



VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS POR HPLC- DAD DEL PRINCIPIO ACTIVO Y SUS SUSTANCIAS RELACIONADAS DE UN PRODUCTO FARMACÉUTICO

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Cromatográficas Aplicadas

Jennifer Lozano Castro

Dirigido por

la tutora en la empresa: Dra. Margarita Hernández

la tutora académica: Dra. Eva Pocurull Aixala

Realizado en



Tarragona

2022

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. OBJETIVOS	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. EMPRESA	3
2.2. PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	3
2.3. PRODUCTO FARMACÉUTICO DE ESTUDIO	4
2.4. LEGISLACIÓN PARA PRODUCTOS FARMACÉUTICOS VETERINARIOS	5
3. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	7
3.1. DEFINICIÓN	7
3.2. DOCUMENTACIÓN.....	7
3.3. FASES DEL DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN	8
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
4.1. CONDICIONES ANALÍTICAS	19
4.2. PRUEBAS PREVIAS	22
4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. PRUEBAS PREVIAS	27
5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
6. CONCLUSIONES	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43
A. ANEXOS	45
A1. DOXICICLINA HICLATO Y SUS SUSTANCIAS RELACIONADAS	45
A2. CALENDARIO	47
A3. CROMATOGRAMAS.....	48

1. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- La validación del método de análisis de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.
- La validación del método de análisis de las impurezas y/o sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Empresa

S.P.[®]Veterinaria es un laboratorio farmacéutico localizado en Riudoms (Tarragona) dedicado a desarrollar, fabricar y comercializar productos de uso veterinario y ganadero con el propósito de prevenir y tratar enfermedades en un amplio abanico de especies animales. Esta empresa desarrolla su actividad industrial desde hace más de cincuenta años, exporta sus productos a más de cuarenta países y produce una extensa gama de fármacos, dietéticos y desinfectantes, entre otros. Además, S.P.[®]Veterinaria está autorizada por la Agencia Española del Medicamento y está certificada bajo las Normas de Correcta Fabricación (GMPs) con las que asegura la calidad de sus productos.

Este trabajo se ha realizado en el subdepartamento de Desarrollo Analítico del departamento de Cromatografía, que es uno de los departamentos que constituyen el departamento de Control de Calidad. Entre las actividades que se realizan en Desarrollo Analítico se encuentra la validación de métodos analíticos, la validación de procesos y la transferencia de métodos entre diferentes laboratorios.¹

2.2. Productos farmacéuticos

Un producto farmacéutico o medicamento es una combinación de sustancias que, al administrarse a humanos o animales, ejerce una acción farmacológica, inmunológica o metabólica en el organismo restaurando o corrigiendo funciones fisiológicas concretas, lo que permite prevenir o tratar enfermedades. Las sustancias de las que se componen los productos farmacéuticos son, principalmente, el principio activo, los excipientes y las impurezas.²

2.2.1. Principio activo

Los principios activos son sustancias que interactúan activamente con el organismo y producen el efecto objetivo del medicamento.²

2.2.2. Excipientes

Los excipientes son sustancias inertes en el organismo que se mezclan con el o los principios activos para conformar medicamentos. La función de los excipientes es facilitar su administración. Los excipientes se usan como conservantes, saborizantes, diluyentes y agentes de recubrimiento, entre muchos otros.³

2.2.3. Impurezas y sustancias relacionadas

Las impurezas y sustancias relacionadas son sustancias que no forman parte de la fórmula del producto. Aunque su presencia en él no es deliberada, es habitual encontrar en el producto farmacéutico impurezas generadas en el proceso de fabricación y productos de degradación del principio activo a bajas concentraciones.²

2.3. Producto farmacéutico de estudio

El producto farmacéutico de estudio *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* se comercializa como un polvo de administración oral con una concentración de doxiciclina de 100g/Kg y se usa en el tratamiento de diferentes enfermedades causadas por bacterias en aves y cerdos de engorde, como infecciones del tracto respiratorio y digestivo.¹

2.3.1. Principio activo

El principio activo es la doxiciclina hiclato, que es un polvo amarillo, cristalino, soluble en agua y metanol y sensible a la luz y la humedad.⁴ Su estructura molecular se muestra en la *Figura 9 (Anexo AI)*. La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático del grupo de las tetraciclinas y posee actividad contra un amplio espectro de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como contra algunos protozoos. El mecanismo de acción de la doxiciclina consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas impidiendo la unión del ARN de transferencia con el ribosoma de la bacteria.⁵

2.3.2. Excipientes

Los excipientes presentes en el producto farmacéutico fueron incluidos en la fórmula por su función como agentes aglutinantes, diluyentes, saborizantes, reguladores de pH y lubricantes.³

2.3.3. Impurezas y/o sustancias relacionadas

Las sustancias relacionadas de la doxiciclina son las impurezas específicas A, B, C y F (*Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 15*, respectivamente), tal y como se expone en la monografía de la doxiciclina hclato de la Farmacopea Europea.⁶ La estructura y nombre de estas impurezas específicas, junto con los de las impurezas detectables E y D (*Figura 13 y Figura 14*, respectivamente), se encuentran el [Anexo A1](#).

2.4. Legislación para productos farmacéuticos veterinarios

*El Reglamento (UE) 2019/6 sobre medicamentos veterinarios*⁷ constituye el marco regulador de la Unión Europea para la introducción en el mercado, fabricación, importación, exportación, suministro, distribución, farmacovigilancia, control y uso de los medicamentos veterinarios por el que se rigen todos los fabricantes y distribuidores de productos farmacéuticos veterinarios en España. Dado que este es un reglamento extenso que abarca un gran número de aspectos a considerar sobre la industria farmacéutica veterinaria, a continuación, se exponen los puntos más relevantes para este trabajo:

- Los medicamentos veterinarios deben pasar por un control de calidad basado en las monografías de la Farmacopea Europea. La Farmacopea es un texto oficial en el que se exponen las especificaciones que deben cumplir los medicamentos para garantizar la calidad de los medicamentos. En España, el *Real Decreto 294/2001*⁸ regula la Real Farmacopea Española, que contiene 1126 monografías de la Farmacopea Europea y dos monografías propias del país.⁹
- La *Directiva 91/412/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo*¹⁰ establece los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación (GMPs) de los medicamentos veterinarios que deben aplicarse y los requerimientos de un Estado para legislar sobre ellos. Algunos de los puntos más imperativos de esta Directiva son la necesidad del fabricante de establecer un sistema de garantía de calidad y la aplicación de las GMPs a control de calidad, documentación, personal y

equipos, entre otros. En España, el *Real Decreto 824/2010*¹¹ regula los laboratorios farmacéuticos, los fabricantes de principios activos de uso farmacéutico y el comercio exterior de medicamentos y medicamentos en investigación en cuanto a la aplicación de las GMPs.

- La *Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo*¹² establece los requerimientos necesarios para la aplicación de las prácticas correctas de laboratorio (GLPs) como sistema de calidad en el análisis de sustancias químicas como los productos farmacéuticos para confirmar su inocuidad, seguridad y calidad. En España, el *Real Decreto 1369/2000*¹³ regula la aplicación de los principios de las GLPs.

La Agencia Europea de Medicamentos dispone de la monografía ICH Q2(R2)¹⁴ de desarrollo y validación de procedimientos analíticos. Estas han sido redactadas y aprobadas en armonía con las especificaciones y requerimientos legales expuestos en este apartado.

A partir de estas monografías, otras fuentes bibliográficas y en sintonía con el *Reglamento (UE) 2019/6 sobre medicamentos veterinarios*⁷ y todos sus requerimientos legales, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) ha elaborado una monografía de validación de métodos analíticos.¹⁵ S.P.®Veterinaria se basa en los contenidos de esta monografía para el desarrollo de sus validaciones de método y, por lo tanto, este trabajo también.

3. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

3.1. Definición

Validar un método analítico implica verificar mediante evidencias documentales que un procedimiento analítico ya ajustado, aplicando las condiciones de análisis que establece, permite obtener resultados esperados, precisos y exactos en el análisis de muestras concretas (por ejemplo, para un producto farmacéutico) permitiendo al laboratorio que valida el método minimizar errores y costes y cumplir con las especificaciones del producto, los requerimientos de calidad y las exigencias legales establecidas.

Aunque hay diferentes tipos de métodos a validar, este trabajo se centra en ensayos de identificación y determinación del analito de interés (en este caso doxiciclina) en una especialidad farmacéutica, así como la determinación y cuantificación de las sustancias relacionadas de la doxiciclina.

Para validar un método analítico es necesario conocer el analito y contar con un producto farmacéutico con fórmula definitiva y con un analista conocedor del método analítico.¹⁵

3.2. Documentación

Toda validación requiere la redacción de una serie de documentos que recojan la información de partida y la generada con el objetivo de crear registros documentales que prueben que el planteamiento de los ensayos es el adecuado y las conclusiones derivadas de los resultados son veraces, como el protocolo y el informe de la validación.¹⁵

3.2.1. Protocolo

En el protocolo se deben plasmar todas las características del método analítico previamente optimizado. La información mínima que debe contener el protocolo es:

- Fórmula del producto farmacéutico a validar.
- Procedimiento de preparativa de patrones y muestras.
- Muestras primarias con las que llevar a cabo los ensayos de la validación.
- Parámetros sujetos a estudio y sus ensayos.
- Condiciones cromatográficas.
- Criterios de aceptación de resultados.
- Reactivos, materiales y equipos necesarios.
- Fichas técnicas de los equipos y otros documentos relacionados.

Además, se deben incluir puntos como las responsabilidades, los objetivos y el alcance del protocolo.

En S.P.[®] Veterinaria los subdepartamentos de control de calidad y desarrollo analítico en el departamento de cromatografía comparten instrumentos, materiales y recursos, por lo que la coordinación entre compañeros y departamentos para el uso de los cromatógrafos es esencial. Por eso, durante la redacción de los protocolos se planificaron los ensayos necesarios para validación en función de la duración de las secuencias y la disponibilidad de equipos. En [Anexo A2](#) se muestra la planificación propuesta para realizar las validaciones durante la estancia del trabajo de fin de máster.¹⁵

3.2.2. Informe

En el informe debe estar referenciado el protocolo y los procedimientos normalizados de trabajo de los instrumentos usados. También se deben incluir los datos primarios de los ensayos de la validación, los cálculos y test estadísticos realizados, los resultados obtenidos y las conclusiones extraídas. Este informe debe ser firmado por todas las personas responsables y archivado junto con el resto de documentación de la validación.¹⁵

3.3. Fases del desarrollo de la validación

3.3.1. Características de practicabilidad

El primer paso en una validación es determinar qué recursos son necesarios y si se dispone de ellos, como por ejemplo personal, material, equipos, presupuesto y condiciones de seguridad. Además, es importante fijar los criterios con los que se evaluarán los parámetros estudiados, como la precisión, la selectividad o la sensibilidad esperada.¹⁵

3.3.2. Estudios de estabilidad

Dado que el equipo cromatográfico que se usará dispone de inyector automático, es necesario conocer la estabilidad en disolución de las muestras y los patrones para saber si se pueden programar secuencias de inyección de larga duración o, por el contrario, es necesario realizar la preparativa de las muestras y patrones inmediatamente antes de cada inyección.

En este trabajo, este estudio se realizará a lo largo de 24 horas:

- Para confirmar la estabilidad del patrón 24 horas después de su preparación se debe calcular el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas al analizar la misma preparativa de patrón a tiempo 0, 4, 8, 12 y 24 horas tras su preparación.
- Para confirmar la estabilidad de las muestras 24 horas después de su preparación se debe calcular el coeficiente de variación de las concentraciones de analito obtenidas al analizar la misma preparativa de muestras a tiempo 0, 4, 8, 12 y 24 horas tras su preparación.

Además, en el estudio de la estabilidad de la muestra a concentraciones bajas también se cuantificarán y se calculará el coeficiente de variación de las sustancias relacionadas. Para confirmar la estabilidad de patrón y las muestras, los coeficientes de variación obtenidos no deberán superar el 2%.

3.3.3. Características de idoneidad

En esta etapa se recomienda hacer un estudio de robustez previo a la validación del método para observar la criticidad de los valores de cada parámetro del método. Aunque la AEFI¹⁵ indica que estos estudios no forman estrictamente parte de la validación, ambos estudios, junto con los estudios de estabilidad, se realizarán como parte de las pruebas previas, pero se repetirán durante las validaciones y sus resultados constarán en los informes correspondientes a ambas validaciones del método junto con el resto de los resultados propios de cada validación.

3.3.3.1. Robustez

En este trabajo, los parámetros a estudiar son el flujo (± 0.1 ml/min) y el pH de las soluciones A y B que conforman la fase móvil (± 0.2).

Dado que se requiere evaluar la influencia de sólo tres factores (flujo, pH de la solución A y pH de la solución B), el diseño factorial completo de ocho experimentos se considera el más adecuado para evaluar la robustez. La matriz del análisis factorial completo permite estudiar la influencia de los tres factores y sus interacciones. En la *Tabla 1* se

muestra la combinación de desviaciones de los valores nominales de cada condición para cada experimento.

