volumétrico de 50 mL llevar a volumen con solución buffer. Concentración aproximada de 0.1 mg/mL de moxifloxacin base libre.

### **3. CONDICIONES DE OPERACIÓN**

Velocidad de flujo: 0.9 mL/min.

Detector: UV absorbancia a 295 nm

Volumen de inyección: 25 µL

Temperatura: 45 °C

Modo de corrida y tiempo: isocrático por 25 minutos

### **4. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS DEL SISTEMA**

Platos teóricos por columna	> 4000
Resolución entre moxifloxacin y Bay Z	> 1.5
Factor de coelución	< 2.0
DER	< 2.0%
Sensibilidad (moxifloxacin 0.05 µg/mL)	> 10

### **5. DESARROLLO DE EXPERIMENTOS**

Se planeó y siguió el Protocolo específico de validación para cuantificación de moxifloxacin a la concentración de 0.1 mg/mL, considerando los parámetros establecidos en la Guía del Colegio de QFB's, el cual se resume en la siguiente tabla.

## RESUMEN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Determinación de la lectura de 6 estándares de moxifloxacina a la concentración nominal (Sistema).	<b>CV o DER <math>\leq</math> al 1.5% (Sistema)</b>
PRECISIÓN DEL MÉTODO  (EXACTITUD Y REPETIBILIDAD)	Determinación de 6 réplicas de moxifloxacina, materia prima del mismo lote utilizando el método analítico, por pesadas independientes	<b>CV o DER <math>\leq</math> 2.0% (Método)</b> <b>IC(<math>\mu</math>) debe incluir al 100%</b> <b>Recobro 100% <math>\pm</math> 2% (Método) o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%</b>
PRECISIÓN DEL MÉTODO  (PRECISIÓN INTERMEDIA)	Realizar 3 determinaciones por 2 diferentes analistas de materia prima a la concentración de trabajo (0.1 mg/mL) en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo	<b>CV <math>\leq</math> 2%</b> <b>Calcularse la variabilidad usando la tabla de Anova o Anadeva.</b>
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Preparar una curva estándar de 5 puntos mínimo 2 puntos arriba del 100%, 2 puntos abajo del 100% y el 100%. Inyectar por triplicado.	<b><math>r \geq 0.9925</math> ó <math>r^2 \geq 0.985</math></b> <b>IC (<math>\beta_1</math>) no debe incluir el cero.</b> <b>IC (<math>\beta_0</math>) debe incluir al cero</b> <b>% Error de intercepto en Y en el punto medio <math>\leq</math> 5% para valoración</b> <b>Y <math>\leq</math> 10% para impurezas.</b> <b>CV <math>\leq</math> 2% relación resp/conc. (sistema tolerante y preciso)</b> Si el intervalo de confianza de la ordenada al origen o intercepto en Y no contiene al cero, calcular el % error en los límites superior e inferior

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
<b>LINEALIDAD DEL MÉTODO</b>	<p>Determinar la linealidad a partir de muestras de moxifloxacina, materia prima a tres diferentes niveles en un intervalo del 80 a 120%</p>	<p><math>r^2 \geq 0.985</math></p> <p><b>IC(<math>\beta_1</math>) no debe incluir el uno.</b></p> <p><b>IC(<math>\beta_0</math>) debe incluir al cero.</b></p> <p><b>CV <math>\leq 2</math> % relación mg recuperados entre mg adicionados</b></p> <p><b>Porcentaje de recobro del 98-102</b></p> <p><b>IC (<math>\mu</math>) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del intervalo de 98-101%</b></p>
<b>ESPECIFICIDAD</b>	<p>Analizar la interferencia de los productos de degradación e impurezas del principio activo sometido a 4 diferentes vías de degradación por triplicados en cada condición.</p>	<p><b>No debe interferir ningún pico en el tiempo de retención del principio activo.</b></p>
<b>PRUEBAS LÍMITE (LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN)</b>	<p>Preparar 5 concentraciones a partir del estándar de referencia de la impureza conocida (Bay Z) a niveles de concentración de principio activo (menores o que incluya la especificación de la impureza). Preparar por triplicado cada nivel.</p> <p>Preparar 5 concentraciones a partir del estándar de clorhidrato de moxifloxacina a concentraciones que incluyan la especificación de impurezas.</p> <p>Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.</p>	<p><math>r^2 \geq 0.98</math></p> <p><b>IC (<math>\beta_1</math>), no debe incluir el cero</b></p>

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
<b>PRUEBAS LÍMITE</b>  <b>(LÍMITE DE DETECCIÓN)</b>	<p>Preparar 5 concentraciones a partir del estándar de referencia de la impureza (Bay Z) a niveles de concentración de principio activo (menores o que incluya la especificación de la impureza). Preparar por triplicado cada nivel.</p> <p>Preparar 5 concentraciones a partir de estándar de clorhidrato de moxifloxacina a concentraciones que incluyan la especificación de impurezas</p> <p>Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.</p>	<p><math>r^2 \geq 0.98</math></p> <p><b>IC (<math>\beta_1</math>), no debe incluir el cero</b></p> <p><b>LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.</b></p>
<b>TOLERANCIA</b>	<p>Una misma muestra de materia prima analizada por triplicado bajo 2 condiciones de uso diferente (equipo y columna) comparadas contra condiciones base.</p>	<p><b>CV <math>\leq</math> 2%</b></p>
<b>ROBUSTEZ</b>	<p>Análisis de la misma muestra por triplicado bajo condiciones de corrida diferentes (% fase, flujo, temperatura, velocidad de flujo y vol. inyección)</p>	<p><b><math> di  \leq 2\%</math>.</b></p> <p><b>Calcular los parámetros de adecuabilidad del sistema</b></p>
<b>ESTABILIDAD DE LA MUESTRA</b>	<p>Análisis de triplicados de una muestra representativa mantenida en diferentes condiciones y analizadas en diferentes tiempos pre-establecidos, contra estándar recientemente preparado.</p>	<p><b>La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2%.</b></p>

Este método es indicativo de estabilidad. Constituye también una identificación positiva para clorhidrato de moxifloxacina si el tiempo de retención del producto se compara con aquellos del estándar dentro de la reproducibilidad del sistema.

## **DESARROLLO DE PRUEBAS**

### **1. PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

#### **1.1 PRECISION DEL SISTEMA Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.**

##### **PROCEDIMIENTO.**

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración nominal de trabajo del estándar 0.1 mg/mL (100% del analito en estudio) preparadas por pesadas o diluciones independientes utilizando estándar secundario de clorhidrato de moxifloxacina.

Partir de una solución stock de 0.5 mg/mL de clorhidrato de moxifloxacina (solución B)

De la solución B transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL. Llevar al aforo con solución buffer. Se tiene una concentración final aproximada de 0.1 mg/mL (100 µg/mL).

##### **REPORTE DE DATOS.**

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Media de los datos.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (DER).
- Adecuabilidad del sistema.

## **2. PRECISIÓN DEL MÉTODO**

### **2.1 REPETIBILIDAD**

#### **PROCEDIMIENTO.**

Un analista debe preparar un sextuplicado de soluciones a la concentración nominal de trabajo de 0.1 mg/mL (100% del analito en estudio) preparadas por pesadas o por diluciones independientes utilizando materia prima de clorhidrato de moxifloxacina.

Analizar como lo indica el método analítico de acuerdo a la preparación de la muestra.

#### **REPORTE DE DATOS.**

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- % Recobro
- Media de los recobros de cada análisis.
- Desviación estándar de cada análisis.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (DER).
- Adecuabilidad del sistema.

### **2.2. PRECISIÓN INTERMEDIA**

#### **PROCEDIMIENTO**

Determinar el porcentaje de clorhidrato de moxifloxacina, materia prima por triplicado, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo, realizando tres pesadas independientes por analista.

Analizar como lo indica el método analítico de acuerdo a la preparación de la muestra.

#### **REPORTE DE DATOS.**

- Calcular la media, la desviación estándar y el CV de cada grupo de datos y total.
- Tabla de Anadeva (análisis de varianza analista / día).

### 3. LINEALIDAD

#### 3.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA (CURVA ESTÁNDAR)

##### PROCEDIMIENTO.

Preparar la curva de 5 puntos de estándares, por triplicado.

La curva estará construida a partir de la concentración de trabajo del estándar 0.1 mg/mL (100%), las concentraciones serán las siguientes: 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 y 0.14 mg/mL aproximadamente. Preparar las soluciones a partir de una solución stock de 0.5 mg/mL de moxifloxacina (solución B).

TABLA NO. I CURVA PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Conc. de la curva %	Alícuota de la solución en mL de la Conc. 0.5mg/mL	Volumen final en mL aforo con solución buffer	Conc. Teórica final mg/mL
60	3.0	25.0	0.06
80	4.0	25.0	0.08
100	5.0	25.0	0.10
120	6.0	25.0	0.12
140	7.0	25.0	0.14

Analizar usando un sistema cromatográfico de tal forma que se determine el rango lineal de la respuesta como función de la concentración.

##### REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente ( $b_1$ )
- Intercepto en Y u ordenada al origen ( $b_0$ ).
- Relación respuesta vs concentración para cada punto.
- CV de la relación resp/conc.

- Intervalo de confianza para la pendiente IC ( $\beta_1$ ).
- Coeficiente de determinación “ $r^2$ ” y Coeficiente de correlación “ $r$ ”.

### 3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

#### PROCEDIMIENTO.

Esta prueba se realizará construyendo una curva de materia prima de clorhidrato de moxifloxacina, realizando pesadas independientes y diluciones indicadas en la Tabla II, que corresponden a 3 niveles de concentración (80%, 100% y 120% correspondientes a 0.08, 0.10 y 0.12 mg/mL), analizar por triplicado cada punto de la curva contra estándar de concentración conocida.

TABLA NO. II CURVA PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Conc. de la curva %	Peso de moxifloxacina HCl, materia prima en mg y aforados a 10 mL	Alícuota en mL de la solución obtenida	Volumen final aforo con solución buffer en mL	Conc. Teórica final mg/mL
80	45.6	1.0	50.0	0.08
100	57.0	1.0	50.0	0.10
120	66.5	1.0	50.0	0.12

### 4. ESPECIFICIDAD

#### PROCEDIMIENTO.

##### **4.1 Interferencia de blanco.**

Analizar por triplicado las siguientes soluciones: buffer y estándar sin degradar.

##### **4.2 Interferencia de productos de degradación.**

A partir de una solución de 5 mg/mL de clorhidrato de moxifloxacina (57 mg de clorhidrato de moxifloxacina en 10 mL de agua purificada, solución A), transferir 2.0

mL en un matraz volumétrico de 25 mL, preparar 4 matraces y proporcionar el tratamiento señalado en la Tabla III. Por triplicado

TABLA NO. III CURVA TRATAMIENTO PARA ESTUDIO DE DEGRADACIÓN

Vía de Degradación	Alícuota en mL de moxifloxacina (5 mg/mL))	Condición de Análisis	Vol. adicionado de reactivo	Vol. adicionado de reactivo para detener reacción
Calor	2.0	4 h/80°C	NA	NA
Básica (NaOH)	2.0	4 h/80°C	100 µL de NaOH 50 %	100 µL de HCl 50%
Ácida (HCl)	2.0	4 h/80°C	100 µL de HCl concentrado	100 µL de NaOH al 50 %
Peróxido de hidrógeno	2.0	2 h/80°C	100 µL de Peróxido de hidrógeno 30%	NA

Después de mantener en las condiciones señaladas, la solución ácida y básica deben ser neutralizadas y llevar al aforo con solución buffer y analizar por CLAR.

Analizar en el sistema cromatográfico, muestras de los estándares de Bay Z y clorhidrato de moxifloxacina sin degradar, y de la combinación de ambos reactivo e impureza, se puede utilizar la solución de resolución (solución F). Con el fin de observar en los cromatogramas los posibles picos de degradación del principio activo.

#### REPORTE DE DATOS.

Anexar cromatogramas de cada muestra analizada de acuerdo al método

## 5. PRUEBAS LÍMITE.

### 5.1 LIMITE DE DETECCIÓN

#### PROCEDIMIENTO

##### 5.1.1 De acuerdo a impurezas conocidas

Preparar Solución Stock de Bay Z:

Pesar con exactitud aproximadamente 12.5 mg de Bay Z estándar de referencia analítico en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con solución buffer y mezclar. Concentración 0.25 mg/mL.

De la solución anterior (0.25mg/mL) tomar una alícuota de 2 mL en un matraz volumétrico de 500 mL, llevar a volumen con solución buffer. La concentración obtenida es de 0.001 mg/mL

Preparar 5 concentraciones a partir del estándar de referencia de la impureza (Bay Z de 0.001 mg/mL) de acuerdo a la Tabla IV, donde se tienen niveles de concentración de principio activo (menores o que incluya la especificación del contenido, en éste caso la especificación para materia prima es de 0.1%), ya sea por dilución o por pesada independiente. Preparar por triplicado cada nivel.

TABLA NO. IV CURVA PARA LIMITE DE DETECCIÓN PARA BAY Z

Conc. de la curva %	Alícuota en mL de solución Bay-z Conc. 0.001mg/mL	Volumen final en mL aforo con solución buffer	Conc. Teórica final mg/mL
0.20	5.0	25.0	0.00020
0.16	4.0	25.0	0.00016
0.10	2.5	25.0	0.00010
0.08	2.0	25.0	0.00008
0.040	2.0	50.0	0.00004

Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.

### 5.1.2 De acuerdo a impurezas desconocidas

De la solución de concentración de 0.1 mg/ mL de clorhidrato de moxifloxacina (Solución C), tomar una alícuota de 2 mL en un matraz de 200 mL, llevar a volumen con solución buffer, la concentración obtenida es de 0.001 mg/mL y a partir de esta solución tomar las alícuotas indicadas en la Tabla V.

TABLA NO. V CURVA PARA LÍMITE DE DETECCIÓN PARA IMPUREZAS DESCONOCIDAS

Conc. de la curva %	Alícuota en mL de la solución de Moxifloxacina HCl Conc. 0.001 mg/mL	Volumen final en mL aforo con solución amortiguadora	Conc. Teórica final mg/mL
0.20	5.0	25.0	0.00020
0.16	4.0	25.0	0.00016
0.10	2.5	25.0	0.00010
0.08	2.0	25.0	0.00008
0.040	2.0	50.0	0.00004

Analizar como lo indica el método analítico.

### REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente (b1)
- Intervalo de confianza para la pendiente IC( $\beta$ 1).
- Coeficiente de determinación " $r^2$ " y coeficiente de correlación " $r$ ".
- Desviación estándar de los blancos.
- Calcular en límite de cuantificación.
- Para los blancos, calcular la desviación estándar (Sb)

## 5.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

### PROCEDIMIENTO

Preparar 5 concentraciones a partir del estándar de la impureza (Bay Z) y de clorhidrato de moxifloxacina a niveles de concentración menores o que incluya la especificación de impurezas para clorhidrato de moxifloxacina, en este caso de 0.1 %, ya sea por dilución o por pesada independiente. Seguir preparación para límite de detección. Preparar por triplicado cada nivel.

Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos (fase móvil).

Analizar como lo indica el método analítico.

### REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

Para la curva de calibración sin incluir los blancos:

- Pendiente ( $b_1$ )
- Intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$ .
- Coeficiente de determinación " $r^2$ " y Coeficiente de correlación " $r$ ".

Para los blancos:

- Desviación estándar.
- Calcular en límite de detección.

## 6. TOLERANCIA.

### PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra de la solución de trabajo de clorhidrato de moxifloxacina, materia prima por triplicado contra un estándar en 2 columnas y equipo diferentes por un analista en un mismo día, de acuerdo a la tabla VI. Analizar como lo indica el método analítico.

TABLA NO. VI. FACTORES Y CONDICIONES PARA LA PRUEBA DE TOLERANCIA

Factor	Condición 1	Condición 2
Columna	Metachem Fenil Inertsil 5 µm 250 mm x 4.0 mm	Metachem Fenil Inertsil 5 µm 250 mm x 4.6 mm
Equipo	2489	2487

### REPORTE DE DATOS.

- Media  $\bar{X}$
- Desviación estándar
- N= Número de datos totales para comparar.

### 7. ROBUSTEZ.

#### PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra de la solución de trabajo clorhidrato de moxifloxacina (0.1 mg/mL), materia prima por triplicado contra un estándar, modificando los parámetros cromatográficos del método indicados en la Tabla No. VII. Analizar como lo indica el método analítico.

TABLA NO. VII PARAMETROS A EVALUAR EN LA PRUEBA DE ROBUSTEZ

Parámetro modificado	Condición base	Condición Alternativa	
Proporción de fase móvil	72 % Solución buffer 28% Metanol	74% Solución buffer 26% Metanol	70% Solución buffer 30% Metanol
Temperatura	45 °C	40°C	50°C
Velocidad de Flujo	0.9 mL/min	0.8 mL/min	1.0 mL/min
Volumen inyección	25 µL	15 µL	35 µL

## **REPORTE DE DATOS.**

Calcular los parámetros cromatográficos de adecuabilidad del sistema para cada condición.

Reportar el contenido para las muestras de la condición normal de operación y las muestras de las condiciones alternas.

Diferencia media absoluta entre la condición normal y la condición alterada, no mayor 2.0% expresada en porcentaje.

## **8. ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA**

### **PROCEDIMIENTO**

Preparar tres muestras de clorhidrato de moxifloxacina (0.1 mg/mL), materia prima de acuerdo al método analítico, vaciar en tres viales cada una para analizar contra un estándar recientemente preparado en lapsos de tiempo inicial, 24, 48 y 72 h. a temperatura ambiente y en refrigeración en las condiciones cromatográficas normales.

NOTA: En el caso de que alguna condición no cumpliera especificaciones, se procederá a determinar el tiempo en el que la muestra sea estable.

### **REPORTE DE DATOS.**

- Media aritmética del análisis inicial
- Media aritmética de cada condición
- Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto al análisis inicial.

### Capítulo III. CÁLCULOS

**1. a.PRECISIÓN :** Sistema

Operator : D. García  
 Fecha : 04 Julio 12  
 Aparato : HPLC F157

$$\text{FR Std} = \frac{\text{Conc std}}{\text{Area std}}$$

$$\text{Conc std} = \frac{57.0 \text{ mg} \cdot 1 \text{ mL}}{10 \text{ mL} \cdot 50 \text{ mL}} \cdot 0.959 \text{ (pureza std)} \cdot 0.9167 \text{ (Factor a moxifloxacina base lib)}$$

$$\text{Conc std} = 0.1002191 \text{ mg/mL}$$

	STD	STD	STD	STD	STD	STD	
	0.1002191	0.100219144	0.100219144	0.10022	0.100219144	0.10021914	mg/mL
	19197723	19073136	19053204	1.9E+07	19211421	19095672	
MEDIA	19197723	19073136	19053204	1.9E+07	19211421	19095672	
FR	5.22E-09	5.25447E-09	5.25996E-09	5.3E-09	5.21664E-09	5.2483E-09	

MEDIA FR = 5.2433E-09  
 Desv Std S= 1.973E-11  
 %CV = 0.38 %



$$\text{sum } xx = \text{sum } x^2 - (\text{sum } x)^2 / n = 0.337474263$$

$$\text{sum } yy = \text{sum } y^2 - (\text{sum } y)^2 / n = 1.22593E+16$$

$$\text{sum } XY = \text{sum } xy - (\text{sum } x * \text{sum } y) / n = 64319522.77$$

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{\text{sum } XY}{\text{sum } xx} = \frac{64319523}{0.337474} = 190590898$$

$$\text{intercepto} = b_0 = \text{media } y - b_1(\text{media } x) = 32895.84286$$

$$S^2_{y/x} = (\text{sum } yy - b_1 \text{sum } XY) / (n-2) = 47951138986$$

$$\text{Coeficiente de correlación } r = \frac{\text{sum } XY}{\sqrt{\text{sum } xx * \text{sum } yy}} = 0.9999746$$

$$\text{Coeficiente de determinación } r^2 = 0.9999492$$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula:

$$t_{0.975,13} = 2.16$$

$$\text{intercepto} = b_0 = 32895.84286 \pm 3.18 \sqrt{(1/n + (\text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

$$b_0 = 32895.84286 \pm 146877.7738$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 190590898 \pm 3.18 \sqrt{(1 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

$$b_1 = 190590898 \pm 814203.3526$$

El intervalo de confianza de la regresion lineal

$$y = b_0 + b_1 * x_0 \pm 3.18 \sqrt{(1/n + (x_0 - \text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

1) x0 =	60	%	y = 1.14E+10	+-	48770755.3
2) x0 =	100	%	y = 1.91E+10	+-	81338828.18
3) x0 =	140	%	y = 2.67E+10	+-	113906936.1

x-eje	y-eje	y-eje - interv. conf.	y-eje + interv. conf.
50	11435486776	11386716021	1.15E+10
100	19059122696	18977783868	1.914E+10
150	26682758617	26568851681	2.6797E+10

Sesgo del error debido al intercepto diferente de cero

$$y = b_0 + b_1 * x$$

y-intercepto : <= 5% de el punto medio de respuesta

$$\text{y-intercepto} = 32895.8429$$

$$\text{punto medio} = 1.9059E+10$$

$$\% \text{ error} = 0.00017 \%$$

Sobre la curva

$$\text{Y- límite inf: } 60 \%$$

$$11435486776$$

$$\text{Y-100%: } 100 \%$$

$$19059122696$$

$$\text{Y-límite sup.: } 140 \%$$

$$26682758617$$

a) Límite inferior : 60 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{\text{Y-inferior}}{\text{Y-100\%}} \right) \times \frac{100 b_0}{60 \times b_1} = 0.39999931 \times 0.000287665 = 0.000115\% \quad 0.000115\%$$

b) Límite Superior : 140 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{\text{Y-superior}}{\text{Y-100\%}} \right) \times \frac{100 b_0}{140 \times b_1} = -0.39999931 \times 0.000123285 = -0.000049\% \quad -0.000049\%$$

Análisis de Residuales :

x-eje conc	y-eje resp	resp/conc	y sobre curva	% error de y
0	32896			
0.06	11539666	191907219	11493410	-0.400847606
0.08	15387430	191922293	15313581	-0.479931584
0.10	19168364.33	191264498	19133752.53	-0.180567311
0.12	23026391	191467003	22953923.87	-0.314713359
0.14	26546910.67	189206156	26774095.21	0.855785239

$$\text{MEDIA} = 191153434$$

$$\text{RSD resp / conc} = 0.63 \%$$

### 3. LINEALIDAD DE MÉTODO :

Operador : D. García  
 Fecha : 05 Julio 12  
 Aparato : HPLC F157

Conc St 1era dilución= (57 mg/10 mL)\*0.959  
 = 5.4663 mg/mL  
 Conc St= (57mg/10mL)\*0.959\*0.9167(1mL/50mL)  
 = 0.100219144 mg/mL  
 Conc mtra= (57 mg/10mL)\*(1mL/50mL)\*0.959\*0.9167  
 = 0.100219144 mg/mL

	Area	FR
STD1	19204272	5.22E-09
STD2	19213227	5.22E-09
STD3	19202663	5.22E-09
STD4	19253083	5.21E-09
STD5	19245049	5.21E-09
STD6	19239511	5.21E-09
	FR prom =	5.21E-09
	S =	6.01E-12
	CV =	0.12 %

Muestras por pesada independiente

Pureza st = 95.9 mg/mL  
 Teorico = 0.9590 mg / mL  
 mg /mL

Adicionados

= ((Vol. Mtra\*(Conc. mtra) + (Vol. Stock sin diluir\*(Conc. Stock sin diluir)) / 50 mL