Tabla 1. Diseño factorial completo de ocho experimentos

Experimento	Factores		
	A (pH Solución A)	B (pH solución B)	C (Flujo)
E1	-	-	-
E2	+	-	-
E3	-	+	-
E4	+	+	-
E5	-	-	+
E6	+	-	+
E7	-	+	+
E8	+	+	+

Para realizar la evaluación estadística se debe calcular la influencia de los factores de forma individual mediante la *Expresión 1*. Se considera que un factor es influyente cuando su porcentaje de influencia sea igual o mayor al 2%.

$$\text{Influencia del factor X} = \frac{1}{4} \cdot \sum E(+)-E(-) \quad \text{Expresión 1}$$

3.3.3.2. Test de idoneidad del sistema

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar que el sistema (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Se deben definir las características de idoneidad del sistema y evaluarlas según los criterios de aceptación fijados para cada una, que en este caso son:

- El factor de capacidad (k') ≥ 1 (*Expresión 2*)
- Numero de platos teóricos (N) ≥ 2000 (*Expresión 3*)
- Factor de asimetría 0.8 – 2.0 (*Expresión 4*)
- Repetibilidad instrumental CV (%) $\leq 2.0\%$ (*Expresión 5*).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Expresión 2}$$

$$N = 16 \cdot \left(\frac{R_1}{W}\right)^2 \quad \text{Expresión 3}$$

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F} \quad \text{Expresión 4}$$

$$CV(\%) = \frac{S_f}{\bar{f}}$$

Expresión 5

La característica de repetibilidad instrumental se debe a que se considera adecuado realizar entre cinco y seis inyecciones simultáneas del patrón de System Suitability.

Por último, es necesario realizar tres inyecciones del patrón System Suitability en cada análisis para confirmar la idoneidad del sistema a lo largo de la validación.¹⁵

3.3.4. Características de fiabilidad

Las características de fiabilidad de un método analítico demuestran que este es capaz de mantener los cinco criterios fundamentales de la validación. De estos criterios se derivan todos los parámetros del método que serán evaluados durante la validación del método.

Los parámetros a evaluar dependen del tipo de ensayo que se realice. En la *Tabla 2* se observa que, para la determinación de la doxiciclina y de sus impurezas, se deberá evaluar la exactitud, linealidad, rango, precisión y selectividad y, además, también los límites de detección y cuantificación en el caso de la validación de impurezas.¹⁵

Tabla 2. Parámetros de validación a evaluar según el ensayo a realizar¹⁴.

Parámetros de validación	Tipos de aplicaciones analíticas			
	Ensayo de identificación	Ensayo de cuantificación de impurezas	Ensayo de límite de impurezas	Ensayo para cuantificar el analito de una especialidad farmacéutica
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Linealidad	No	Si	No	Si
Rango	No	Si	No	Si

A continuación, se definen cada uno de los parámetros y se exponen los ensayos a realizar y test estadísticos a aplicar que sugiere la AEFI para evaluar cada parámetro.

3.3.4.1. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir e identificar los analitos de forma inequívoca incluso en presencia de otras sustancias químicas como impurezas, productos de degradación o excipientes. Esto se debe a que estas impurezas y excipientes pueden llegar a interferir en la señal cromatográfica del analito dificultando su identificación o distorsionando su respuesta analítica.

Los requerimientos para considerar selectivo un método varían según la técnica analítica aplicada y el objetivo del ensayo. Dado que en este trabajo se busca determinar un principio activo cuantitativamente, los excipientes, las impurezas y los productos de degradación no pueden interferir en la respuesta del principio activo. Además, al ser un ensayo separativo, se debe aplicar una técnica complementaria para confirmar de la ausencia de interferencias. En este caso, se aplica la cromatografía de alta resolución acoplada a un detector de diodos (HPLC-DAD), que permite comprobar la pureza del pico del analito a partir de su espectro (o espectros, en caso de darse coelución de dos picos cromatográficos).¹⁵

La aproximación escogida en cuanto al procedimiento requiere que las posibles interferencias se encuentren identificadas y disponibles de forma aislada, pero este requisito no es necesario ya que en la monografía de Farmacopea de la doxiciclina hiclato⁶ las sustancias relacionadas se encuentran identificadas y se proporcionan sus tiempos de retención relativos al tiempo de retención de la doxiciclina. Además, dado que las sustancias relacionadas de la doxiciclina no se comercializan de forma aislada, éstas se cuantificarán mediante la elaboración de una recta de calibrado de doxiciclina hiclato a bajas concentraciones.

Por lo tanto, para la evaluación de la selectividad para el producto farmacéutico se deben analizar muestras solo con diluyente de muestra, solo con el analito (A), solo con la matriz (compuesta por el conjunto de excipientes) (M) y con el analito y la matriz (MA). Además, para la evaluación de la selectividad para las sustancias relacionadas se deben analizar muestras con la matriz y el analito a concentraciones bajas (MI).

Los criterios de aceptación de los resultados son los siguientes:

- La respuesta obtenida por la muestra matriz y el blanco no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con el pico del analito de interés, es decir, que aparezca en el tiempo de retención en el que aparece el analito de interés.
- Se debe demostrar que el pico correspondiente al analito de interés es cromatográficamente puro.
- En caso de existir alguna interferencia de la matriz y/o blanco, se debe calcular el grado de discrepancia, y este debe ser menor de 4.0%. Se calcula aplicando la *Expresión 6*.¹⁵

$$\% \text{ de discrepancia} = \frac{D_i - D_s}{D_s} \times 100 \quad \text{Expresión 6}$$

D_i = respuesta media de la interferencia en la matriz, blanco y/o fase móvil.

D_s = respuesta media del analito en la muestra con analito y matriz.

3.3.4.2. Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad del método para dar resultados proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango, previamente establecido, que es el intervalo entre la concentración máxima y mínima en la que el método es preciso, exacto y lineal.

Para la validación del método de análisis del principio activo, las ICH¹⁴ recomiendan evaluar la linealidad en un rango de 80% a 120% del contenido del principio activo.

En cambio, para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas se recomienda evaluar un rango que vaya desde el 50% del valor de la especificación de la impureza con el límite más restrictivo (establecido como límite de cuantificación), que en este caso es un 0.1% de concentración en relación con el contenido de principio activo, al 120% del valor de la especificación de la impureza con el límite menos restrictivo, que en este caso es un 2% de concentración en relación con el contenido de principio activo. Por lo tanto, en este caso, el rango evaluado irá de 0.05% a 2.4% de concentración en relación con el contenido de principio activo (10% en peso).

Para ambos casos, se deben estudiar al menos cinco niveles de concentración analizando por triplicado muestras preparadas con pesadas independientes. Teniendo en cuenta estos datos, los niveles de concentración escogidos para evaluar la linealidad son los mostrados en la *Tabla 3*.¹⁵

Tabla 3. Niveles de concentración de las muestras en la evaluación de la linealidad y el rango.

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Principio activo	80%	90%	100%	110%	120%
Sustancias relacionadas	0.05%	0.2%	1%	2%	2.4%

Los cálculos y test estadísticos sugeridos para la evaluación de la linealidad y el rango y sus criterios de aceptación son los siguientes:

Ecuación de la recta: Se debe construir una recta de regresión de la respuesta obtenida para cada muestra en función de su concentración (%). Se obtiene la pendiente y la ordenada al origen. La recta de regresión tiene la estructura de la *Expresión 7*.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x \quad \text{Expresión 7}$$

Coefficiente de correlación (r): El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la concentración y la respuesta. Si r cumple con los criterios de aceptación, $r \geq 0,999$ para el principio activo y $r \geq 0,99$ para sustancias relacionadas, será indicativo de que existe correlación lineal entre las variables. Se calcula aplicando la *Expresión 8*.

$$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad \text{Expresión 8}$$

Variación residual constante: La representación de los residuales e_i frente los valores estimados debe resultar en una distribución de los puntos aleatoria y sin tendencias para afirmar que existe homocedasticidad.

Análisis de la variancia (ANOVA): Para realizar una ANOVA, se debe confirmar la homogeneidad de las variancias y la normalidad de los residuales. La homogeneidad de las variancias se puede comprobar con un test de Cochran aplicando la *Expresión 9*. Si la G_{exp} es inferior a G_{tab} se confirma que las variancias son homogéneas y que existe heterocedasticidad. La normalidad de los residuales se puede comprobar aplicando una prueba de normalidad. Para ello se utilizará el programa estadístico Minitab.

$$G_{exp} = \frac{s_{\text{máxima}}^2}{\sum s_i^2} \quad \text{Expresión 9}$$

A continuación, se realiza el cálculo de los estadísticos F_1 y F_2 mediante las expresiones mostradas en la *Tabla 4*. Si F_{1exp} es superior a F_{1tab} , se demuestra que la pendiente es significativamente diferente a cero. Si F_{2exp} es inferior a F_{2tab} , se demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Tabla 4. Fórmulas ANOVA.¹⁵

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Variancia (V)	F
Regresión	$SC_{REG} = \sum_i n_i \cdot (\hat{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2$	1	$V_{REG} = \frac{SC_{REG}}{gl_{REG}}$	$F_1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$
Residuales	$SC_{RES} = SC_{FA} + SC_{EXP}$	$\sum_i n_i - 2$	$V_{RES} = \frac{SC_{RES}}{gl_{RES}}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}}$
Falta de ajuste	$SC_{FA} = \sum_i n_i \cdot (\bar{y} - \hat{y}_i)^2$	$k - 2$	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{gl_{FA}}$	
Error experimental	$SC_{EXP} = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i n_i - k$	$V_{EXP} = \frac{SC_{EXP}}{gl_{EXP}}$	
Total	$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$	$\sum_i n_i - 1$		

Test de linealidad: Para verificar la linealidad se puede calcular el coeficiente de variación (*Expresión 10*) de las recuperaciones obtenidas para cada muestra y confirmar que este no es superior al 2% para principio activo y 3.5% para sustancias relacionadas, o comprobar si la pendiente es significativamente distinta de cero mediante una prueba t de Student (*Expresión 11*).

$$CV(\%) = \frac{S_f}{\bar{f}} \quad \text{Expresión 10}$$

$$t_{exp} = \frac{b_1}{s_{x,y}^2} \quad \text{Expresión 11}$$

Test de proporcionalidad: Permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas, es decir, si este es igual a 0, realizando un test t de Student aplicando la *Expresión 11* para el origen de coordenadas.

3.3.4.3. Precisión

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de resultados obtenidos analizando el mismo tipo de muestra con las mismas condiciones, es decir, la capacidad del método de proporcionar resultados cercanos entre sí. Evaluando la precisión se puede conocer la variabilidad del método, que puede deberse a factores como el analista, el equipo instrumental, los reactivos o el tiempo. En este trabajo no se estudia la reproducibilidad, pero sí la precisión intermedia y la repetibilidad.

Repetibilidad: La repetibilidad evalúa la variabilidad del método analizando las mismas muestras bajo las mismas condiciones y en un período corto de tiempo. Para estudiar la repetibilidad es necesario evaluar dos parámetros distintos; la repetibilidad del sistema instrumental, que estudia la variabilidad debida al instrumento y, la repetibilidad del método, que estudia la variabilidad debida a las características del método.

Para evaluar la repetibilidad instrumental se deben analizar:

- Una muestra a concentración nominal del principio activo inyectada seis veces consecutivas para la validación del método de análisis del principio activo.
- Una muestra a la concentración del valor límite para la impureza menos restrictiva inyectada seis veces consecutivas para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas.

La concentración de estas muestras debe ser del 100% y del 2% de concentración de analito frente a la concentración nominal de principio activo, respectivamente.

Para evaluar la repetibilidad del método se debe analizar:

- Seis muestras a concentración nominal del principio activo para la validación del método de análisis del principio activo.
- Seis muestras a la concentración del valor límite para la impureza menos restrictiva para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas.

La concentración de estas muestras debe ser del 100% y del 2% de concentración de analito frente a la concentración nominal de principio activo, respectivamente.

Para cada análisis se debe calcular la recuperación de cada muestra, la recuperación promedio y el coeficiente de variación entre muestras. Siempre que el coeficiente de variación para cada análisis sea igual o inferior al establecido como criterio de aceptación (*Tabla 3*), se podrá confirmar la repetibilidad instrumental y/o del método.

Precisión intermedia: La precisión intermedia evalúa la variabilidad del método analizando las mismas muestras variando el día de análisis, analista e instrumento. Debido a las necesidades concretas de la empresa y a la experiencia previa que sugiere que existe precisión intermedia entre los analistas y los instrumentos actuales, en este trabajo sólo se planea variar el día de análisis.

Para evaluar la precisión intermedia se debe analizar:

- Tres muestras a concentración nominal del principio activo en tres días diferentes para la validación del método de análisis del principio activo.
- Tres muestras a la concentración del valor límite para la impureza menos restrictiva en tres días diferentes para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas.

La concentración de estas muestras debe ser del 100% y del 2% de concentración de analito frente a la concentración nominal de principio activo, respectivamente.