Muestra tomada por nivel teorico:

	Vol.Stock	Aforo
80%	45.6 mg/10 mL	1 mL 50 mL
100%	57.0 mg/10 mL	1 mL 50 mL
120%	66.5 mg/10 mL	1 mL 50 mL

% Recobro =  $\frac{\text{mg recuperados}}{\text{mg adicionados}} \times 100$

mg Recuperados = Area mta X FR

mL adicionados en 50 ml	Nivel Conc	Áreas	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	%Recobro	
3	80%	15253622	0.080175315	0.07951	99.1717	99
3		15249702	0.080175315	0.07949	99.1462	99
3		15199868	0.080175315	0.07923	98.8222	99
5	100%	19222236	0.100219144	0.10020	99.9790	100
5		19226596	0.100219144	0.10022	100.0016	100
5		19228647	0.100219144	0.10023	100.0123	100
7	120%	22319452	0.116922335	0.11634	99.5042	100
7		22363845	0.116922335	0.11657	99.7021	100
7		22349828	0.116922335	0.11650	99.6396	100

MEDIA 99.6  
 S 0.42877

Parámetros de Linealidad del Método

Datos	mg Adicionados		mg Recuperados		
	x-eje	x <sup>2</sup>	y-eje	y <sup>2</sup>	Sum xy
1	0.08018	0.00643	0.07951	0.00632	0.00637
2	0.08018	0.00643	0.07949	0.00632	0.00637
3	0.08018	0.00643	0.07923	0.00628	0.00635
4	0.10022	0.01004	0.10020	0.01004	0.01004
5	0.10022	0.01004	0.10022	0.01004	0.01004
6	0.10022	0.01004	0.10023	0.01005	0.01005
7	0.11692	0.01367	0.11634	0.01354	0.01360
8	0.11692	0.01367	0.11657	0.01359	0.01363
9	0.11692	0.01367	0.11650	0.01357	0.01362
SUMA =	0.89195	0.09043	0.88830	0.08975	0.09009
MEDIA =	0.09911		$\hat{y} =$ 0.09870		

NUMERO DE DATOS (n) = 9

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

Pendiente =  $b_1 = \frac{0.81077 - 0.79232}{0.81386 - 0.79558}$

$b_1 = \frac{0.01845}{0.01828} = 1.0095306$

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

$b_0 = \frac{0.88830 - 0.90045}{9.00000}$

$b_0 = -0.00135$

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

$$r^2 = \left( \frac{0.810774559 - \frac{0.792320486}{x}}{0.0183 - 0.01864} \right)^2$$

$$r^2 = \frac{0.000340553}{0.00034068} = 0.999626928$$

- Intervalos de Confianza

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.089746 - 0.090945 - (-0.001199218)}{7.00000}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{5.94266E-08}$$

$$S_{y/x} = 0.000244$$

Pendiente ( b1)

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - (\sum x \cdot \sum x) / n}}$$

$$S_{b_1} = 0.000243776 \sqrt{\frac{1}{0.09043 - 0.08840}}$$

$$S_{b_1} = 0.000244 \sqrt{492.3452}$$

$$S_{b_1} = 0.005409$$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula:

$$t_{0.975,7} = 2.365$$

$$IC ( b_1 ) = b_1 \pm t_{0.975,7} S_{b1}$$

$$IC ( b_1 ) = 1.00953 \pm 0.012793$$

$$IC ( b_1 ) = 0.99674 \text{ a } 1.02232$$

Intercepto u ordenada al origen (  $b_0$  )

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{ \frac{1}{n} + \frac{(\text{media } x)^2}{\text{Sum } x^2 - (\text{Sum } x \cdot \text{Sum } x / n)} }$$

$$S_{b_0} = 0.000243776 \sqrt{ 0.111111 + 4.8357753 }$$

$$S_{b_0} = 0.000243776 \sqrt{ 4.946886 }$$

$$S_{b_0} = 0.000542196$$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula:

$$t_{0.975,7} = 2.365$$

$$IC ( b_0 ) = b_0 \pm t_{0.975,7} S_{b0}$$

$$IC ( b_0 ) = -0.00135 \pm 0.001282$$

$$IC ( b_0 ) = -0.00263 \text{ a } -6.8E-05$$

$$CV_{y/x} = \frac{0.000243776}{\text{---}} \times 100 = 0.25 \% \leq 2\%$$

#### 4. PRECISIÓN INTERMEDIA

Día 1

Operador : D. García  
 Fecha : 17 Julio 12  
 Aparato : HPLC F157

% Recobro= (Área muestra/Área std)\*(Cstd/Cmta)\*100  
 Conc. Std= 0.100394967 mg/mL

Analista 1 : D. García

	Área	FR
	19365714	5.18416E-09
	19383405	5.17943E-09
	19371548	5.1826E-09
	19484113	5.15266E-09
	19483685	5.15277E-09
	19510868	5.14559E-09
Media =	19433222	5.1662E-09
Desv std =	66344.639	1.76348E-11
CV=		0.34 %

Área de	Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
	1.9E+07	0.0571	0.100395	99.58
	2E+07	0.0571	0.100395	100.81
	1.9E+07	0.0571	0.100395	99.84
			Media =	100.08
			Desv std =	0.65
			CV=	0.65

Analista 2 : C. Pierre

Conc. Std= 0.100394967 mg/mL

	Área	FR
	19365714	5.18416E-09
	19383405	5.17943E-09
	19371548	5.1826E-09
	19484113	5.15266E-09
	19483685	5.15277E-09
	19510868	5.14559E-09
Media =	19433222	5.1662E-09
Desv std =	66344.639	1.76348E-11
CV=		0.34 %

Área de	Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
	1.9E+07	0.0573	0.100747	99.24
	1.9E+07	0.0574	0.100922	99.70
	1.9E+07	0.0573	0.100747	98.98
			Media =	99
			Desv std =	0
			CV =	0.37

**Global**  
 DIA 1

Media = 99.69  
 Desv std = 0.63  
 CV = 0.64 %

**Día 2**

Operador : **D. García** % Recobro= (Área muestra/Área std)\*(Cstd/Cmta)\*100  
 Fecha : **18 Julio 12** Conc. Std: 0.100219144 mg/mL  
 Aparato : **HPLC F157**

**Analista1**

	Área	FR
	19338107	5.18247E-09
	19351758	5.17881E-09
	19291116	5.19509E-09
	19390369	5.1685E-09
	19396951	5.16675E-09
	19394505	5.1674E-09
Media =	19360468	5.1765E-09
Desv std =		1.12126E-11
CV =		0.22 %

Área de			
Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
1.9E+07	0.05713	0.100448	99.30
1.9E+07	0.05700	0.100219	100.14
1.9E+07	0.05726	0.100676	98.79
		Media =	99
		Desv std =	1
		CV =	0.69

**Analista 2**

Conc. Std= 0.100219144 mg/mL

	Área	FR
	19338107	5.18247E-09
	19351758	5.17881E-09
	19291116	5.19509E-09
	19390369	5.1685E-09
	19396951	5.16675E-09
	19394505	5.1674E-09
Media =	19360468	5.1765E-09
Desv std =	41878.813	1.12126E-11
CV =	0.216	0.22 %

Área de			
Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
1.9E+07	0.05747	0.101046	99.45
1.9E+07	0.05728	0.100711	99.12
1.9E+07	0.05759	0.101257	99.01
		Media =	99
		Desv std =	0
		CV =	0.23

**Global**  
DIA 2

Media = 99.30  
Desv std = 0.47  
CV = 0.47 %

## 5. TOLERANCIA

Operador : D. García  
 Fecha : 19 Julio 12  
 Equipo : HPLC F098

Columna: Inertsil 5µ PHENOMENEX  
 250 mm x 4.0 mm

Conc. Std: 0.1002191 mg/mL

FR = Conc std / Area std

% Recobro= (Area muestra/Area std)\*(Cstd/Cmta)\*100

	Área	FR
	18777132	5.3373E-09
	18929989	5.2942E-09
	18950742	5.2884E-09
	18941698	5.29093E-09
	18992287	5.27683E-09
	18942585	5.29068E-09
Media =	18922406	
Desv std =	74333.967	
CV =	0.39	%

muestras			
áreas	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
18864311	0.05747	0.101046	98.88
18962263	0.05728	0.100711	99.72
18816894	0.05759	0.101257	98.42
		Media =	99.01
		Desv std =	0.66
		CV =	0.66

Columna	Base		Alterada		di
	Inertsil 5µ PHENOMENEX 4.0mm		Inertsil 5µ PHENOMENEX 4.6 mm		
	99.41	% -	99.34	% =	0.06
Equipo	F157		F098		
	99.41	% -	99.01	% =	0.40

CRITERIO: di ≤ 2 %

## 6. ROBUSTEZ

VARIABLE	CONDICIÓN BASE	CONDICIÓN ALTERNATIVA	
Cambio velocidad de flujo	0.9 mL/min	0.8 mL/min	1.0 mL/min
Cambio proporción FM	72;28	74;26	70;30
Cambio vol. de inyección	25 µL	15 µL	35 µL
Cambio de temperatura	45°C	40°C	50°C

### CONDICIÓN BASE

Operador : D. García      Conc. Std= 0.1007 mg/mL  
 Fecha : 13 Julio 12      Frstd= (Conc. Std) / (Área std)  
 Equipo : HPLC F157      % Ensayo= Area mta / Cmta X FR X 100

	Area	FR std
	19356538	5.205E-09
	19307401	5.218E-09
	19345647	5.208E-09
	19256170	5.232E-09
	19262138	5.230E-09
	19297216	5.221E-09
<b>FR MEDIA</b>	5.219E-09	19304185
<b>RSD</b>	<b>0.2147</b>	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
peso mtra g	0.057	0.0572	0.057	10
con. mta mg/mL	0.100219	0.100571	0.100219	
resp mta	19224225	19204535	19127329	
ENSAYO	100.11 %	99.66 %	99.61 %	
promedio	<b>99.79</b>			
des std	<b>0.28</b>			
C.V	<b>0.28</b>			%





**Ensayo 3**      % FASE:      Sol. Buffer: Metanol (70:30)

Operador : D. García      Conc. Std=0.1007      mg/mL  
 Fecha : 14 Julio 12  
 Equipo : HPLC F157

	Área	FR std
	11670661	8.632E-09
	11693939	8.615E-09
	11690611	8.618E-09
	11663754	8.638E-09
	11685000	8.622E-09
	11687099	8.620E-09
<b>FR MEDIA</b>	<b>8.624E-09</b>	
<b>RSD</b>	<b>0.1023</b>	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
peso mtra g	0.057	0.0572	0.057	10
con. mta mg/mL	0.100219	0.100571	0.100219	
resp mta	11651646	11660696	11628116	
ENSAYO	100.27 %	99.99 %	100.06 %	
promedio	<b>100.11</b>			
des std	<b>0.14</b>			
C.V	<b>0.14</b>	%		

## % FASE:      Sol Buffer : Metanol (74:26)      Conc. Std= 0.1007      mg/mL

	Área	FR std
	27090371	3.719E-09
	27174708	3.707E-09
	27192754	3.705E-09
	27234277	3.699E-09
	27175597	3.707E-09
	27176459	3.707E-09
<b>FR MEDIA</b>	<b>3.707E-09</b>	
<b>RSD</b>	<b>0.1727</b>	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
peso mtra g	0.057	0.0572	0.057	10
con. mta mg/mL	0.100219	0.100571	0.100219	
resp mta	27103487	27077294	26999770	
ENSAYO	100.27 %	99.82 %	99.88 %	
promedio	<b>99.99</b>			
des std	<b>0.24</b>			
C.V	<b>0.24</b>	%		



### TABLA RESULTADOS DEL PARÁMETRO DE ROBUSTEZ

Diferencia media(di)= Media condicion base - Media de la condición alterada

Condición	Base		Alterada		di
<b>Volumen de Inyección</b>	25µL		15µL		
	99.79	% -	99.90	% =	0.11
	25µL		35µL		
	99.79	% -	99.84	% =	0.05
<b>Velocidad de Flujo</b>	0.9 mL/min		0.8 mL/min		
	99.79	% -	100.06	% =	0.27
	0.9 mL/min		1.0 mL/min		
	99.79	% -	99.98	% =	0.19
<b>% Fase Sol. Buffer/Metanol</b>	(70/30)		(70:30)		
	99.79	% -	100.11	% =	0.32
	(74/26)		(74:26)		
	99.79	% -	99.99	% =	0.20
<b>Temperatura</b>	45°C		40°C		
	99.79	% -	100.05	% =	0.25
	45°C		50°C		
	99.79	% -	100.11	% =	0.32

CRITERIO:  $di \leq 2\%$

**7a.PRUEBAS LIMITE (IMPUREZA BAY-Z)**

Operador : D. García  
 Fecha : 02 Julio 12  
 Aparatos : HPLC F157

F Std = 0,962

Stock= 12,6 mg Bay Z en 50 mL Sol. Buffer  
 2 mL en 500 mL Sol. Buffer  
 La concentracion final de Bay-Z 0,001 mg por mL

µg/mL	Stock =	12,6 mg Bay-Z en	50 mL Sol. Buffer
S 0.04%	0,0387878	2 mL /50 mL Sol. Buffer	0,039 µg / mL Bay-Z
S 0.08%	0,0775757	2 mL /50 mL Sol. Buffer	0,078 µg / mL Bay-Z
S 0.10%	0,0969696	2,5 mL /50 mL Sol. Buffer	0,097 µg / mL Bay-Z
S 0.16%	0,1551514	4 mL /50 mL Sol. Buffer	0,155 µg / mL Bay-Z
S 0.20%	0,1939392	5 mL /50 mL Sol. Buffer	0,194 µg / mL Bay-Z

STD %	0,0387878	0,07757568	0,0969696	0,15515	0,193939	mg/mL
%	0,04	0,08	0,1	0,16	2	x-eje
	7049	14621	17623	29553	36920	
	6882	14438	18188	29348	36808	
	6810	14756	18138	29530	36815	
MEDIA	6914	14605	17983	29477	36848	y-eje
RSD	1,7734	1,0928	1,7393	0,381	0,1703	

	x-eje	x <sup>2</sup>	y-eje	y <sup>2</sup>	xy
	0,1164	0,00451349	20741	1,43E+08	804
	0,2327	0,01805396	43815	6,4E+08	3399
	0,2909	0,02820931	53949	9,7E+08	5231
	0,4655	0,0722158	88431	2,61E+09	13720
	0,5818	0,1128372	110543	4,07E+09	21439
SUMA	1,6873	0,2358298	317479	8,43E+09	44594
MEDIA	0,1124847		21165,3		

n = 15  
 sum xx =  $\text{sum } x^2 - (\text{sum } x)^2 / n = 0,046038$   
 sum yy =  $\text{sum } y^2 - (\text{sum } y)^2 / n = 1,71E+09$   
 sum XY =  $\text{sum } xy - (\text{sum } x * \text{sum } y) / n = 8882,159$

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{\text{sum } XY}{\text{sum } xx} = \frac{8882,16}{0,04604} = 192932,75$$

$$\text{intercepto} = b_0 = \text{media } y - b_1(\text{media } x) = -536,72222$$

$$S^2_{y/x} = (\text{sum } yy - b_1 \text{ sum } XY)/(n-2) = 41090,9$$

$$\text{Coeficiente de correlación} = r = \frac{\text{sum } XY}{\sqrt{\text{sum } xx * \text{sum } yy}} = 0,99984$$

$$\text{Coeficiente de Determinación} = r^2 = 0,99969$$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula:

$$t_{0.975,13} = 2,16$$

$$\text{intercepto} = b_0 = -536,72222 \pm 2.07 \sqrt{(1/n + (\text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

$$b_0 = \begin{matrix} -536,72222 & \pm & 255,8728 \\ -280,84944 & \pm & 792,595 \end{matrix}$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 192932,745 \pm 2.07 \sqrt{(1 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

$$b_1 = \begin{matrix} 192932,745 & \pm & 2040,659 \\ 194973,404 & & 190892,1 \end{matrix}$$

El intervalo de confianza de la regresion lineal

$$y = b_0 + b_1 * x_0 = \pm 2.08 \sqrt{(1/n + (x_0 - \text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2_{y/x}}$$

1) x0 =	40	%	y =	7716773	±	81396,8781
2) x0 =	100	%	y =	19292738	±	203836,345
3) x0 =	120	%	y =	23151393	±	244649,511

x-eje	y-eje	y-eje - interv. conf.	y-eje + interv. conf.
50	7716773	7635376	7798170
100	19292738	19088901	19496574
120	23151393	22906743	23396042

Sesgo del error debido al intercepto diferente de cero

$$y = b_0 + b_1 \cdot x$$

y-intercepto : <= 5% de el punto medio de respuesta

y-intercepto	=	-536,72
punto medio	=	1,9E+07
% error	=	0,00278 µg/mL

			Sobre la curva
Y- limite inf :	40	µg/mL	7716773
Y-100% :	100	µg/mL	19292738
Y-limite sup. :	120	µg/mL	23151393

a) Limite inferior : 40 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{Y\text{-inferior}}{Y\text{-100\%}} \right) \times \frac{100 \cdot b_0}{40 \cdot b_1} =$$

$$= 0,60001669 \times -0,007 = -0,004 \text{ mg/mL}$$

b) Limite Superior : 120 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{Y\text{-superior}}{Y\text{-100\%}} \right) \times \frac{100 \cdot b_0}{120 \cdot b_1} =$$

$$= -0,2000056 \times -0,0023 = 0,0005 \text{ mg/mL}$$

Análisis de Residuales :

x-eje conc	y-eje resp	resp/conc	y sobre curva	% error de y
0				
0,0388	6914	178243	6947	0,478
0,0776	14605	188268	14430	-1,197
0,097	17983	185450	18172	1,050
0,155	29477	189989	29397	-0,271
0,194	36848	189996	36881	0,089

MEDIA = 186389  
RSD resp / conc = 0,0264 µg/mL

**Límite de Detección :**

$$\begin{aligned} Sy/x &= 202,70894 \\ \text{Pendiente } (b_1) &= 192932,745 \end{aligned}$$

$$LD = \frac{3.3 \times Sy/x}{b_1}$$

$$LD = \frac{3.3 \times 202,709}{192932,745} =$$

**0,0034672**  $\mu\text{g/mL}$

**Límite de Cuantificación:**

$$LC = \frac{10 \times Sy/x}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times 202,709}{192932,745} =$$

**0,0105067**  $\mu\text{g/mL}$

**7b .PRUEBAS LIMITE (IMPUREZAS DESCONOCIDAS)**

Operador : D.García  
 Fecha : 29/Jun/12  
 Aparatos : HPLC F157

F Std = 0,959

Stock= 57,2 mg moxifloxacina en 10 mL Agua purificada  
 1 ml en 50 mL Sol. Buffer  
 De la solución anterior 2 ml en 200 mL Sol. Buffer  
 La concentración final de Moxifloxacina= 0,05 mg por ml

	µg/mL		
S 0.04%	0,0402283	2 mL /50 mL Sol. Buffer	0,0402 µg / mL moxifloxacina
S 0.08%	0,0804566	2 mL /25 mL Sol. Buffer	0,0805 µg / mL moxifloxacina
S 0.10%	0,1005708	2,5 mL /25 mL Sol. Buffer	0,1006 µg / mL moxifloxacina
S 0.16%	0,1609133	4 mL /25 mL Sol. Buffer	0,1609 µg / mL moxifloxacina
S 0.20%	0,2011416	5 mL /25 mL Sol. Buffer	0,2011 µg / mL moxifloxacina

STD	0,0402283	0,0804566	0,10057079	0,16091	0,201142	mg/mL
%	0,04	0,08	0,1	0,2	0,2	x-eje
	7756	15591	19740	31229	38975	
	7904	15364	19694	31421	39344	
	8056	15737	19733	31228	39036	
MEDIA	7905	15564	19722	31293	39118	y-eje
RSD	1,8975	1,2077	0,1257	0,3552	0,5056	

	x-eje	x <sup>2</sup>	y-eje	y <sup>2</sup>	xy
	0,1207	0,00485495	23716	1,88E+08	954
	0,2414	0,01941981	46692	7,27E+08	3757
	0,3017	0,03034345	59167	1,17E+09	5950
	0,4827	0,0776792	93878	2,94E+09	15106
	0,6034	0,1213738	117355	4,59E+09	23605
SUMA	1,7499	0,2536713	340808	9,61E+09	49372
MEDIA	0,1166621		22720,5		

n = 15  
 sum xx =  $\sum x^2 - (\sum x)^2 / n = 0,049521$   
 sum yy =  $\sum y^2 - (\sum y)^2 / n = 1,87E+09$   
 sum XY =  $\sum xy - (\sum x * \sum y) / n = 9613,011$

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{\text{sum } XY}{\text{sum } xx} = \frac{9613,01}{0,04952} = 194121,79$$

$$\text{intercepto} = b_0 = \text{media } y - b_1(\text{media } x) = 73,874183$$

$$S^2 y/x = (\text{sum } yy - b_1 \text{ sum } XY)/(n-2) = 24530,1$$

$$\text{Coeficiente de correlación} = r = \frac{\text{sum } XY}{\sqrt{\text{sum } xx * \text{sum } yy}} = 0,99991$$

$$\text{Coeficiente de Determinación} = r^2 = 0,99983$$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula:

$$t_{0,975,13} = 2,16$$

$$\text{intercepto} = b_0 = 73,874183 \pm 2,07 \sqrt{(1/n + (\text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2 y/x}$$

$$b_0 = \begin{matrix} 73,874183 & \pm & 197,6975 \\ 271,571684 & \pm & 123,8233 \end{matrix}$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 194121,792 \pm 2,07 \sqrt{(1 / \text{sum } xx) * S^2 y/x}$$

$$b_1 = \begin{matrix} 194121,792 & \pm & 1520,237 \\ 195642,028 & & 192601,6 \end{matrix}$$

El intervalo de confianza de la regresión lineal

$$y = b_0 + b_1 * x_0 \pm 2,08 \sqrt{(1/n + (x_0 - \text{media } x)^2 / \text{sum } xx) * S^2 y/x}$$

1) x0 =	40	%	y =	7764946	±	60632,1724
2) x0 =	100	%	y =	19412253	±	151846,33
3) x0 =	120	%	y =	23294689	±	182251,057

x-eje	y-eje	y-eje - interv. conf.	y-eje + interv. conf.
50	7764946	7704313	7825578
100	19412253	19260407	19564099
120	23294689	23112438	23476940

Sesgo del error debido al intercepto diferente de cero

$$y = b_0 + b_1 * x$$

y-intercepto : <= 5% de el punto medio de respuesta

y-intercepto = 73,8742

punto medio = 1,9E+07

% error = 0,00038 µg/mL

			Sobre la curva
Y- limite inf :	40	µg/mL	7764946
Y-100% :	100	µg/mL	19412253
Y-limite sup. :	120	µg/mL	23294689

a) Limite inferior : 40 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{Y\text{-inferior}}{Y-100\%} \right) X \frac{100 b_0}{40 X b_1} =$$

$$= 0,5999977 X 0,00095 = 0,001\% \text{ mg/mL}$$

b) Limite Superior : 120 %

$$\% E = \left( 1 - \frac{Y\text{-superior}}{Y-100\%} \right) X \frac{100 b_0}{120 X b_1} =$$

$$= -0,1999992 X 0,00032 = -0,0001\% \text{ mg/mL}$$

Análisis de Residuales :

x-eje conc	y-eje resp	resp/conc	y sobre curva	% error de y
0				
0,0402	7905	196512	7883	-0,282
0,0805	15564	193446	15692	0,824
0,101	19722	196104	19597	-0,636
0,161	31293	194469	31311	0,057
0,201	39118	194482	39120	0,004
MEDIA =		195002		
RSD resp / conc =		0,0065	µg/mL	