Se debe calcular la recuperación de cada muestra, la recuperación promedio y el coeficiente de variación entre muestras. Si que el coeficiente de variación es igual o inferior al establecido como criterio de aceptación (*Tabla 5*), se puede confirmar la precisión intermedia.¹⁵

Tabla 5. Criterios de aceptación para la precisión del método.

	Rep. Instrumental	Rep. del Método	Precisión Intermedia
Principio activo	2.0%	2.8%	5.6%
Sustancias relacionadas	3.5%	5.0%	10.0%

3.3.4.4. Exactitud

La exactitud expresa la proximidad entre el valor de referencia (el aceptado como valor verdadero) y el valor experimental, es decir, la diferencia entre el valor obtenido en el análisis y el valor verdadero.

Tanto para la validación del método de análisis del principio activo como para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas se recomienda evaluar la exactitud en todo el rango de trabajo analizando tres muestras para 3 niveles de concentración en el rango, es decir, 9 muestras en total. La concentración de estas muestras debe ser del 100% y del 2% de concentración de analito frente a la concentración nominal de principio activo, respectivamente.

Se debe calcular la recuperación de cada muestra y la recuperación promedio junto a su intervalo de confianza. Para el método de análisis del principio activo en el *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* las recuperaciones de todas las muestras deben encontrarse en el rango 97.0% - 103.0% para considerar que el método es exacto, mientras que, para la

validación de sustancias relacionadas, las recuperaciones de todas las muestras deben encontrarse en el rango 90.0% - 110.0%.

A estos resultados se les debe aplicar un test de Cochran (*Expresión 9*) para confirmar que las variancias de las tres concentraciones son equivalentes y, por lo tanto, el factor concentración no afecta a la variabilidad de los resultados.¹⁵

3.3.4.5. Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección es la cantidad mínima de analito presente en la muestra que se puede detectar, pero no cuantificar, mientras que el límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito de una muestra que puede cuantificarse con precisión y exactitud.

La AEFI define cinco procedimientos para la determinación de los límites de detección y cuantificación, y en este trabajo se ha escogido el procedimiento basado en la señal ruido, en el que se establece que el límite de cuantificación es la concentración mínima a la que la relación señal/ruido del pico cromatográfico es igual o mayor de 10, mientras que el límite de detección es la concentración mínima a la que la relación señal/ruido del pico cromatográfico es igual o mayor de 3.

Aun así, como ya se ha descrito en este apartado, el límite de cuantificación se ha establecido como el nivel de concentración del extremo inferior del rango en el estudio de la linealidad. Por lo tanto, aunque los resultados de las pruebas previas mostraran una relación señal/ruido del pico cromatográfico igual o mayor a 10 en concentraciones inferiores, se seguirá estableciendo como límite de detección el nivel de concentración de 0.05% respecto la concentración del principio activo.

Por lo tanto, se realizarán seis preparativas de muestra a esta concentración, se analizarán y se calculará la relación señal/ruido y las recuperaciones para cada muestra, su intervalo de confianza y el coeficiente de variación del grupo de muestras. Si los resultados cumplen con los criterios de aceptación para el límite de cuantificación, la exactitud y la precisión para sustancias relacionadas, se podrá confirmar este nivel de concentración como límite cuantificación. En el caso del límite de detección, también se prepararán y analizarán seis muestras a la concentración escogida durante las pruebas previas. Si estas presentan una relación señal/ruido mayor a tres se podrá confirmar dicho nivel de concentración como límite de detección.¹⁵

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Condiciones analíticas

4.1.1. Materiales y reactivos

- Acetonitrilo (ACN) (grado UV, IR, HPLC, ACS, pureza > 99.9% PanReac)
- Tetrabutilamonio hidrógeno sulfato (grado HPLC, pureza > 99.0% PanReac)
- EDTA·Na₂·2H₂O (grado HPLC, pureza > 99.0% PanReac, AppliChem)
- Amoníaco 25% (BP, Ph. Eur. puro, grado Pharma)
- Ácido clorhídrico (HCl) 1M (grado HPLC, PanReac, AppliChem)
- Doxiciclina Hiclato CRS Ph. Eur. Reference Standard (pureza 92.6%)
- Doxiciclina Hiclato for System Suitability CRS Ph. Eur. Reference Standard
- Galénica de matriz de *PRODUCTO FARMACÉUTICO* 10% sin principio activo

4.1.2. Equipo cromatográfico

- Equipo HPLC Agilent Technologies serie 1260 Infinity
- Bomba binaria 1260 Infinity
- Inyector automático 1260 Infinity
- Detector de Diodos en fila con celda de cartucho de 60 mm 1260 Infinity

4.1.3. Condiciones cromatográficas

Todos los ensayos realizados en este trabajo se llevarán a cabo aplicando las condiciones cromatográficas mostradas en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para el análisis de PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

Columna	XTerra RP18 250x4.6 mm 5µm
Fase móvil	Acetonitrilo / Agua destilada / Solución A / Solución B (13:17:35:35) (en 1 solo canal)
Elución	Isocrática
Flujo	1.0 mL/min
Diluyente	HCl 0.01M
Detección	UV 280 nm, 20 nm – Ref= 475 nm, 150 nm
Volumen de inyección	Patrón Principio Activo (PA): 10, 20 y 30 µL Patrón Sustancias Relacionadas (SR): 1, 20 y 50 µL Muestra de producto farmacéutico: 20 µL Muestra para validación MA: 20 µL Muestra para validación MI: 20 µL
Temperatura columna	35 °C
Temperatura termostato	10°C
Tiempo cromatograma	40 minutos

4.1.4. Preparativa de Solución A

Pesar 23.77 g de tetrabutilamonio hidrógeno sulfato y disolver con agua hasta alcanzar los 350 ml. Agitar la solución con un agitador magnético hasta su total disolución. La solución obtenida debe ser transparente. Ajustar a pH 7.0 con amoníaco 25%.

4.1.5. Preparativa de Solución B

Pesar 39.06 g de EDTA·Na₂·2H₂O y disolver con agua hasta alcanzar los 350 ml. Agitar la solución con un agitador magnético hasta su total disolución. La solución obtenida debe ser transparente. Ajustar a pH 7.0 con amoníaco 25%.

4.1.6. Preparativa de patrón doxiciclina hiclato para System Suitability

Pesar con precisión 5 mg del patrón de doxiciclina hiclato “for System Suitability” CRS e introducirlos en un matraz aforado de 10 ml. Diluir el contenido con el diluyente y enrasar con el mismo diluyente. Filtrar esta solución con un filtro de nylon de 0.2 µm e introducir el filtrado en un vial de cromatografía.

4.1.7. Preparativa de patrón doxiciclina hiclato (cuantificación de PA)

Dado que el detector DAD induce una alta variabilidad en los resultados, se realizará una nueva preparativa de patrón a diario que se inyectará a tres volúmenes de inyección diferentes (en función del rango de concentración de trabajo) para construir una recta de calibrado para cada análisis que se realice. De esta forma, se intenta minimizar la variabilidad en los resultados inducida por el detector.

Pesar con precisión 20 mg de doxiciclina hiclato patrón e introducirlos en un matraz aforado de 25 ml. Diluir el contenido con el diluyente y enrasar con el mismo diluyente. Filtrar esta solución con un filtro de nylon de 0.2 µm e introducir el filtrado en un vial de cromatografía.

4.1.8. Preparativa de patrón doxiciclina hiclato (cuantificación de SR)

Pesar con precisión 20 mg de doxiciclina hiclato patrón e introducirlos en un matraz aforado de 25 ml. Diluir el contenido con el diluyente y enrasar con el mismo diluyente. Pipetear 1 ml de la solución anterior en un matraz de 100 ml y enrasar con el diluyente. Filtrar esta solución con un filtro de nylon de 0.2 µm e introducir el filtrado en un vial de cromatografía.

4.1.9. Preparativa de muestras para la validación del método de análisis de doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*

Las muestras a analizar durante la validación del método serán preparadas aplicando el método del placebo cargado, que consiste en preparar muestras con todos los compuestos de las muestras de producto acabado a excepción del principio activo (es decir, con los excipientes en su correcta proporción). A estas muestras se les añade principio activo, en este caso doxiciclina, en la cantidad necesaria para obtener una muestra de la misma concentración y características que el producto acabado.

Una vez realizados los cálculos necesarios, teniendo en cuenta que la cuantificación del principio activo del *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* se realiza en función de la presencia de doxiciclina base y no doxiciclina hiclato, y por lo tanto es necesario aplicar los pesos moleculares a los cálculos (así como la pureza de la materia prima y su porcentaje de humedad), la cantidad de doxiciclina hiclato que se debe pesar para cada muestra de validación es la mostrada en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Cantidad de doxiciclina hiclato a pesar para cada nivel de muestra de validación MA.

Muestra	MA80	MA90	MA100	MA110	MA120
Doxiciclina hiclato (mg)	65	73	81	89	97

Pesar la cantidad adecuada de doxiciclina hiclato, para la muestra correspondiente, en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 700 mg de matriz (que es el peso de *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* que se indica en la preparativa de muestras de este). Disolver el contenido con el diluyente de muestra y enrasar con el mismo. Filtrar esta solución con un filtro de 0.2 µm de nylon e introducir el filtrado en un vial de cromatografía.

4.1.1. Preparativa de muestras para la validación del método de análisis de las sustancias relacionadas de doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*

Una vez realizados los cálculos necesarios, teniendo en cuenta que la cuantificación del principio activo del *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* se realiza en función de la presencia de doxiciclina hiclato, tal y como se indica en la monografía de Farmacopea⁶, la cantidad de doxiciclina hiclato que se debe pesar para cada muestra de validación es la mostrada en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Cantidad de doxiciclina hiclato a pesar para cada nivel de muestra de validación MI.

Muestra	MI2	MI2.5	MI10	MA50	MA100	MI120
Doxiciclina hiclato (mg)	1	2	8	41	81	97

Pesar la cantidad adecuada de doxiciclina hclato, para la muestra correspondiente, en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 700 mg de matriz. Disolver el contenido con el diluyente de muestra y enrasar con el mismo. Pipetear 1 ml de la solución anterior a un matraz de 50 ml y enrasar con el diluyente. Filtrar esta solución con un filtro de 0.2 µm de nylon e introducir el filtrado en un vial de cromatografía.

4.1.2. Preparación del blanco del diluyente

Filtrar el diluyente por un filtro de nylon de 0.2 µm e introducir el filtrado en un vial de cromatografía. Se debe inyectar por lo menos un blanco en cada análisis.

4.2. Pruebas previas

Como se explica en el apartado [3.3. Fases del desarrollo de la validación](#), antes de iniciar ambas validaciones se realizarán los estudios de robustez y estabilidad de muestra MA100, MI100, patrón para principio activo y patrón para sustancias relacionadas. Los resultados de estos estudios se mostrarán en el apartado [5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN](#) junto con los resultados de los estudios propios de la validación.

Asimismo, antes incluso de realizar estos estudios, se llevarán a cabo pruebas puntuales de análisis de muestras y patrón. Una de estas pruebas consiste en la preparación y cuantificación de muestras a concentraciones inferiores a la fijada como límite de cuantificación para observar el descenso de la relación señal/ruido junto con la concentración y poder escoger una concentración adecuada con la que llevar a cabo la evaluación del límite de detección durante la validación del método.

Los resultados de estas pruebas previas no se mostrarán en el apartado de resultados ya que su único objetivo es la familiarización con el método y la selección del nivel de concentración del límite de detección a validar.

4.2.1. Estabilidad de patrón PA, patrón SR, muestra MA100 y muestra MI100

Para evaluar la estabilidad de los patrones para principio activo y sustancias relacionadas, muestra MA100 y muestra MI100 durante las primeras 24 horas des de su preparación, se deben a cabo los análisis indicados en la *Tabla 9* y la *Tabla 10*.

Tabla 9. Estudio de estabilidad de patrón y muestra de principio activo.

Muestra	Volumen Inyección (µL)	Nº Prep.	Nº Iny.	Tiempo de análisis (h)
Patrón PA	20	1	1	0, 4, 8, 12, 24
MA100				

Tabla 10. Estudio de estabilidad de patrón y muestra de sustancias relacionadas.

Muestra	Volumen Inyección (µL)	Nº Prep.	Nº Iny.	Tiempo de análisis (h)
Patrón SR MI100	20	1	1	0, 4, 8, 12, 24

4.2.2. Robustez

Para evaluar la robustez del método se llevará a cabo un análisis compuesto por ocho experimentos con las condiciones de preparativa y análisis indicados en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Estudio de robustez del método analítico.

Muestra	Exp.	Factores		
		A (pH Sol. A)	B (pH Sol. B)	C (Flujo ml/min)
MA100	1	6.8	6.8	0.9
	2	7.2	6.8	0.9
	3	6.8	7.2	0.9
	4	7.2	7.2	0.9
	5	6.8	6.8	1.1
	6	7.2	6.8	1.1
	7	6.8	7.2	1.1
	8	7.2	7.2	1.1

4.2.3. System Suitability

Para evaluar la idoneidad del sistema se realizarán seis inyecciones consecutivas de la preparativa de patrón para System Suitability descrita en el [apartado 4.1.6.](#) Además, aunque estos resultados no vayan a mostrarse, se realizarán tres inyecciones del patrón para System Suitability al principio de cada análisis para confirmar la idoneidad del sistema a diario.