**Límite de Detección :**

$$\begin{aligned} S_{y/x} &= 156,621002 \\ \text{Pendiente } (b_1) &= 194121,792 \end{aligned}$$

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$LD = \frac{3.3 \times 156,621}{194121,7919} =$$

**0,0026625**  $\mu\text{g/mL}$

**Límite de Cuantificación:**

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times 156,621}{194121,7919} =$$

**0,0080682**  $\mu\text{g/mL}$

## 8. ESPECIFICIDAD.

<b>Condiciones de Análisis</b>
Condición Base (sin degradar)
HCl conc./ 80°C 4h
NaOH 50%/ 80°C 4 h
Calor 80°C x 4 h
Peróxido de hidrógeno/80°C 2 h

### CONDICIÓN BASE (Sin Degradar)

Operador : D. García  
 Fecha : 24 Julio 12  
 Equipo : HPLC F157

Conc. Std= 0,10074661 mg/mL  
 Conc. Std= (mg std moxifloxacina HCl/10mL agua purif)  
 \*(1mL /50mL)  
 Conc. Mtra= (Peso mtra/10mL)\*(2mL/25mL)\*(5mL/20mL)  
 Pureza std= 0.959

	Área	FR std
	19284418	5,224E-09
	19292287	5,222E-09
	19315310	5,216E-09
	19261126	5,231E-09
	19276842	5,226E-09
	19312190	5,217E-09
FR MEDIA	5,223E-09	19290362
RSD	0,1081 %	

Frstd= (Conc. Std) / (Área std)  
 % Ensayo= Área mta / Cmta X FR X 100

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	0,2851	0,2851	0,2851	50
con. mta mg	0,100254	0,100254	0,100254	
resp mta	19200608	19087780	19305506	
ENSAYO	100,02 %	99,44 %	100,57 %	
promedio	100,01			
des std	0,57			
CV	0,57			

**Ensayo 1****Calor 80°C / 4 h**

Operador : D. García  
 Fecha : 24 Julio 12  
 Equipo : HPLC F157

Conc. Std= 0.10074661 mg/mL

Área	FR std
19444971	5.181E-09
19427163	5.186E-09
19405413	5.192E-09
19426715	5.186E-09
19450621	5.180E-09
19455102	5.178E-09

**FR MEDIA** 5.184E-09 19434998  
**RSD** 0.0964 %

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
Peso (g)	0.2851	0.2851	0.2851	50
con. mta mg/mL	0.100254	0.100254	0.100254	
resp mta	19406664	19281155	19056942	
ENSAYO	101.10 %	100.44 %	99.28 %	
promedio	100.27			
des std	0.92			
C.V	0.92 %			

**Ensayo 2****Peróxido 80°C / 2 h**

Operador : D. García  
 Fecha : 24 Julio 12  
 Equipo : HPLC F157

Conc. Std= 0.100746613 mg/mL

Área	FR std
19159131	5.258E-09
19161053	5.258E-09
19129143	5.267E-09
19138100	5.264E-09
19164227	5.257E-09
19121641	5.269E-09

**FR MEDIA** 5.262E-09 19145549  
**RSD** 0.0955 %

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
Peso (g)	0.2851	0.2851	0.2851	50
con. mta mg/mL	0.100254	0.100254	0.100254	
resp mta	19138317	18903891	18620184	
ENSAYO	99.70 %	98.48 %	97.00 %	
promedio	98.4			
des std	1.35			
C.V	1.37 %			

**Ensayo 3** HCl conc. 80°C / 4 h

Operador : D. García  
 Fecha : 24 Julio 12  
 Equipo : HPLC F157

Conc. Std= 0.100746613 mg/mL

	Área	FR std		
	19397877	5.194E-09		
	19344348	5.208E-09		
	19358535	5.204E-09		
	19335439	5.210E-09		
	19334809	5.211E-09		
	19329562	5.212E-09		
<b>FR MEDIA</b>	5.207E-09			
<b>RSD</b>	0.1317 %			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
Peso (g)	0.2851	0.2851	0.2851	50
con. mta mg/mL	0.100254	0.100254	0.100254	
resp mta	19319239	19276642	19273503	
ENSAYO	100.64 %	100.42 %	100.40 %	
promedio	100.49			
des std	0.13			
C.V.	0.13 %			

**Ensayo 4** NaOH 50% 80°C / 4 h

Operador : D. García  
 Fecha : 24 Julio 12  
 Aparato : HPLC F157

Conc. Std= 0.100746613 mg/mL

	Área	FR std		
	19271319	5.228E-09		
	19284789	5.224E-09		
	19273851	5.227E-09		
	19288613	5.223E-09		
	19297385	5.221E-09		
	19281391	5.225E-09		
<b>FR MEDIA</b>	5.225E-09			
<b>RSD</b>	0.05 %			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL
Peso (g)	0.2851	0.2851	0.2851	50
con. mta mg/mL	0.100254	0.100254	0.100254	
resp mta	19268646	19440652	19136157	
ENSAYO	100.38 %	101.27 %	99.69 %	
promedio	100.45			
des std	0.80			
C.V.	0.79 %			

**9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**

**Condición Base**

Operador : D. García FR = Conc. Std / Área  
 Fecha : 09 Julio 12 % Ensayo= Área mta / Cmta X FR X 100  
 Aparato : HPLC F157 Conc. Std= 0,100219 mg/mL

	Área	FR std
	19224547	5,21308E-09
	19195912	5,22086E-09
	19173225	5,22704E-09
<u>0,2118816</u>	19213929	5,21596E-09
	19219347	5,21449E-09
	19249449	5,20634E-09
	<b>FR MEDIA</b>	5,2163E-09
	<b>RSD</b>	<b>0,1353</b> %

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en mL	Alícuota 1 mL en 50 mL
peso mtra g	0,057	0,057	0,057	10	
con. mta mg/mL	0,1002191	0,1002191	0,1002191		
resp mta	19617902	19360101	19174078		
ENSAYO	102,11 %	100,77 %	99,80 %		
promedio	<b>100,89</b>				
des std	<b>1,16</b>				
CV	<b>1,15</b> %				

**T1= 24HRS**

**Ensayo 1**

Operador : D. García Conc. Std= 0,100395 mg/mL  
 Fecha : 10 Julio 12  
 Aparato : HPLC F157

	Area	FR std
	19316253	5,1974349E-09
	19328180	5,1942277E-09
	19315409	5,1976620E-09
	19344687	5,1897954E-09
	19351860	5,1878717E-09
	19364800	5,1844051E-09
	<b>FR MEDIA</b>	5,192E-09
	<b>RSD</b>	<b>0,1041</b> %





## Capítulo IV. RESULTADOS

### 1.a. PRECISIÓN : SISTEMA

	<b>CONC STD mg/ mL</b>	<b>FR SISTEMA CONC STD / ÁREA</b>
STD 1	0.100219144	5.220E-09
STD 2	0.100219144	5.254E-09
STD 3	0.100219144	5.260E-09
STD 4	0.10021914	5.260E-09
STD 5	0.100219144	5.217E-09
STD 6	0.100219144	5.248E-09
	MEDIA =	5.243E-09
	DER ó CV =	0.38%

Criterio Sugerido :

- CV : =< 1.5%

**1.b. PRECISIÓN :**      MÉTODO

PORCIENTO RECOBRO (normalizado al 100%)	
Muestra 1	100.00%
Muestra 2	100.58%
Muestra 3	99.90%
Muestra 4	99.82%
Muestra 5	100.55%
Muestra 6	100.58%
MEDIA =	100.24%
Recobro =	0.239%
DER ó C.V =	0.37%

Criterio Sugerido :

- Recobro :  $\leq 2\%$                       ó Recobro de todos los valores  $\pm 2\%$
- CV :  $\leq 2\%$
- Intervalo ( $\mu$ ) debe contener al 100 o el promedio aritmetico de recobro se incluya en el intervalo de 98-102%

<b>Recobro :</b>	<b>0.2%</b>	<b>&lt;</b>	<b>2%</b>	<b>CUMPLE</b>
<b>%RSD ó CV:</b>	<b>0.4%</b>	<b>&lt;</b>	<b>2%</b>	<b>CUMPLE</b>
<b>Intervalo (<math>\mu</math>):</b>	<b>99.87</b>	<b>a</b>	<b>100.61</b>	<b>CUMPLE</b>

## 2. LINEALIDAD DE SISTEMA : (curva estándar)

	CONC.	RESPUESTA		RESP/CONC
		VALOR	MEDIA	
STD 1	0.060%	11537578 11551192 11530229	11539666	191907219
STD 2	0.080%	15370857 15354588 15436846	15387430	191922293
STD 3	0.100%	19167098 19153313 19184682	19168364	191264498
STD 4	0.120%	23010054 23050265 23018854	23026391	191467003
STD 5	0.140%	26538950 26531989 26569793	26546911	189206156

### Cálculos :

### Criterio Sugerido:

- sensibilidad (pendiente= $b_1$ )	<b>190590898</b>
- intercepto ( $b_0$ )	<b>32896</b>
-Intervalo de confianza al 95 %. pendiente	190590898 $\pm$ 814203.4 <b>191405101 a 189776694.7</b>

### No incluye al cero

- % error de y-intercepto del punto medio	<b>0.00%</b>	$\leq 5\%$
- Coef. de correlación (r)	1.0000	$r \geq 0.9925$
- Coef. determinación ( $r^2$ )	<b>0.9999</b>	$r^2 \geq 0.985$
- CV de la relación RESP/CONC	<b>0.63%</b>	$\leq 2\%$

Ver gráfico Anexo 1.

### 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

	Áreas	mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
80%	15253622	0.08018	0.07951	99
	15249702	0.08018	0.07949	99
	15199868	0.08018	0.07923	99
100%	19222236	0.10022	0.10020	100
	19226596	0.10022	0.10022	100
	19228647	0.10022	0.10023	100
120%	22319452	0.11692	0.11634	100
	22363845	0.11692	0.11657	100
	22349828	0.11692	0.11650	100

#### Cálculos:

-Pendiente ( $b_1$ ) = 1.0095

-Ordenada al origen( $b_0$ )=  
ó Intercepto en Y -0.0014

-Intervalo de Confianza  
Pendiente

**0.997 a 1.022**

**Debe contener  
al uno**

Ordenada al origen

**-0.003 a 0.000**

**Debe contener  
al cero**

- Coeficiente de determinación ( $r^2$ )= **0.9996**

**$r^2 \geq 0.985$**

- CV recobro= **0.43%**

**$CV \leq 2\%$**

- %Recobro para todos los puntos **98 a 102**

**Recobro  $\pm 2\%$**

- CV y/x de la regresion lineal = **0.25%**

**$CV \leq 2\%$**

Ver gráfico Anexo 2.

#### 4. PRECISIÓN INTERMEDIA

% MOXIFLOXACINA

ANALISTA	DÍA	
	1	2
	1	99.58 100.81 99.84
2	99.24 99.70 98.98	99.45 99.12 99.01

Media = 99.50 %  
 S = 0.5699  
 CV = 0.6 %

**Criterio de Aceptación**

CV ≤ 2%

CV

ANALISTA	DIA		
	1	2	
	1	0.65	0.69
2	0.37	0.23	0.28 %
	0.64	0.47	%

#### 5. TOLERANCIA

Columna	Base	Alterada	di
	Inertsil 5μ PHENOMENEX 4.0 mm	Inertsil 5μ PHENOMENEX 4.6 mm	
	99.41 % -	99.34 % =	0.06
Equipo	<b>F157</b> 99.41 % -	<b>F098</b> 99.01 % =	0.40

## 6. ROBUSTEZ DEL MÉTODO

VARIABLE	CONDICION BASE	CONDICIÓN ALTERNATIVA	
		0.8	1.0
Cambio velocidad de flujo	0.9 (mL/min)	0.8	1.0
Cambio proporción FM	72;28	70;30	74;26
Cambio vol. de inyección	25 µL	15µL	35µL
Temperatura	45°C	40°C	50°C

Diferencia media(di)= Media condición base - Media de la condición alterada

Condición	Base			Alterada			di
<b>Volumen de Inyección</b>	25µL			15µL			
	99.79	%	-	99.90	%	=	0.11 %
	25µL			35µL			
	99.79	%	-	99.84	%	=	0.05 %
<b>Velocidad de Flujo</b>	1.0 mL/min			0.8 mL/min			
	99.79	%	-	100.06	%	=	0.27 %
	1.0 mL/min			1.0 mL/min			
	99.79	%	-	99.98	%	=	0.19 %
<b>% Fase móvil (Sol. Buffer: Metanol)</b>	(72/28)			(70:30)			
	99.79	%	-	100.11	%	=	0.32 %
	(72/28)			(74:26)			
	99.79	%	-	99.99	%	=	0.20 %
<b>Temperatura</b>	45°C			40°C			
	99.79	%	-	100.05	%	=	0.25 %
	45°C			50°C			
	99.79	%	-	100.11	%	=	0.32 %

## 7a. PRUEBAS LÍMITE (IMPUREZA BAY-Z)

	CONC. % Bay-Z	RESPUESTA		RESP/CONC
		VALOR	MEDIA	
STD 1	0,039	7049 6882 6810	6914	178243
STD 2	0,078	14621 14438 14756	14605	188268
STD 3	0,097	17623 18188 18138	17983	185450
STD 4	0,155	29553 29348 29530	29477	189989
STD 5	0,194	36920 36808 36815	36848	189996

### Resultados:

pendiente =  $b_1 = 192933$

Intervalo de confianza de la regresion lineal al 95% de confianz:

192933      +-      2040,66

Coefficiente de correlación 0,99984

Coefficiente de Determinaci 0,9997      **≥ 0.98**

### Límite de detección :

$$S_{y/x} = 202,71$$

$$\text{Pendiente } (b_1) = 192933$$

$$LD = \frac{3.3 \times 202,71}{192932,745} = \mathbf{0,00347} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

### Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{10 \times 202,71}{192933} = \mathbf{0,01051} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

**7b. PRUEBAS LIMITE (IMPUREZAS DESCONOCIDAS)**

	CONC. % MOXI	RESPUESTA		RESP/CONC
		VALOR	MEDIA	
STD 1	0,040	7756 7904 8056	7905	196512
STD 2	0,080	15591 15364 15737	15564	193446
STD 3	0,101	19740 19694 19733	19722	196104
STD 4	0,161	31229 31421 31228	31293	194469
STD 5	0,201	38975 39344 39036	39118	194482

**Resultados:**

pendiente = b1= 194122

Intervalo de confianza de la regresion lineal al 95% de confianza

194122 +- 1520,24

Coefficiente de correlación = 0,99991

Coefficiente de Determinación 0,99983 **≥ 0.98**

**Límite de detección :**

$$S_{y/x} = 156,621$$

$$\text{Pendiente (b1)} = 194122$$

$$LD = \frac{3.3 \times 156,621}{194121,7919} = 0,00266 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

**Límite de Cuantificación:**

$$LC = \frac{10 \times 156,621}{194122} = 0,00807 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

## 8. ESPECIFICIDAD.

Condición	Base	% Degradado
<b>INTACTO</b>		
Resultado	100.01 %	NA
<b>Peroxido de hidrógeno/80°C 4 h</b>		
Resultado	98.39 %	1.62 %
<b>HCl conc./ 80°C 4 h</b>		
Resultado	100.49 %	0.48 %
<b>Calor/80°C 4 h</b>		
Resultado	100.27 %	0.26 %
<b>NaOH 50%/ 80°C 4 h</b>		
Resultado	100.45 %	0.44 %

NOTA: Ver cromatogramas Anexo 3

## 9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Diferencia media (di) = Media condicion base - Media de la condición alterada

Inicial	24 hrs		48 hrs		72 hrs	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
100,89 %	99,86	100,62	99,87	100,16	100,38	100,44
	Diferencia %		Diferencia %		Diferencia %	
	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración
	1,03	0,28	1,02	0,73	0,51	0,45

CRITERIO:  $d_i \leq 2 \%$

## Capítulo V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### \*PRECISIÓN DEL SISTEMA:

Usando las condiciones de análisis establecidas en el método se obtuvo un CV = 0.38%, en una serie de 6 muestras de solución estándar, teniendo una especificación de CV menor a 1.5% por lo tanto el Sistema es preciso por repetibilidad.

### \*LINEALIDAD DEL SISTEMA:

Se preparó una curva estándar del 60 al 140% de la concentración de moxifloxacina con respecto a la concentración de trabajo (0.10 mg/mL) para verificar la linealidad del sistema. Las concentraciones reales de trabajo en la curva fueron: 0.140%, 0.120%, 0.100%, 0.080% y 0.060%. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

- Intervalo de la pendiente IC ( $\beta_1$ )=  $190590898 \pm 814203.35$ , el cual no contiene al cero.
- Intervalo del intercepto IC ( $\beta_0$ )= 32896 a 146877.77, el cual no contiene al cero.
- El error del intercepto en el punto medio de la curva, es 0.00%, el cual deberá ser menor o igual a 5%.
- Se calculó el Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.999 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.985.
- El Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 1.000 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.9925.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto el Sistema es lineal en el rango de concentraciones analizadas, con lo cual se puede tener la confianza de los resultados en este intervalo de concentración.

#### **\*PRECISIÓN DEL MÉTODO POR REPETIBILIDAD:**

Se evaluó la precisión del método preparando soluciones de moxifloxacina a la concentración de trabajo; tomando 6 pesadas independientes de moxifloxacina HCl, materia prima; se analizaron bajo las condiciones establecidas en el método analítico a la concentración de trabajo (0.100 mg/mL).

Los porcentajes de recobro de moxifloxacina obtenidos de las 6 determinaciones presentan un CV = 0.37% y el promedio del porcentaje = 100.24%; se incluye en el intervalo de la media poblacional y todos los valores están contenidos dentro de la especificación de recobro de 98.0% a 101.0%. El método es preciso por repetibilidad.

#### **\*LINEALIDAD DEL MÉTODO:**

Se analizaron por triplicado tres concentraciones a los niveles de 80%, 100% y 120% de materia prima de moxifloxacina. Pesando 45.6 mg, 57.0 mg y 66.5 mg de moxifloxacina HCl y llevando a volumen de 10 mL con agua purificada, de manera independiente, posteriormente se tomo una alícuota de 1 mL a un matraz volumétrico de 50 mL, como se indica en la siguiente tabla.

<b>% Conc. de la curva</b>	<b>Peso en mg. de moxifloxacina HCl en 10 mL agua purif.</b>	<b>Alícuota en mL de la solución obtenida de moxifloxacina</b>	<b>Volumen con Sol. Buffer en mL</b>	<b>Conc. Teórica final en mg/mL</b>
80	45.6	1.0	50.0	0.08
100	57.0	1.0	50.0	0.10
120	66.5	1.0	50.0	0.12

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Intervalo de la pendiente IC ( $\beta_1$ )= 0.9967 a 1.0223, el cual debe contener al uno.
- Intervalo del Intercepto IC ( $\beta_0$ ) = -0.003 a 0.000, el cual debe contener al cero.
- Se calculó el Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.9999 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.985.

- El CV de la regresión = 0.25% el cual debe ser menor de 2.0%.

- El % de recobro de todos los puntos se encuentran en el rango de 100% ± 2%.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto el Método es lineal en el rango de concentraciones analizadas.

**\*PRECISIÓN INTERMEDIA:**

Se analizó moxifloxacina HCl, materia prima a una concentración de trabajo de 0.1 mg/mL de moxifloxacina base por triplicado por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo, siguiendo el método analítico. Obteniéndose los siguientes resultados:

	<b>ANALISTA 1</b>	<b>ANALISTA 2</b>	<b>CV POR DIA</b>
<b>DÍA 1</b>	0.65	0.37	0.64 %
<b>DÍA 2</b>	0.69	0.23	0.47 %
<b>CV POR ANALISTA</b>	0.70 %	0.28 %	-----

El C.V total de todas la muestras= 0.57%, el cual es menor al 2% por lo tanto el Método es preciso por reproducibilidad sin importar el día o el analista.

**-TOLERANCIA:**

Se analizó moxifloxacina HCl, materia prima por triplicado contra un estándar en 2 columnas y equipo diferentes por un analista en un mismo día.

La columna que se utilizó para realizar la validación es: Inertsil PHENOMENEX 5micras 250 mm x 4.0 mm No de serie: 1HS50032

La columna a probar fue: Inertsil PHENOMENEX 5 micras 250 mm x 4.6 mm  
No de serie: 7KS15023

Cromatógrafo de Líquidos marca: Waters                      Modelo: 2489                      Equipo: F157

Calibrado: FEB 12    Próx. Calibración: AGO 12

Cromatógrafo de Líquidos marca: Waters                      Modelo: 2487                      Equipo: F098

Calibrado: ABR 12    Próx. Calibración: OCT 12

	<b>INERTSIL PHENOMENEX 5 μ 250 mm x 4.0 mm</b>	<b>INERTSIL PHENOMENEX 5 μ 250 mm x 4.6 mm</b>	<b>HPLC F.157</b>	<b>HPLC F.098</b>
<b>% de recobro</b>	99.41	99.34	99.41	99.01
<b>CV</b>	0.69 %	0.39 %	0.69 %	0.66 %
<b> di =</b>	99.41% - 99.34% = 0.06%		99.41% - 99.01 % = 0.40%	

La diferencia absoluta entre las columnas y el equipo es menor 2% por lo tanto el Método es tolerante al cambio de columna y equipo.

**\*ROBUSTEZ:**

Se realizaron cambios sobre las condiciones de la técnica de análisis como se observa en la tabla, obteniéndose los siguientes resultados:

<b>Condición</b>	<b>Base</b>	<b>Alterada</b>	<b> di </b>
<b>Volumen de Inyección</b>	25μL 99.79 % -	15μL 99.90% =	0.11
	25μL 99.79 % -	35μL 99.84 % =	0.05
<b>Velocidad de Flujo</b>	0.9 mL/min 99.79 % -	0.8 mL/min 100.06 % =	0.27
	0.9 mL/min 99.79 % -	1.0 mL/min 99.98 % =	0.19
<b>% Fase Sol. Buffer:Metanol</b>	(72/28) 99.79 % -	(70:30) 100.11 % =	0.32
	(72:28) 99.79 % -	(74:26) 99.99 % =	0.20
<b>Temperatura</b>	45°C 99.79 % -	40°C 100.05 % =	0.25
	45°C 99.79 % -	50°C 100.11 % =	0.32

CRITERIO:  $|di| \leq 2 \%$

El cambio en el volumen de inyección, velocidad de flujo, proporción de fase, así como la temperatura no afecta significativamente en el análisis ya que la diferencia que se obtuvo es menor al 2%.

La diferencia absoluta de cada uno de los parámetros es menor 2% por lo tanto el Método es robusto.

#### **-PRUEBAS LÍMITE (Impurezas desconocidas):**

Se prepararon 5 concentraciones a partir de materia prima de moxifloxacina HCl, Lote 321204, a niveles de concentración de activo (0.04%, 0.08%, 0.1%, 0.16% y 0.20%), por dilución y por triplicado cada nivel partir de una solución stock de 0.001 mg/mL de moxifloxacina. Se prepararon 5 blancos obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

-Intervalo de la pendiente IC ( $\beta_1$ )= 195642.03 a 192601.56, el cual no contiene al cero.