4.3. Validación del método analítico

Los análisis correspondientes a la validación del método de análisis de la doxiciclina y la de sus sustancias relacionadas se han planificado en períodos distintos. En los siguientes subapartados se muestran los análisis diarios a realizar, el tipo y número de muestras a preparar e inyectar y los parámetros que se pretenden evaluar en cada ocasión.

4.3.1. Validación del método de análisis de doxiciclina

En las *Tablas 12, 13 y 14* se muestran los análisis correspondientes a la validación del método de análisis de doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

Tabla 12. Análisis correspondiente al día 1 de la validación del método de análisis de doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
11 DE ABRIL	Blanco	-	1	20	3	Selectividad
	System Suitability	-				System Suitability
	Matriz (M)	-				Selectividad
	Patrón PA (A)	-	1	10	1	Selectividad + Recta de calibrado
				20	3	
			30	1		
MA100 (MA)	100	3	20	1	Selectividad + Precisión Intermedia 1	

Tabla 13. Análisis correspondiente al día 2 de la validación del método de análisis de doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
12 DE ABRIL	Blanco	-	1	20	1	Selectividad
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón PA	-			10	1
			20	1		
			30	1		
	MA80	80	3	20	1	Linealidad y Rango + Exactitud
	MA90	90				Linealidad y Rango
	MA100	100				Linealidad y Rango + Exactitud + Precisión Intermedia 2
MA110	110	Linealidad y Rango				
MA120	120	Linealidad y Rango + Exactitud				

Tabla 14. Análisis correspondiente al día 3 de la validación del método de análisis de doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
13 DE ABRIL	Blanco	-	1	20	1	Blanco
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón PA	-	1	10	1	Recta de calibrado
				20	1	
			30	1		
MA100	100	1	20	6	Repetibilidad instrumental	
MA100	100	6		1	Repetibilidad del método + Precisión intermedia 3	

4.3.2. Validación del método de análisis de sustancias relacionadas de la doxiciclina

En las *Tablas 15, 16, 17, 18 y 19* se muestran los análisis correspondientes a la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

Tabla 15. Análisis correspondiente al día 1 de la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	N° Prep.	Vol. Iny. (µL)	N° Iny.	Parámetros
24 DE MAYO	Blanco	-	1	20	3	Selectividad + System Suitability
	System Suitability	-				
	Matriz (M)	-				
	Patrón SR (A)	-				
	MA100 (MA)	100				
	MI100 (MI)	2.0				

Tabla 16. Análisis correspondiente al día 2 de la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	N° Prep.	Vol. Iny. (µL)	N° Iny.	Parámetros
25 DE MAYO	Blanco	-	1	20	1	Blanco
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón SR	-		1	1	1
			20		1	
	MI100	2.0	1	20	6	Repetibilidad instrumental
	MI100				6	1

Tabla 17. Análisis correspondiente al día 3 de la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
26 DE MAYO	Blanco	-	1	20	1	Blanco
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón SR	-			1 20 50	1 1 1
	MI2.5	0.05	3	20	1	Linealidad y Rango
	MI10	0.2				Linealidad y Rango + Exactitud
	MI50	1.0				Linealidad y Rango
	MI100	2.0				Linealidad y Rango + Exactitud + Precisión Intermedia 2
	MI120	2.4				Linealidad y Rango + Exactitud

Tabla 18. Análisis correspondiente al día 4 de la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
27 DE MAYO	Blanco	-	1	20	1	Blanco
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón SR	-			1 20 50	1 1 1
	MI100	2.0	3	20	1	Precisión Intermedia 3

Tabla 19. Análisis correspondiente al día 5 de la validación del método de análisis las sustancias relacionadas de la doxiciclina en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

	Muestra	Conc. Muestra (%)	Nº Prep.	Vol. Iny. (µL)	Nº Iny.	Parámetros
30 DE MAYO	Blanco	-	1	20	1	Blanco
	System Suitability	-			3	System Suitability
	Patrón SR	-			1 20 50	1 1 1
	LOD	0.04	3	20	1	LOD
	LOQ	0.05	6			LOQ

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Pruebas previas

5.1.1. Estabilidad de patrón PA, patrón SR, muestra MA100 y muestra MI100

En la *Tabla 20* se pueden observar las respuestas cromatográficas proporcionales de la doxiciclina al analizar muestra MA100, patrón PA y patrón SR a diferentes tiempos desde su preparativa en referencia a la respuesta cromatográfica en el momento de su preparativa. Los coeficientes de variación para cada muestra y patrones son inferiores a 2.0%, y por lo tanto se cumple con el criterio de aceptación establecido.

Tabla 20. Resultados de las pruebas de estabilidad a lo largo de 24 horas de la muestra MA100 y de los patrones para principio activo y sustancias relacionadas.

Tiempo (h)	Respuesta (mAU)			Resp. respecto resp. t = 0 h (%)		
	MA100	Patrón PA	Patrón SR	MA100	Patrón PA	Patrón SR
0	23980.04	23863.37	213.55	100.00	100.00	100.00
4	24001.01	23837.12	211.16	100.09	99.89	98.88
8	23992.50	23853.44	212.90	100.05	99.96	99.70
12	23999.18	23877.38	213.55	100.08	100.06	100.00
24	24071.03	23958.19	216.74	100.38	100.40	101.49
Promedio				100.12	100.06	100.01
CV (%)				0.15	0.20	0.95

En la *Tabla 21* se muestran las concentraciones respecto la concentración nominal de la doxiciclina y sus sustancias relacionadas detectadas en la muestra MI100 junto con sus límites establecidos a diferentes tiempos desde su preparativa. El coeficiente de variación de la concentración de doxiciclina menor al 2.0% y la concentración de las sustancias relacionadas detectadas es estable durante el tiempo y por debajo de sus límites establecidos. Por lo tanto, se cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 21. Resultados de la prueba de estabilidad a lo largo de 24 horas de la muestra MI100.

Analito	Doxiciclina	Imp. A	Imp. C	Imp. Totales
Tiempo (h)	Concentración de compuesto en la muestra p/p (%)			
0	10.06	0.15	0.016	0.17
4	9.93	0.16	0.014	0.17
8	10.06	0.16	0.013	0.17
12	10.13	0.16	0.013	0.17
24	10.16	0.16	0.013	0.17
Límite (%)	9.5-10.5	2.0	0.200	3.0
Promedio	10.07	0.16	0.014	0.17
CV (%)	0.89			

Dados los resultados, se puede afirmar que la muestra MA100, la muestra MI100, el patrón PA y el patrón SR se mantendrán estables al realizar secuencias de larga duración.

5.1.2. Robustez

Como se observa en la *Tabla 23*, los resultados del análisis para la evaluación de la robustez del método analítico muestran que el único factor cuyo efecto no cumple con el criterio de aceptación es el flujo, ya que este es superior al 2% establecido como criterio de aceptación.

Tabla 22. Respuesta de doxiciclina en cada experimento del análisis para la evaluación de la robustez del método analítico.

Experimento	Resp. (mAU)
0	23882.1
1	26374.7
2	26379.0
3	26624.2
4	26578.7
5	21846.5
6	22038.6
7	21328.6
8	21291.5

Tabla 23. Resultados del análisis para la evaluación de la robustez del método analítico.

Factor	Efecto	Efecto en valor absoluto (%)
A (pH Solución A)	28.46	0.12
B (pH solución B)	-203.9	0.85
C (Flujo)	-4863	20.4
AB	-69.72	0.29
AC	49.05	0.21
BC	-428.5	1.79
ABC	-44.87	0.19

Estos resultados indican que los otros factores evaluados (el pH de las soluciones que conforman la fase móvil) y sus interacciones no influirán significativamente en los resultados en caso de sufrir pequeñas variaciones. Además, dado que el valor del flujo es un parámetro fijo al configurar las condiciones de análisis en el equipo cromatográfico, se puede afirmar que el método de análisis de la doxiciclina y sus sustancias relacionadas en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es robusto y proporcionará fiabilidad en su aplicación rutinaria.

5.1.3. Idoneidad del sistema

En la *Tabla 24* se muestran los resultados del análisis para la evaluación de la idoneidad del sistema. Tanto el promedio del factor de asimetría, el factor de capacidad y el número de platos teóricos como el coeficiente de variación de la respuesta del pico de doxiciclina cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Además, el tiempo de retención del pico cromatográfico del principio activo corresponde con el indicado en el método analítico a validar, tal i como se observa en la *Figura 16* en [Anexo A3](#).

Tabla 24. Resultados del análisis para la evaluación de la idoneidad del sistema del método analítico.

Nº Iny.	t _r (min)	Resp. (mAU)	Factor de asimetría	Factor de capacidad (k')	Núm. platos teóricos (N)
1	20.68	183.66	1.39	92.44	3489.65
2	20.69	184.64	1.37	92.48	3507.25
3	20.69	183.59	1.30	92.46	3510.53
4	20.69	183.60	1.31	92.36	3522.55
5	20.69	185.60	1.29	92.54	3516.62
6	20.68	185.58	1.32	92.41	3522.81
Límite	-	≤ 2.0%	0.8 - 2.0	≥ 1	≥ 2000
Promedio	20.69	184.44	1.33	92.45	3511.57
CV (%)	0.02	0.53	3.10	0.07	0.35

Por lo tanto, se puede afirmar que el conjunto analítico es idóneo para el método de análisis de la doxiciclina y sus sustancias relacionadas en PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%.

5.2. Validación del método analítico

5.2.1. Validación del método de análisis de doxiciclina

5.2.1.1. Selectividad

En los cromatogramas obtenidos en el análisis de la matriz (M) (*Figura 17*), del diluyente (*Figura 18*) y de la fase móvil (*Figura 19*) mostrados en [Anexo A3](#) no se detectan señales cromatográficas con tiempos de retención próximos al de la doxiciclina (21 minutos aproximadamente). Esto indica que ni la matriz del producto, ni el diluyente o la fase móvil interfieren en la detección o cuantificación de la doxiciclina.

En los cromatogramas obtenidos en el análisis de patrón de doxiciclina hiclato para cuantificación de principio activo (A) y de muestra MA100 (MA) (*Figura 20* y *Figura 22*, respectivamente), se puede observar que el pico cromatográfico correspondiente a la doxiciclina eluye alrededor del minuto 21.

Si se compara el espectro UV de este pico cromatográfico (*Figura 1*) con el espectro UV de referencia de la doxiciclina (*Figura 2*) se puede afirmar que la identidad del pico observado es, efectivamente, doxiciclina. Adicionalmente, el programa de procesamiento de datos OpenLab indica que el pico presenta una pureza de 99.95%.

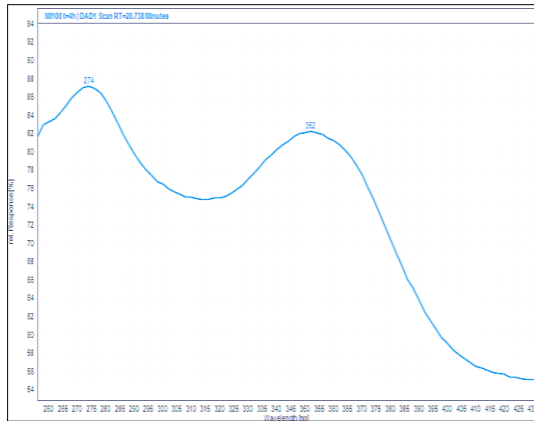


Figura 1. Espectro UV del pico cromatográfico del patrón de doxiciclina hiclato para cuantificación de principio activo (A).

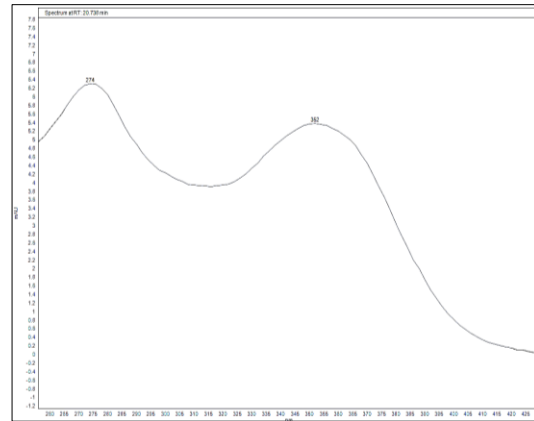


Figura 2. Espectro UV del pico cromatográfico de referencia de doxiciclina.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que método permite diferenciar el analito de interés de forma inequívoca, y, por lo tanto, se puede afirmar que el método de análisis de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es selectivo.

5.2.1.2. Linealidad y Rango

En la *Tabla 25* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la linealidad y el rango del método analítico.

Tabla 25. Resultados del análisis para la evaluación de la linealidad y el rango del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Conc. (%)	Recup. (%)
MA80-1	64.76	19131.8	78.10	97.63
MA80-2	64.66	19083.7	78.03	97.53
MA80-3	64.72	19248.6	78.62	98.28
MA90-1	72.90	21502.7	87.69	97.44
MA90-2	72.87	21573.0	88.01	97.79
MA90-3	72.89	21481.5	87.62	97.35
MA100-1	80.91	24053.3	98.17	98.17
MA100-2	80.91	23831.1	97.27	97.27
MA100-3	81.05	24003.0	97.80	97.80
MA110-1	89.00	26370.6	107.60	97.82
MA110-2	89.24	26515.4	107.90	98.09
MA110-3	88.94	26353.7	107.61	97.82
MA120-1	97.23	28866.8	117.59	98.00
MA120-2	97.08	28810.1	117.55	97.96
MA120-3	97.01	28813.9	117.65	98.04
CV (%)				0.31%

Ecuación de la recta

La ecuación de la recta obtenida se muestra en la *Expresión 12* y la representación gráfica de la curva de calibrado se muestra en la *Figura 3*.

$$y = -71.35 + 245.85 \cdot x$$

Expresión 12

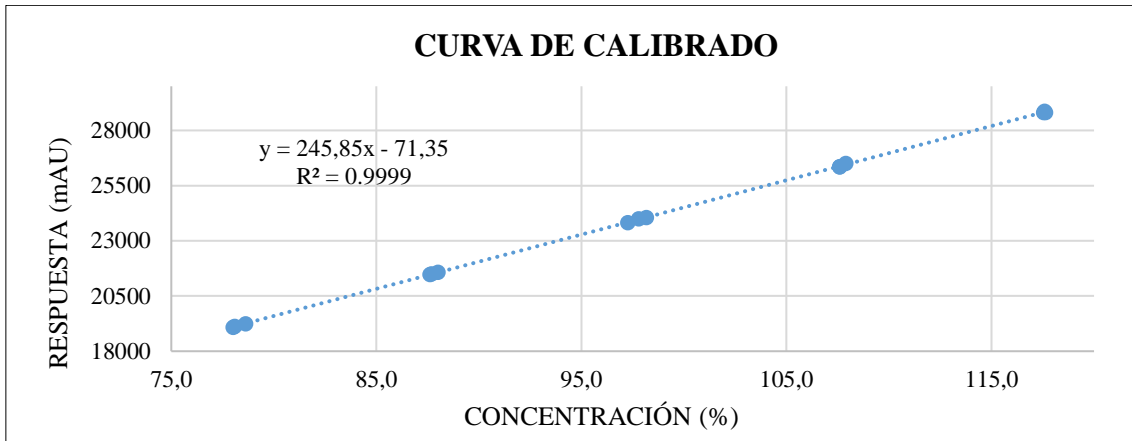


Figura 3. Curva de calibrado. Evaluación de la linealidad y el rango.

Coefficiente de correlación (r)

El coeficiente de correlación obtenido aplicando la *Expresión 8* es de 0.99997. Dado que el coeficiente de correlación obtenido cumple el criterio de aceptación $r \geq 0,999$, se confirma que existe correlación lineal entre las variables.

Variación residual constante

En la *Figura 4* se muestra la representación de los residuales e_i frente los valores estimados. Dado que se observa una distribución aleatoria y sin tendencias de los puntos, se confirma que existe homocedasticidad.

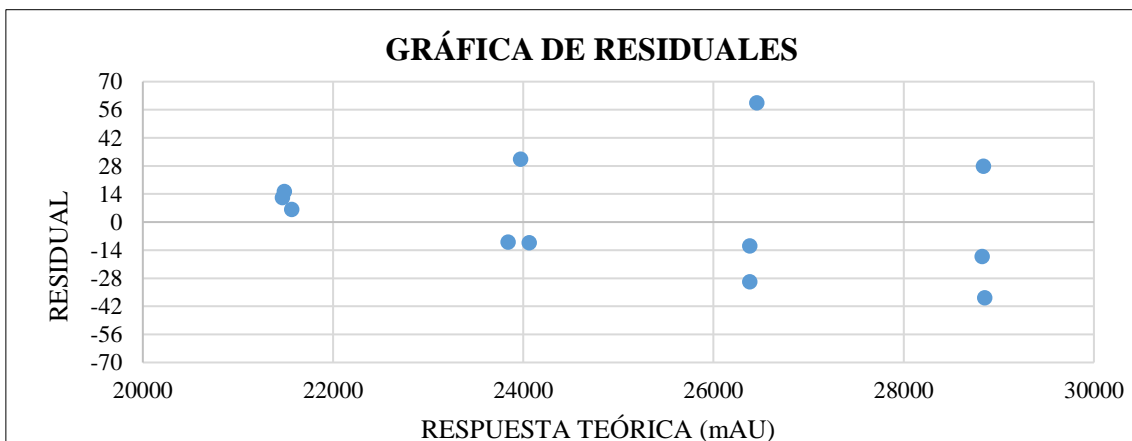


Figura 4. Representación de los residuales e_i frente los valores estimados.

Análisis de la variancia (ANOVA)

- Test de Cochran: homogeneidad de variancias: Aplicando la *Expresión 9* se obtiene una G_{exp} de 0.52. Se cumple la condición de los criterios de aceptación $G_{exp} \leq G_{tab}$ ($G_{tab} (\alpha=0.05, k=3, n=3) = 0.68$)¹⁶ y se confirma que las variancias son homogéneas y que existe heterocedasticidad.
- Normalidad de los residuales: En la *Figura 5* se observa que el *Valor p* es superior al nivel de significancia, por lo que se cumple la hipótesis nula (todos los valores de los datos siguen una distribución normal) y se confirma que los datos siguen una distribución normal. En la *Figura 5* se puede observar su distribución.

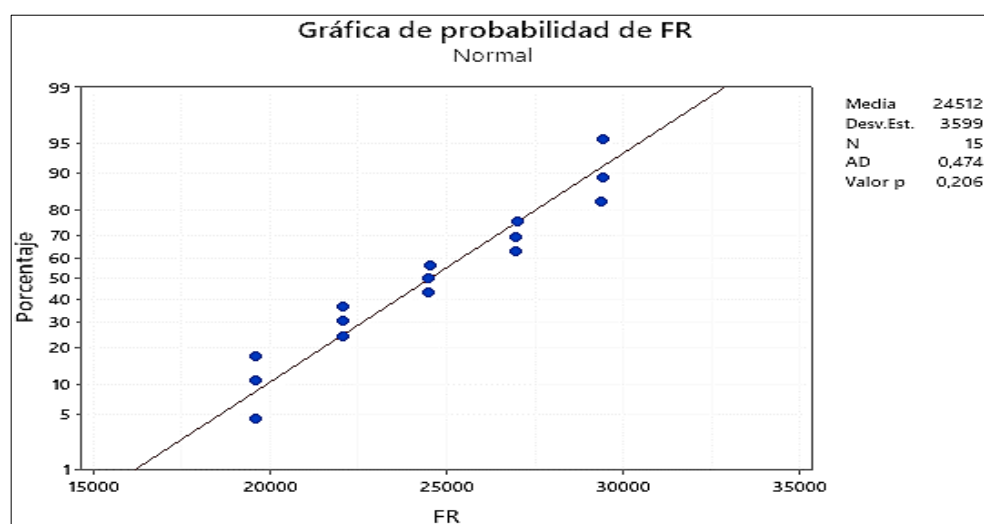


Figura 5. Representación gráfica de la normalidad de los residuales.

En la *Tabla 26* se muestran los resultados obtenidos al realizar los cálculos de la *Tabla 4*.

Tabla 26. Resultados de los cálculos para el análisis de variancias (ANOVA).

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Variancia (V)	F
Regresión	177382167	1	177382167	$F_1 = 22484$
Residuales	102562	13	7889	$F_2 = 2.01$
Falta de ajuste	38625	3	12875	
Error exp.	63937	10	6394	
Total	177484729	14		

Dado que se cumplen las condiciones de los criterios de aceptación $F_{1, exp} \leq F_{1, tab}$ ($F_{1, tab} (\alpha = 0.05, 1, 13) = 4.67$)¹⁶ y $F_{2, exp} \leq F_{2, tab}$ ($F_{2, tab} (\alpha = 0.05, 3, 10) = 3.71$)¹⁶, se confirma que existe linealidad entre los resultados obtenidos.

Test de linealidad

Aplicando la *Expresión 11* se obtiene una t_{exp} de 491.12. Dado que se cumplen las condiciones de los criterios de aceptación $t_{exp} \geq t_{tab}$ ($t_{tab} (\alpha=0.05, gIT-1=13) = 2.16$)¹⁶ y CV (%) $\leq 2.0\%$, se confirma que la pendiente es significativamente distinta de cero.

Test de proporcionalidad

Aplicando la *Expresión 11* se obtiene una t_{exp} de 1.44. Dado que se cumple la condición de los criterios de aceptación $t_{exp} \leq t_{tab}$ ($t_{tab} (\alpha=0.05, gIT-1=13) = 2.16$)¹⁶, se confirma que la recta pasa por el origen de coordenadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método de análisis de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es lineal en el rango evaluado.

5.2.1.3. Precisión

En la *Tabla 27*, *Tabla 28* y *Tabla 29* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la repetibilidad del método, la repetibilidad instrumental y la precisión intermedia del método analítico, respectivamente.

Tabla 27. Resultados del análisis para la evaluación de la repetibilidad del método analítico

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MA100-1	81.06	23963.67	98.27
MA100-2	81.04	23879.19	97.95
MA100-3	81.06	23874.31	97.91
MA100-4	81.09	23911.58	98.02
MA100-5	81.02	23922.39	98.15
MA100-6	80.95	24056.18	98.78
Promedio			98.18
CV (%)			0.33

Tabla 28. Resultados del análisis para la evaluación de la repetibilidad instrumental del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MA100-6/1	80.95	24056.18	98.78
MA100-6/2		24035.77	98.70
MA100-6/3		24044.32	98.73
MA100-6/4		24047.51	98.75
MA100-6/5		24038.76	98.71
MA100-6/6		24043.72	98.73
Promedio			98.73
CV (%)			0.03

Tabla 29. Resultados del análisis para la evaluación de la precisión intermedia del método analítico.

Muestra	Día	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MA100-1	1	80.81	23933.99	98.95
MA100-2		80.97	23504.27	97.00
MA100-3		80.95	23529.31	97.13
MA100-1	2	80.91	24053.33	98.17
MA100-2		80.91	23831.13	97.27
MA100-3		81.05	24003.01	97.80
MA100-1	3	81.06	23963.67	98.27
MA100-2		81.04	23879.19	97.95
MA100-3		81.06	23874.31	97.91
Promedio				97.83
CV (%)				0.64

Los coeficientes de variación para las recuperaciones del conjunto de muestras analizadas para la evaluación de la repetibilidad del método, la repetibilidad instrumental y la precisión intermedia cumplen con los criterios de aceptación establecidos (ver [Tabla 5](#)). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método de análisis de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es preciso.

5.2.1.4. Exactitud

En la [Tabla 30](#) se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la exactitud.

Tabla 30. Resultados del análisis para la evaluación de la exactitud del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)	Promedio (%)	CV (%)
MA80-1	64.76	19597.06	97.63	97.81	0.42
MA80-2	64.66	19566.57	97.53		
MA80-3	64.72	19585.50	98.28		
MA100-1	80.91	24053.33	98.17	97.74	0.47
MA100-2	80.91	23831.13	97.27		
MA100-3	81.05	24003.01	97.80		
MA120-1	97.23	29457.40	98.00	98.00	0.04
MA120-2	97.08	29411.52	97.96		
MA120-3	97.01	29390.51	98.04		

Todas las recuperaciones y su promedio entre niveles de concentración de las muestras analizadas para la evaluación de la exactitud están dentro del intervalo de recuperación 97.0% - 103.0%, por lo que se cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Test de Cochran: homogeneidad de variancias

Aplicando la *Expresión 9* se obtiene una G_{exp} de 0.55. Se cumple la condición de los criterios de aceptación $G_{exp} \leq G_{tab}$ ($G_{tab} (\alpha=0.05, k=3, n=3) = 0.87$)¹⁶ y se confirma que las variancias de las tres concentraciones son equivalentes y, por lo tanto, el factor concentración no afecta a la variabilidad de los resultados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método de análisis de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es exacto.

5.2.2. Validación del método de análisis de sustancias relacionadas de la doxiciclina

5.2.2.1. Selectividad

En los cromatogramas obtenidos en el análisis de la matriz (M) (*Figura 17*), del diluyente (*Figura 18*) y de la fase móvil (*Figura 19*) mostrados en [Anexo A3](#) no se detectan señales cromatográficas con tiempos de retención próximos al de la doxiciclina (21 minutos aproximadamente). Esto indica que ni la matriz del producto, ni el diluyente o la fase móvil interfieren en la detección o cuantificación de la doxiciclina.