-Se calculó el Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.999 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.985.

El Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.9999 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.9925.

El LC obtenido fue de 0.008  $\mu\text{g/mL}$  lo cual nos indica la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

LD obtenido fue de 0.003  $\mu\text{g/mL}$  lo cual nos indica la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto el Método es cuantificable y detectable para impurezas desconocidas a estas condiciones de estudio.

### **\*PRUEBAS LÍMITE (Impureza conocida):**

Se prepararon 5 concentraciones a partir de un estándar de Bay-Z, Lote 118-8-1, a niveles de concentración de la impureza de 0.04%, 0.08%, 0.1%, 0.16% y 0.20%, por dilución a partir de una solución stock de 0.001 mg/mL de moxifloxacina. Preparando por triplicado cada nivel. Se prepararon simultáneamente 5 blancos. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

-Intervalo de la pendiente IC ( $\beta_1$ )= 194973.40 a 190892.09, el cual no contiene al cero.

-Se calculó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.999 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.985.

- El Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.9998 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.9925.

El LC obtenido fue de 0.0105  $\mu\text{g/mL}$  lo cual nos indica la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

LD obtenido fue de 0.003  $\mu\text{g/mL}$  lo cual nos indica la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto el Método es cuantificable y detectable a estas condiciones de estudio.

### **\*ESPECIFICIDAD:**

Se realizaron pruebas de moxifloxacina HCl, materia prima, a partir de una solución stock de 5.01 mg/mL se tomó una alícuota de 2.0 mL en un matraz de 25 mL, se le dio el tratamiento correspondiente (ver tabla), posteriormente se llevó a volumen con solución buffer, se tomó una alícuota de 5.0 mL y se llevó a un volumen de 20 mL para llegar a la concentración de trabajo de moxifloxacina y se realizó el análisis bajo las condiciones de análisis que establece al método analítico.

Vía de Degradación	Condición de Análisis	Vol. adicionado de reactivo
Calor	4 h/80°C	NA
Básica (NaOH)	4 h/80°C	100 µL de NaOH al 50%
Ácida (HCl)	4 h/80°C	100 µL de HCl concentrado
Peróxido de hidrógeno	2 h/80°C	100 µL de peróxido 30%

El producto final y la solución estándar a las condiciones de degradación, no presentaron ningún pico de degradación o señal que interfiera con los picos de interés al tiempo de retención que estos eluyen. Por lo que se concluye que el método es específico para moxifloxacina en materia prima.

**\*ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:**

Se analizó moxifloxacina HCl, materia prima lote 321204, a una concentración teórica de 0.1 mg/mL; según el método. Se determinaron a los siguientes tiempos de análisis: Inicial, 24 h/temperatura ambiente y refrigeración, 48 h/temperatura ambiente y refrigeración, 72 h/ temperatura ambiente y refrigeración, obteniendo los siguientes resultados:

	24 h		48 h		72 h	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
Inicial	99.86	100.62	99.87	100.16	100.38	100.44
100.89%	Diferencia%		Diferencia %		Diferencia %	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	1.03	0.28	1.02	0.73	0.51	0.45

Por lo cual se establece que la muestra de moxifloxacin en soluci3n a la concentraci3n de trabajo es estable en un periodo de 72 h, almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente o en refrigeraci3n, para su an3lisis, puesto que la diferencia de recobro es menor a 2%.

## Capítulo VI. CONCLUSIONES

Se validó el método para cuantificar clorhidrato de moxifloxacin, materia prima, a la concentración de moxifloxacin base de 0.1 mg/mL por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, utilizando una columna Metachem Fenil Inertsil, 5  $\mu\text{m}$ , 4.0 x 250 mm a una velocidad de flujo de 0.9 mL/min, utilizando un detector UV a una longitud de onda de 295 nm y un volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$ .

Se obtuvieron los siguientes resultados:

El sistema es preciso por repetibilidad y lineal en el intervalo de concentraciones del 60-140 %, con respecto a la concentración de 0.1 mg/mL de moxifloxacin.

El método es preciso por repetibilidad y por reproducibilidad sin importar el día o el analista; es lineal en un intervalo de concentraciones del 80-120 %; es tolerante al cambio de diámetro de columna de 4.0 a 4.6 mm y del equipo F157 al F098; es robusto para cambio en el volumen de inyección, velocidad de flujo, proporción de fase, así como la temperatura en las condiciones analizadas.

Ningún pico interfiere en la cuantificación de moxifloxacin al haber sido sometida la muestra a degradación ácida, básica, calor y oxidación, por lo cual el método es específico para moxifloxacin en materia prima.

En cuanto a estabilidad de la muestra se obtuvo que es estable en un periodo de 72 h almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente o en refrigeración.

También se determinaron el límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) para la impureza conocida (Bay-Z) siendo el LC 0.0105  $\mu\text{g/mL}$  y el LD 0.003  $\mu\text{g/mL}$  y para impurezas desconocidas el LC es 0.008  $\mu\text{g/mL}$  y el LD es 0.003  $\mu\text{g/mL}$ .

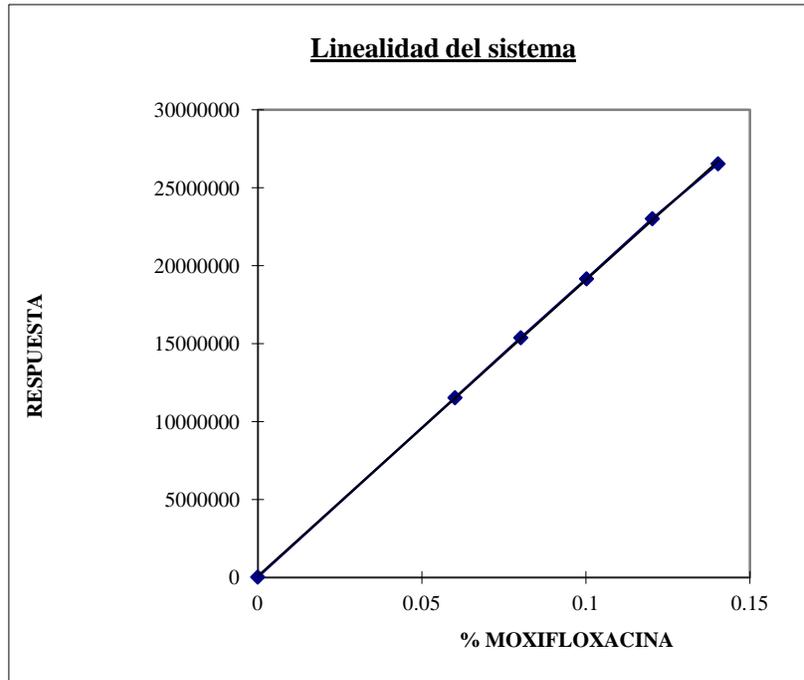
El método analítico queda validado cumpliéndose con los parámetros y criterios establecidos en el Protocolo Específico de Validación y con los lineamientos establecidos en la "Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB's", por lo cual es adecuado para su utilización en el Laboratorio de Control Fisicoquímico de Alcon México.

## BIBLIOGRAFÍA

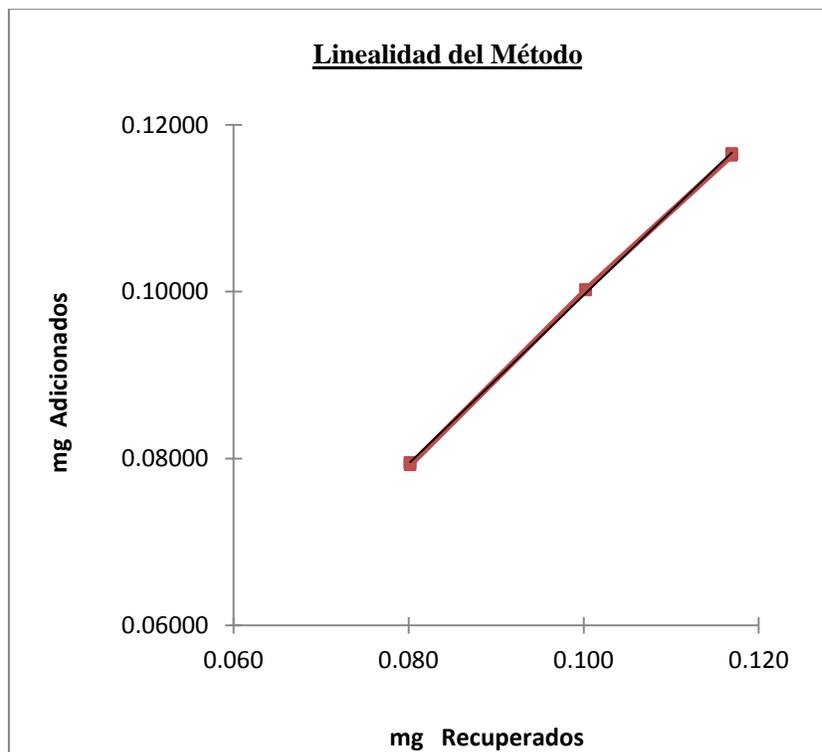
1. Cagle, Gerald; Abshire, Robert, L.; Stroman, David, W. y Yanni, John, M. Composiciones antibióticas para el tratamiento de los ojos. Publicación de la patente 16.05.2004 [http://www.espatentes.com/pdf/2207307\\_t3.pdf](http://www.espatentes.com/pdf/2207307_t3.pdf) [15]
2. Calvo Jorge, Martínez Luis. Mecanismos de acción de los antimicrobianos pág. 51 (6)
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. Edición 2002. [1]
4. Diseño y análisis de experimentos, Montgomery D. C. Grupo editorial Iberoamericana 3ª ed. México, 1991.
5. Djurdjevic Predrac. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. 4
6. Fátima Varanda, † María J. Pratas de Melo. Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1 Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin and Ciprofloxacin. American Chemical Society, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2006, 45 (18), pp 6368–6374
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10ª Ed. México, 2011.
8. Harris, D. C. – “Análisis químico cuantitativo”. Ed. Reverte, S. A. Barcelona. 2001.
9. Hernández, L. y González, C. – “Introducción al análisis instrumental”. Ed. Ariel Ciencia. 2002.[12]
10. ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Methods: Definitions and Technology 1995. ICH Topic Q2A (CPMP/ICH/381/95). London, UK: ICH. [2]
11. Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, J., González, G., Bello, H., Domínguez, M. y Zemelman, R. *Rev. Chilena de Infectol.* 17:53-66, 2000. Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación.
12. Meyer R. Veonika. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Edit Wiley. N.Y. 1988. [10]
13. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
14. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de medicamentos.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
16. Published by Elsevier Ltd. Moxifloxacin. *Tuberculosis* 2008 88(2) 127-131. [8]
17. Rouessac Francis y Rouessac Annick. *Análisis Químico, métodos y técnicas instrumentales modernas*. Edit. Mc Graw-Hill, España 2003. Pág. 38,39,50-53.[9]
18. Schlech Barry A. and Blondeau Joseph. Future of ophthalmic Anti-infective Therapy and the role of moxifloxacin Ophthalmic solution 0.5 % (VIGAMOX®). (7)

19. Settle A. Frank. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice-Hall, Estados Unidos, 1997. Pág. 152-158. [14]
20. *Sierra Alonso Isabel*. Análisis instrumental. Edit. Gesbiblo. S.L. España, 2010 [3]
21. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. – “Química analítica”. Ed. Mc Graw Hill. 7ª edición. 2001.
22. Valcárcel Cases A. y Gómez Hens. Técnicas analíticas de separación. [11]
23. Wong C. A. et al. Susceptibilidad antibiotica in vitro fluoroquinolonas (5)
24. Martínez Roca Leandro. Tratamiento integrado. Oftalmología y otorrinolaringología. Fundación Europea de MTC. 1ª edición, 2012.
25. Garg Ashok. Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Edit. Médica Panamericana , Argentina, 2010.
26. Bengoa González Álvaro. Atlas urgencias en oftalmología. Vol 1. Edit. Glosa. España, 2001.
27. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf) consultado 12/03/2013 15:20 h.