En los cromatogramas obtenidos en el análisis de patrón de doxiciclina hiclato para cuantificación de sustancias relacionadas (I) y de muestra MI100 (MI) (*Figura 21* y *Figura 23*, respectivamente), se observa que el pico cromatográfico correspondiente a la doxiciclina eluye alrededor del minuto 21. Además, en la muestra MA100 (MA) se observan los picos cromatográficos de las cuatro impurezas específicas asociadas a la doxiciclina eluyendo a un tiempo de retención que se corresponde con los tiempos de retención relativos indicados por la monografía de la doxiciclina hiclato de Farmacopea.⁶

Si se compara el espectro UV de este pico cromatográfico (*Figura 1*) con el espectro UV de referencia de la doxiciclina (*Figura 2*) se puede afirmar que la identidad del pico observado es, efectivamente, doxiciclina. Adicionalmente, el programa de procesado de datos OpenLab indica que el pico presenta una pureza de 99.95%.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que método permite diferenciar el analito de interés de forma inequívoca, y, por lo tanto, se puede afirmar que el método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es selectivo.

5.2.2.2. Linealidad y Rango

En la *Tabla 31* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la linealidad y el rango del método analítico para sustancias relacionadas.

Tabla 31. Resultados del análisis para la evaluación de la linealidad y el rango del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Conc. (%)	Recup. (%)
MI2.5-1	2.04	9.75	2.61	97.63
MI2.5-2	2.03	9.36	2.54	97.53
MI2.5-3	2.03	9.73	2.62	98.28
MI10-1	8.17	37.56	10.82	97.44
MI10-2	8.11	37.42	10.87	97.79
MI10-3	8.21	35.22	10.19	97.35
MI50-1	40.20	199.26	51.96	98.17
MI50-2	40.04	203.39	53.21	97.27
MI50-3	40.40	200.81	52.09	97.80
MI100-1	80.35	396.93	102.09	97.82
MI100-2	80.07	412.24	106.34	98.09
MI100-3	80.40	410.42	105.44	97.82
MI120-1	96.34	488.30	125.35	98.00
MI120-2	96.19	475.45	122.28	97.96
MI120-3	96.49	502.96	128.87	98.04
CV (%)				2.21

Ecuación de la recta

La curva de calibrado y la ecuación asociada se muestran en la *Figura 6*.

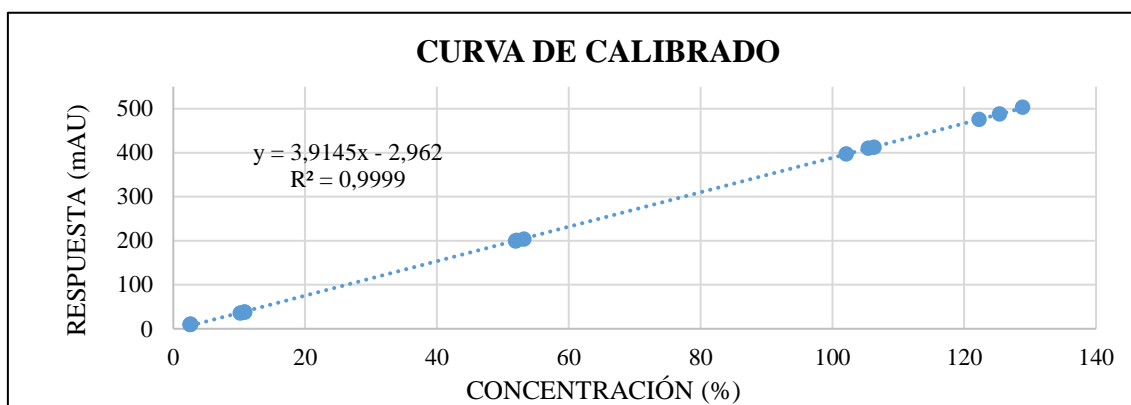


Figura 6. Curva de calibrado. Evaluación de la linealidad y el rango.

Coefficiente de correlación (r)

El coeficiente de correlación obtenido aplicando la *Expresión 8* es de 0.99997. Dado que el coeficiente de correlación obtenido cumple el criterio de aceptación $r \geq 0,999$, se confirma que existe correlación lineal entre las variables.

Variación residual constante

En la *Figura 7* se muestra la representación de los residuales e_i frente los valores estimados. Dado que se observa una distribución de los puntos aleatoria y sin tendencias, se confirma que existe homocedasticidad.

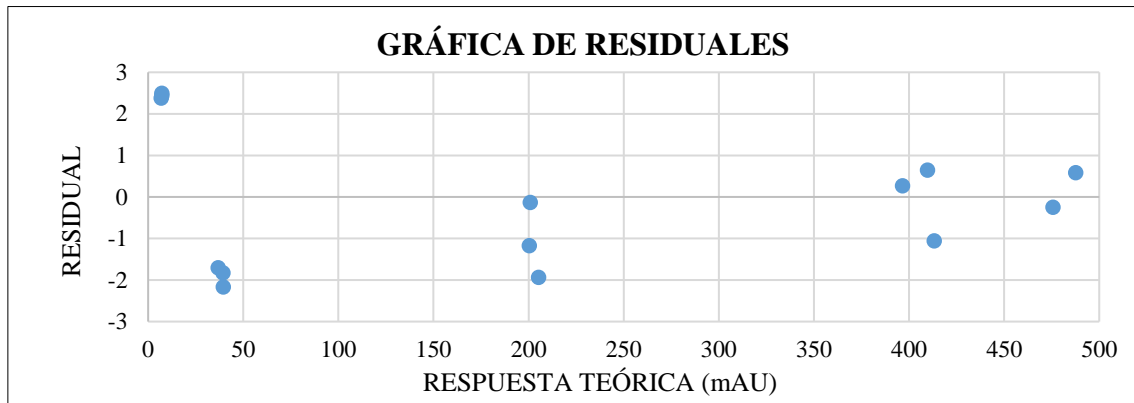


Figura 7. Representación de los residuales e_i frente los valores estimados.

Análisis de la variancia (ANOVA)

- Test de Cochran: homogeneidad de variancias: Aplicando la *Expresión 9* se obtiene una G_{exp} de 0.52, y dado que se cumplen los criterios de aceptación $G_{exp} \leq G_{tab}$ ($G_{tab} (\alpha=0.05, k=3, n=3) = 0.68$)¹⁶, se confirma que las variancias son homogéneas y que existe heterocedasticidad.
- Normalidad de los residuales: En la *Figura 8* se observa que el *Valor p* es superior al nivel de significancia, por lo que se cumple la hipótesis nula (todos los valores de los datos siguen una distribución normal) y como se observa en la *Figura 9*, se confirma que los datos siguen una distribución normal.

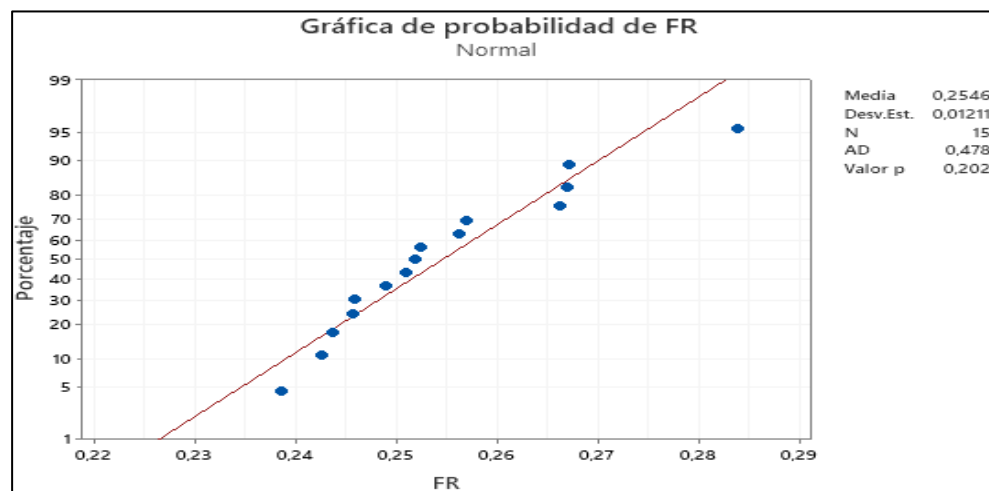


Figura 8. Representación gráfica de la normalidad de los residuales obtenida mediante la herramienta estadística MiniTab.

En la *Tabla 32* se muestran los resultados obtenidos al realizar los cálculos de la *Tabla 4*.

Tabla 32. Resultados de los cálculos para el análisis de variancias (ANOVA).

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Variancia (V)	F
Regresión	542922	1	542922	$F_1 = 8144$
Residuales	867	13	67	$F_2 = 2.11$
Falta de ajuste	336	3	112	
Error exp.	531	10	53	
Total	543788	14		

Dado que se cumplen las condiciones de los criterios de aceptación $F_{1, \text{exp}} \leq F_{1, \text{tab}}$ ($F_{1, \text{tab}} (\alpha = 0.05, 1, 13) = 4.67$)¹⁶ y $F_{2, \text{exp}} \leq F_{2, \text{tab}}$ ($F_{2, \text{tab}} (\alpha = 0.05, 3, 10) = 3.71$)¹⁶, se confirma que existe linealidad entre los resultados obtenidos.

Test de linealidad

Aplicando la *Expresión 11* se obtiene una t_{exp} de 435.31. Dado que se cumplen las condiciones de los criterios de aceptación $t_{\text{exp}} \geq t_{\text{tab}}$ ($t_{\text{tab}} (\alpha=0.05, \text{glT}-1=13) = 2.16$)¹⁶ y CV (%) $\leq 3.5\%$, se confirma que la pendiente es significativamente distinta de cero.

Test de proporcionalidad:

Aplicando la *Expresión 11* se obtiene una t_{exp} de 4.28. Dado que no se cumple la condición de los criterios de aceptación $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ ($t_{\text{tab}} (\alpha=0.05, \text{glT}-1=13) = 2.16$)¹⁶, no se puede confirmar que la recta pase por el origen de coordenadas. Teniendo en cuenta que se trabaja a concentraciones muy bajas para llegar al nivel de concentración de las impurezas, este resultado es justificable teniendo en cuenta que a niveles de concentración de este orden cualquier alteración de la línea base puede genera un pequeño desplazamiento de la recta de calibrado haciendo que no pase por el cero.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es lineal en el rango evaluado.

5.2.2.3. Precisión

En las *Tabla 33*, *Tabla 34* y *Tabla 35* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la repetibilidad del método, la repetibilidad instrumental y la precisión intermedia del método analítico para sustancias relacionadas, respectivamente.

Tabla 33. Resultados del análisis para la evaluación de la repetibilidad del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MI100-1	80.15	390.85	106.72
MI100-2	80.32	388.27	105.79
MI100-3	80.83	387.70	104.97
MI100-4	80.28	386.42	105.34
MI100-5	80.03	380.64	104.10
MI100-6	79.84	391.44	107.29
Promedio			105.70
CV (%)			1.10

Tabla 34. Resultados del análisis para la evaluación de la repetibilidad instrumental del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MI100-6/1	79.84	391.44	107.29
MI100-6/2		393.33	107.81
MI100-6/3		394.96	108.25
MI100-6/4		396.77	108.75
MI100-6/5		395.80	108.49
MI100-6/6		394.97	108.26
Promedio			108.14
CV (%)			0.48

Tabla 35. Resultados del análisis para la evaluación de la precisión intermedia del método analítico.

Muestra	Día	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MI100-1	1	80.15	390.85	106.72
MI100-2		80.32	388.27	105.79
MI100-3		80.83	387.70	104.97
MI100-1	2	80.35	396.93	102.09
MI100-2		80.07	412.24	106.34
MI100-3		80.40	410.42	105.44
MI100-1	3	80.46	416.48	106.95
MI100-2		80.40	418.88	107.64
MI100-3		80.19	414.43	106.79
Promedio				105.86
CV (%)				1.54

Los coeficientes de variación de las recuperaciones de las muestras analizadas cumplen los criterios de aceptación establecidos (ver [Tabla 5](#)). Teniendo en cuenta estos resultados, se confirma que el método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es preciso.

5.2.2.4. Exactitud

En la *Tabla 36* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación de la exactitud.

Tabla 36. Resultados del análisis para la evaluación de la exactitud del método analítico.

Muestra	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)	Promedio (%)	CV (%)
MI2.5-1	2.04	9.75	104.48	103.58	1.75
MI2.5-2	2.03	9.36	101.50		
MI2.5-3	2.03	9.73	104.78		
MI100-1	80.35	396.93	102.09	104.63	2.14
MI100-2	80.07	412.24	106.34		
MI100-3	80.40	410.42	105.44		
MI120-1	96.34	488.30	104.46	104.59	2.63
MI120-2	96.19	475.45	101.90		
MI120-3	96.49	502.96	107.39		

Todas las recuperaciones y su promedio entre niveles de concentración de las muestras analizadas para la evaluación de la exactitud están dentro del intervalo de recuperación 90.0% - 100.0%, por lo que se cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Test de Cochran: homogeneidad de variancias

Aplicando la *Expresión 9* se obtiene una G_{exp} de 0.48. Se cumple la condición de los criterios de aceptación $G_{exp} \leq G_{tab}$ ($G_{tab} (\alpha=0.05, k=3, n=3) = 0.87$)¹⁶ y se confirma que las variancias de las tres concentraciones son equivalentes y, por lo tanto, el factor concentración no afecta a la variabilidad de los resultados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es exacto.

5.2.2.5. Límite de detección

En la *Tabla 37* se muestran los datos experimentales obtenidos en el análisis de las muestras para la evaluación del límite de detección.

Tabla 37. Resultados del análisis para la evaluación del límite de detección del método analítico.

Muestra	S/N	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)
MI2-1	9.55	1.70	8.70
MI2-2	9.67	1.68	8.75
MI2-3	9.43	1.61	8.41
MI2-4	9.59	1.72	8.65
MI2-5	9.47	1.67	8.73
MI2-6	9.68	1.69	8.44
Promedio	9.57		
CV (%)	1.74		

Dado que la relación S/R de la respuesta del analito es superior a 3 para todas las muestras analizadas y su promedio, se cumplen los criterios de aceptación para el límite de detección y se confirma que el límite de detección del método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*, que se encuentra a una concentración de 0.04% de analito respecto la concentración de principio activo presente en el producto.

5.2.2.6. Límite de cuantificación

En la *Tabla 38* se muestran los datos experimentales y las recuperaciones de doxiciclina obtenidas en el análisis de las muestras para la evaluación del límite de detección.

Tabla 38. Resultados del análisis para la evaluación del límite de cuantificación del método analítico.

Muestra	S/N	Doxiciclina Hiclato (mg)	Resp. (mAU)	Recup. (%)
MI2.5-1	12.14	2.05	8.96	100.15
MI2.5-2	12.17	2.08	8.88	97.65
MI2.5-3	12.94	2.09	9.51	103.71
MI2.5-4	11.92	2.04	8.95	100.41
MI2.5-5	11.84	2.00	8.75	99.99
MI2.5-6	12.67	2.05	9.02	100.36
Promedio				100.38
CV (%)				1.93

La relación S/R de las muestras analizadas para la evaluación del límite de cuantificación es superior a 10, las recuperaciones se encuentran dentro del intervalo 90.0% - 100.0% y el coeficiente de variación es inferior a 5.0%, por lo tanto, los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede afirmar el método de análisis de las impurezas y sustancias relacionadas de doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* es preciso y exacto a la concentración del límite de cuantificación, que es 0.05% de analito respecto la concentración de principio activo presente en el *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que tanto el método de análisis de la doxiciclina como el método de análisis de sus sustancias relacionadas en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%* son métodos robustos y que permiten obtener resultados lineales en el rango evaluado para cada uno, selectivos, exactos y precisos en la determinación de la doxiciclina y de sus sustancias relacionadas en dicho producto.

Por lo tanto, se consideran validados los métodos de análisis de:

- Doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.
- Sustancias relacionadas de la doxiciclina en *PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) SP Veterinaria. *Medicamentos y nutricionales para el sector veterinario*. <https://spveterinaria.es/> (accessed 2022-05-30).
- (2) Jefatura del Estado. Real Decreto Ley 29/2006 de Garantías y Uso Racional Del Medicamento y Productos Sanitarios. *Boletín Oficial del Estado* 178 **2006**, 178, 1–99.
- (3) Robles, L. V. Los Excipientes y Su Funcionalidad En Productos Farmacéuticos Sólidos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* **2011**, 42 (1), 1–19.
- (4) Mealy, N. E.; Bayés, M. Doxycycline Hyclate. *Drugs of the Future* **2004**, 29 (4), 409–410. <https://doi.org/10.2165/00128415-201213840-00092>.
- (5) Holmes, N. E.; Charles, P. G. P. Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics* **2009**, 1. <https://doi.org/10.4137/cmt.s2035>.
- (6) European Pharmacopoeia 7.0. Doxycycline Hyclate. *01/2008:0272* 1898–1899.
- (7) Parlamento Europeo; Consejo de la Unión Europea. REGLAMENTO (UE) 2019/6 Sobre Medicamentos Veterinarios y Por El Que Se Deroga La Directiva 2001/82/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea* **2018**, 4, 43–167.
- (8) Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto Ley 249/2001 Por El Que Se Regula La Real Farmacopea Española. *Boletín Oficial del Estado* **2011**, 60, 8975–8977.
- (9) Ministerio de Sanidad y Consumo. Orden Por La Que Se Aprueba La Real Farmacopea Española. *Boletín Oficial del Estado* **1996**, 314, 38803–38804.
- (10) Comunidades Europeas. DIRECTIVA DE LA COMISIÓN Por La Que Se Establecen Los Principios y Directrices de Las Prácticas Correctas de Fabricación de Los Medicamentos Veterinarios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* **1991**, 228, 70–73.
- (11) Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto Ley 824/2010 Regulación de Los Laboratorios Farmacéuticos, Los Fabricantes de Principios Activos de Uso Farmacéutico y El Comercio Exterior de Medicamentos y Medicamentos En Investigación. *Boletín Oficial del Estado* **2010**, 165, 1–39.

- (12) Europeo, P.; Europea, C. de la U. DIRECTIVA 2004/10/CE Sobre La Aproximación de Las Disposiciones Legales, Reglamentarias y Administrativas Relativas a La Aplicación de Los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio y al Control de Su Aplicación Para Las Pruebas Sobre Las Sustancias Qu. *Diario Oficial de la Unión Europea* **2004**, 50 (95), 44–59.
- (13) Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto Ley 1369/2000 Por El Que Se Establecen Los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio y Su Aplicación En La Realización de Estudios No Clínicos Sobre Sustancias y Productos Químicos. *Boletín Oficial del Estado* **2000**, 173, 25832 a 25838.
- (14) European Medicines Agency. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *Prescrire International*. 2011, pp 2–6.
- (15) Castro Cels, M.; Gascón Fora, S.; Pujol Forn, M.; Sanc Roca, J. M.; Vicente Plas, L. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmaceúticos en la Industria 1989, pp 23–113.
- (16) Scott, J. F.; Walpole, R. E.; Myers, R. H. Probability and Statistics for Engineers and Scientists. *The Mathematical Gazette* **1973**, 57 (400). <https://doi.org/10.2307/3615376>.

A. ANEXOS

A1. Doxiciclina Hiclato y sus sustancias relacionadas

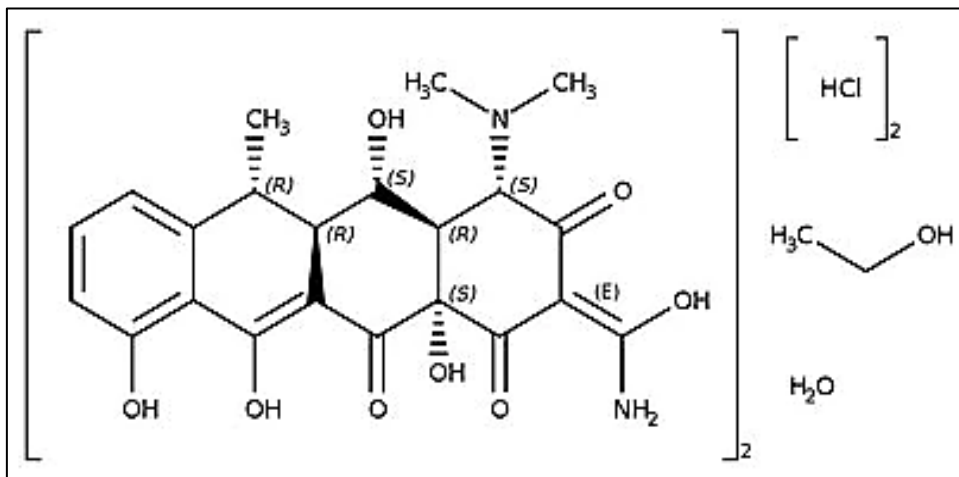


Figura 9. Doxycycline hyclate ($C_{22}H_{25}ClN_2O_8 \cdot \frac{1}{2}C_2H_6O \cdot \frac{1}{2}H_2O$).⁴

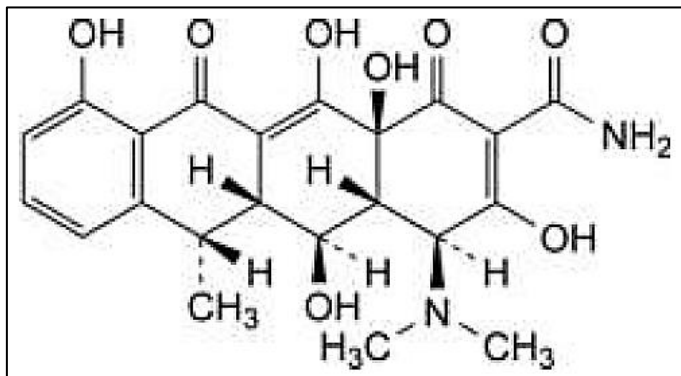


Figura 10. Impureza A.⁶

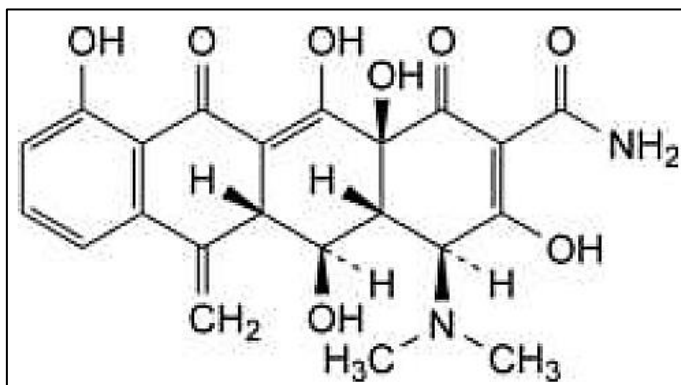


Figura 11. Impureza B.⁶

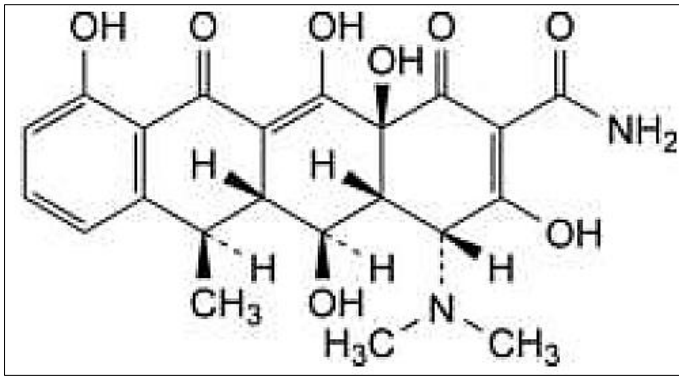


Figura 12. Impureza C.⁶

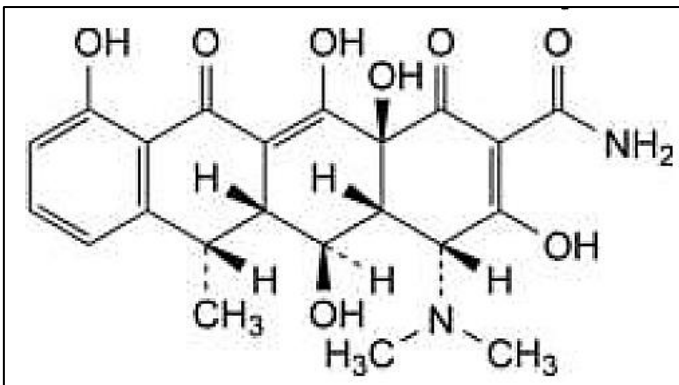


Figura 13. Impureza D.⁶

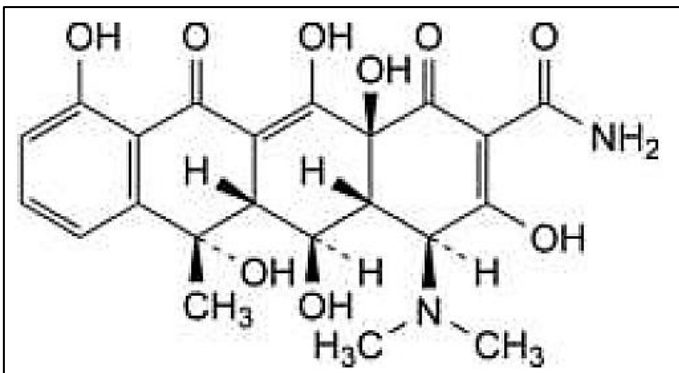


Figura 14. Impureza E.⁶

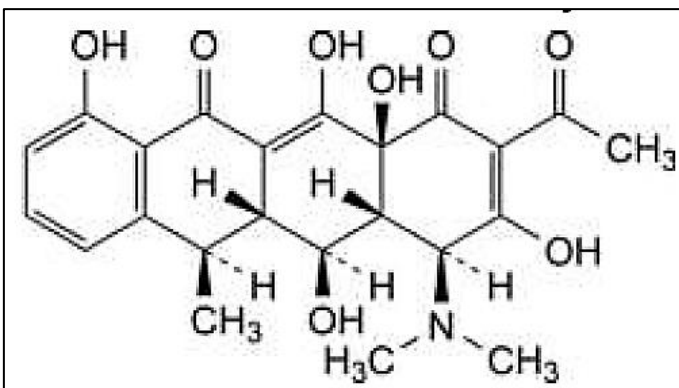


Figura 15. Impureza F.⁶

A2. Calendario

Tabla 39. Calendario de la planificación de las validaciones de método analítico.