## ANEXO 1



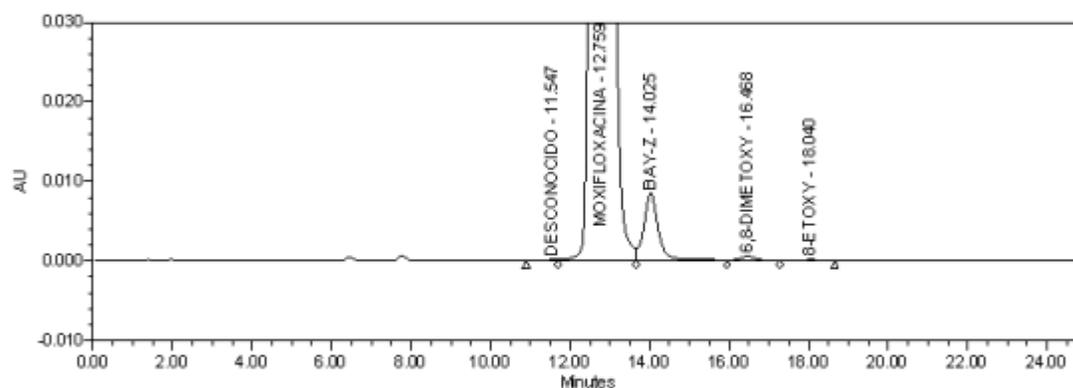
## ANEXO 2



### ANEXO 3. Cromatogramas de especificidad.

#### Cromatograma 1. Muestra sin tratamiento

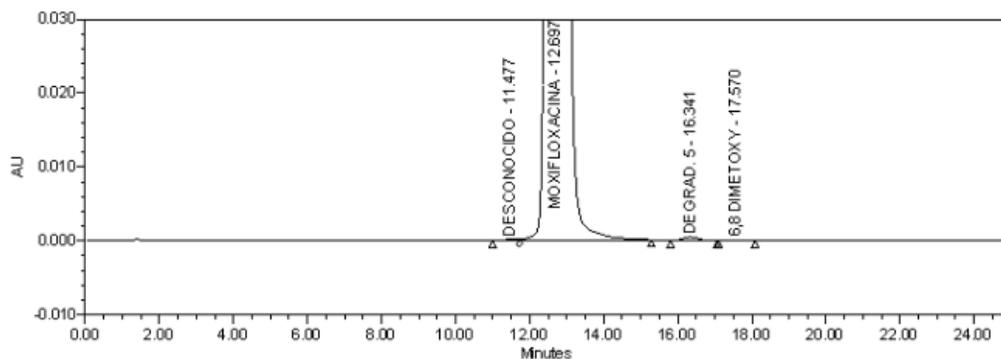
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	RESOLUCIÓN	Acquired By:	Claudia
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	7/24/2012 10:32:54 AM CDT
Vial:	3	Acq. Method Set:	MOX189
Injection #:	1	Date Processed:	7/25/2012 9:03:50 AM CDT
Injection Volume:	25.00 ul	Processing Method:	IMPUREZASMOXI
Run Time:	25.0 Minutes	Channel Name:	W2489 ChA
Sample Set Name:	ESPECIFICIDAD	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA.295nm



ADECUAB ESPECIF ST

	Name	SampleName	Area (μV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	DESCONOCIDO	RESOLUCIÓN	3437			
2	MOXIFLOXACINA	RESOLUCIÓN	19481774	9758.333077	1.114	
3	BAY-Z	RESOLUCIÓN	223758	8366.212459		2.161
4	6,8-DIMETOXY	RESOLUCIÓN	18128	7465.659724		3.383
5	8-ETOXY	RESOLUCIÓN	5160	8240.823544		1.838
6	6-METOXY	RESOLUCIÓN				

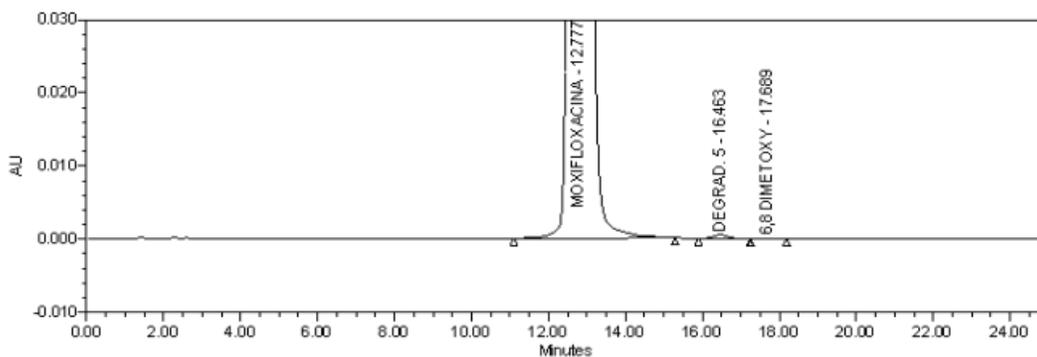
## Cromatograma 2. Muestra con degradación de calor 4 h/ 80°C



CALOR 4HRS/80°C

	Name	SampleName	Area (µV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	DEGRAD.1	STD CALOR				
2	DEGRAD. 2	STD CALOR				
3	DEGRAD.3	STD CALOR				
4	DEGRAD. 4	STD CALOR				
5	DESCONOCIDO	STD CALOR	3328			
6	MOXIFLOXACINA	STD CALOR	19696355	9434.183029	1.127	
7	DEGRAD. 5	STD CALOR	13822	7979.766634	1.160	5.710
8	6,8 DIMETOXY	STD CALOR	2548	10747.533581	1.126	1.739

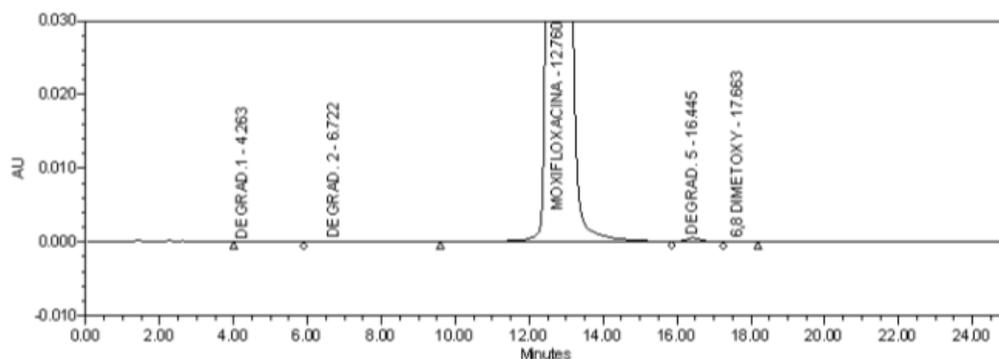
## Cromatograma 3. Muestra con degradación básica (NaOH 50%)



DEGRADACIÓN CON NaOH al 50% 4HRS/80°C

	Name	SampleName	Area (µV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	DEGRAD.1	STD NaOH				
2	DEGRAD. 2	STD NaOH				
3	DEGRAD.3	STD NaOH				
4	DEGRAD. 4	STD NaOH				
5	DESCONOCIDO	STD NaOH				
6	MOXIFLOXACINA	STD NaOH	19549274	9643.194940	1.126	
7	DEGRAD. 5	STD NaOH	13884	7965.817195	1.227	5.742
8	6,8 DIMETOXY	STD NaOH	2410	11675.143904	1.158	1.758

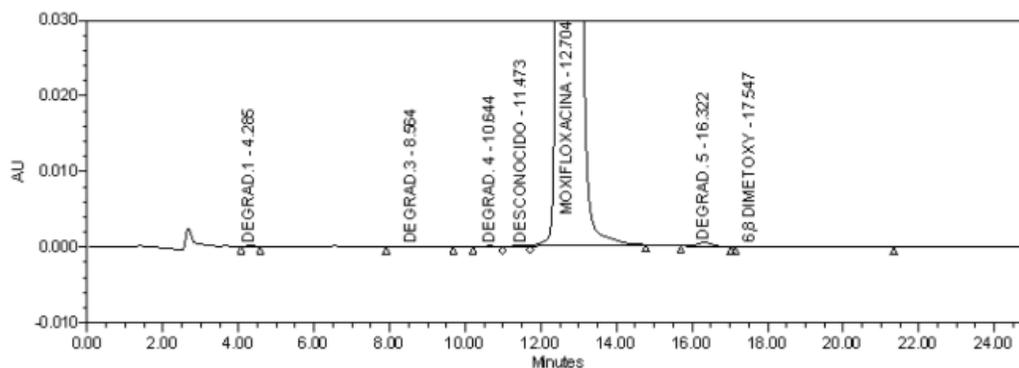
### Cromatograma 4. Muestra con degradación ácida (HCl conc.)



DEGRADACIÓN CON HCl Conc. 4HRS/80°C

	Name	SampleName	Area (μV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	DEGRAD.1	STD HCl	3694	2589.687410		
2	DEGRAD. 2	STD HCl	4852	3815.827197		2.455
3	DEGRAD.3	STD HCl				
4	DEGRAD. 4	STD HCl				
5	DESCONOCIDO	STD HCl				
6	MOXIFLOXACINA	STD HCl	19692337	9499.473681	1.134	11.746
7	DEGRAD. 5	STD HCl	17716	6682.598754		5.410
8	6,8 DIMETOXY	STD HCl	2928	10704.791479		1.594

### Cromatograma 5. Muestra con degradación de peróxido de hidrógeno 30%



DEGRADACIÓN CON PERÓXIDO 2 HRS/80°C

	Name	SampleName	Area (μV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	DEGRAD.1	STD PEROXIDO	1512	2233.666131	1.115	
2	DEGRAD. 2	STD PEROXIDO				
3	DEGRAD.3	STD PEROXIDO	5314	1101.988011	1.318	6.137
4	DEGRAD. 4	STD PEROXIDO	2043	6549.708448		2.617
5	DESCONOCIDO	STD PEROXIDO	2838			1.509
6	MOXIFLOXACINA	STD PEROXIDO	19393193	9704.121164	1.127	2.284
7	DEGRAD. 5	STD PEROXIDO	13243	7887.906569	1.141	5.667
8	6,8 DIMETOXY	STD PEROXIDO	4921	10495.219518	5.458	1.673

## ANEXO 4

### GLOSARIO DE TÉRMINOS MÉDICOS.

**Blefaritis:** es un trastorno frecuente de los párpados que condiciona un engrosamiento palpebral (línea característica de los párpados) y obstrucción de las glándulas de Meibomio

**Conjuntivitis:** es la inflamación de la conjuntiva; que es una delgada membrana que recubre el párpado por dentro, conjuntiva palpebral, y parte del globo ocular, conjuntiva bulbar. Presenta manifestaciones como enrojecimiento, fotofobia y lagrimeo. Pueden ser de origen bacteriano, vírico, alérgico, por cuerpos extraños o traumas.

**Dacriocistitis:** Infección del saco lagrimal que puede desencadenar una obstrucción del conducto nasolagrimal.

**Orzuelo:** Inflamación palpebral debida a una infección bacteriana, generalmente estafilocócica de una glándula del párpado. Suele palparse un nódulo doloroso, puede observarse la presencia de material purulento en la zona inflamada.

**Queratitis:** es una afección inflamatoria de la córnea que puede ser de etiología infecciosa o no infecciosa.

**Úlceras corneales:** es una erosión o úlcera abierta en la capa externa de la córnea que es un tejido claro (transparente) de la parte frontal del ojo. Con frecuencia causada por infección.