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
MARZO	21	22	23	24	25
	Lectura preliminar de la información sobre el producto farmacéutico, el principio activo y el método de análisis. Planificación de la validación del método analítico de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> y redacción de su correspondiente protocolo.				
	28	01	30	31	01
	Planificación de la validación del método analítico de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> y redacción del protocolo.				Estab. patrón y MA100.
ABRIL	04	05	06	07	08
	Estab. FM y dil. t = 0	Estab. FM y dil. t = 1	Robustez	Estab. FM y dil. t = 3	Estabilidad FM y dil. t = 4
	11	12	13	14	15
	Selectividad Día 1 Precisión Int.	Exactitud Linealidad y Rango Día 2 Prec. Int.	Repetibilidad Día 3 Prec. Int.	Extracción de la información y los datos obtenidos durante la validación.	
	18	19	20	21	22
		Extracción de la información y los datos obtenidos durante la validación. Tratamiento de datos. Realización de los cálculos y test estadísticos.			
	25	26	27	28	29
	Redacción del informe de validación del método analítico de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> .				
	02	03	04	05	06
	Redacción del PNT del análisis para control de calidad de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> .				
09	10	11	12	13	
Lectura preliminar de la información sobre las sustancias relacionadas y el método de análisis. Planificación de la validación del método analítico de sustancias relacionadas de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> y redacción de su correspondiente protocolo.					
16	17	18	19	20	
Planificación de la validación del método analítico de sustancias relacionadas de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> y redacción del protocolo.			Estabilidad patrón y MI100.	Pruebas previas de LOQ y LOD.	
23	24	25	26	27	
Pruebas previas de LOQ y LOD.	Selectividad.	Repetibilidad. Día 1 Precisión Int.	Linealidad y Rango Exactitud Día 2 Precisión Int.	Día 3 Precisión Int.	
30	31	01	02	03	
LOQ, LOD	Extracción de la información y los datos obtenidos durante la validación. Tratamiento de datos. Realización de los cálculos y test estadísticos correspondientes.				
06	07	08	09	10	
	Redacción del informe de validación del método analítico de sustancias relacionadas de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> .				
13	14	15	16	17	
Redacción del PNT del análisis para control de calidad de sustancias relacionadas de Doxiciclina en <i>PRODUCTO FARMACÉUTICO 10%</i> .					
JUNIO					

A3. Cromatogramas

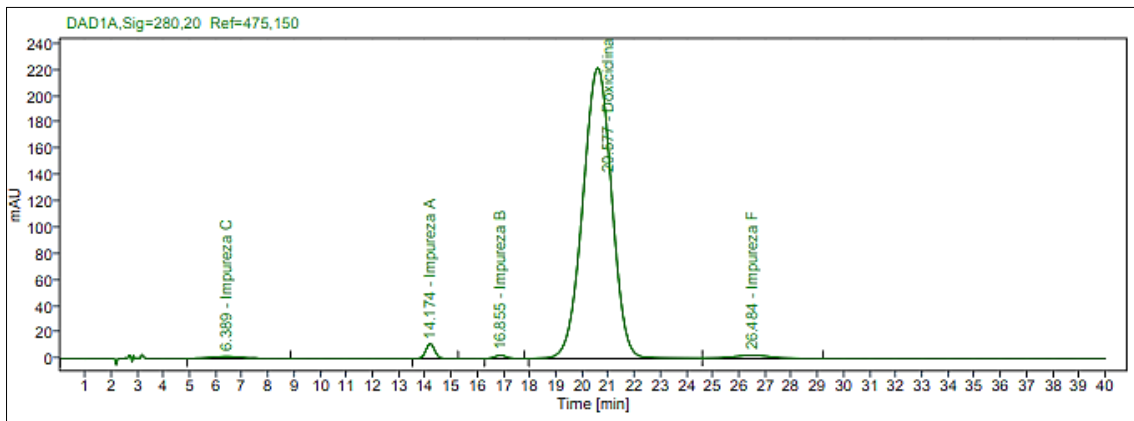


Figura 16. Cromatograma obtenido en el análisis del patrón para System Suitability.

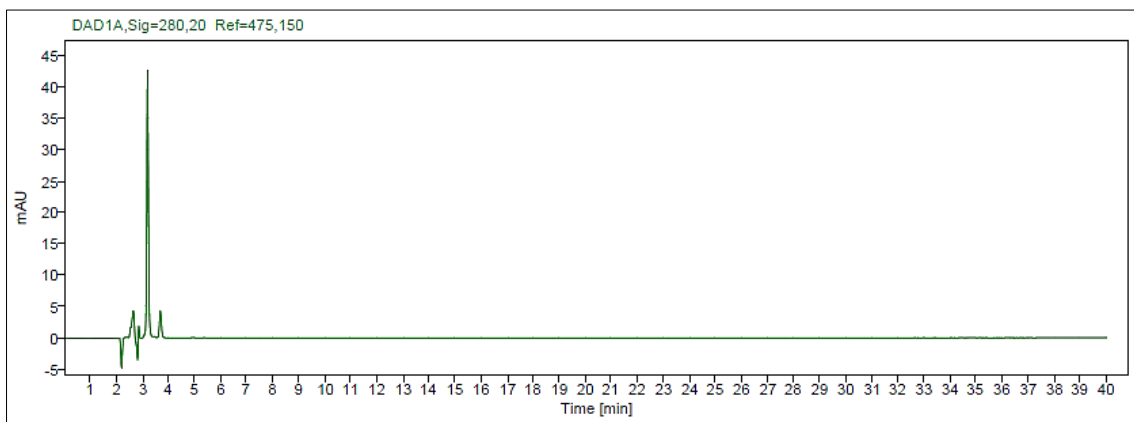


Figura 17. Cromatograma obtenido en el análisis de matriz (M).

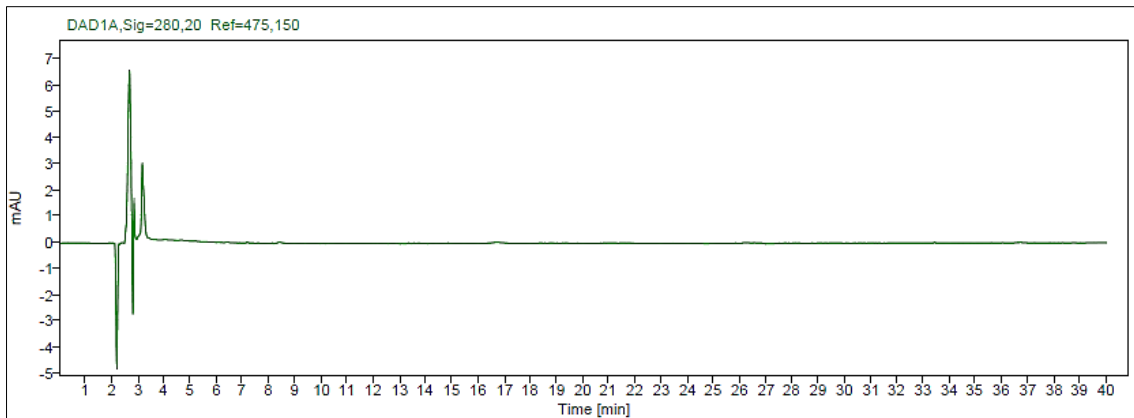


Figura 18. Cromatograma obtenido en el análisis de diluyente de muestras (Blanco).

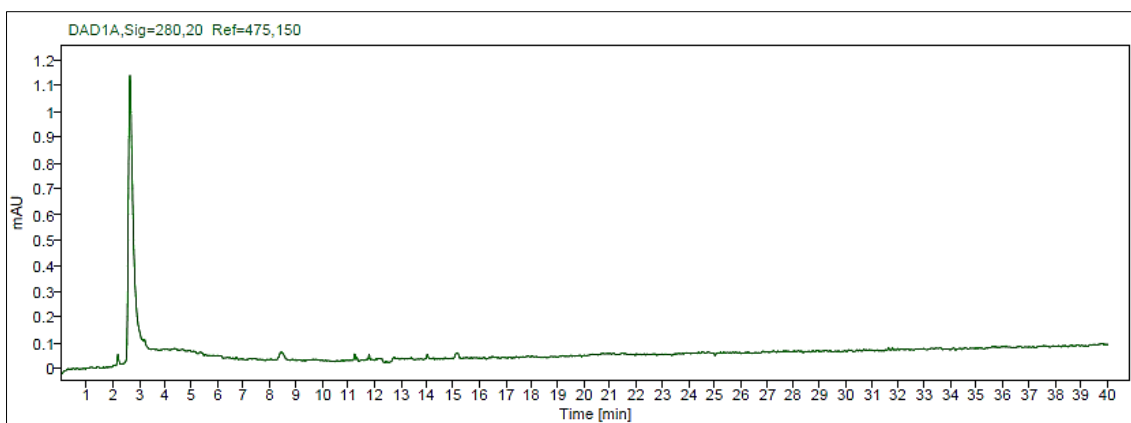


Figura 19. Cromatograma obtenido en el análisis de fase móvil.

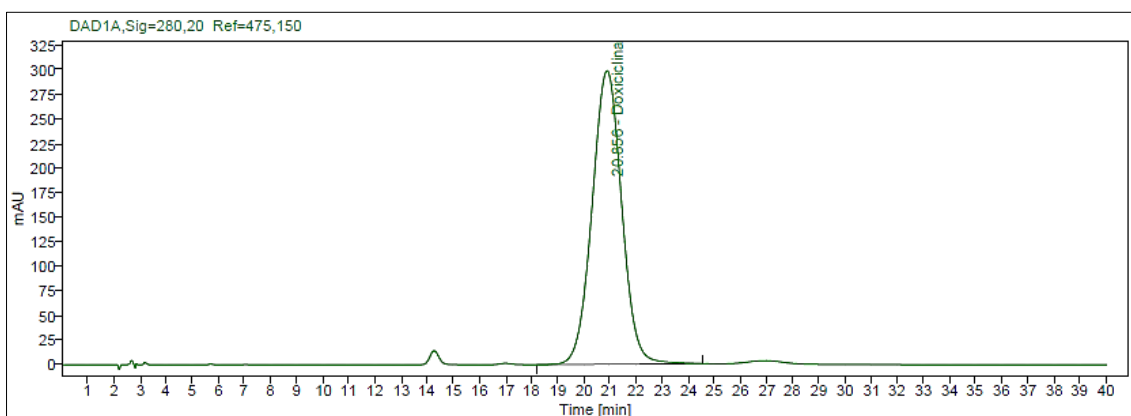


Figura 20. Cromatograma obtenido en el análisis de patrón de doxiciclina hclato para cuantificación de principio activo (A).

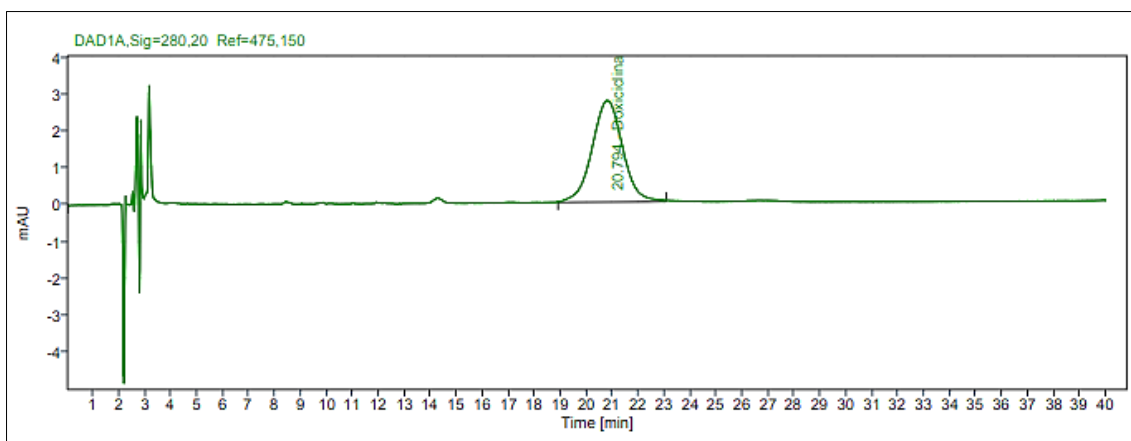


Figura 21. Cromatograma obtenido en el análisis de patrón de doxiciclina hclato para cuantificación de sustancias relacionadas (I).

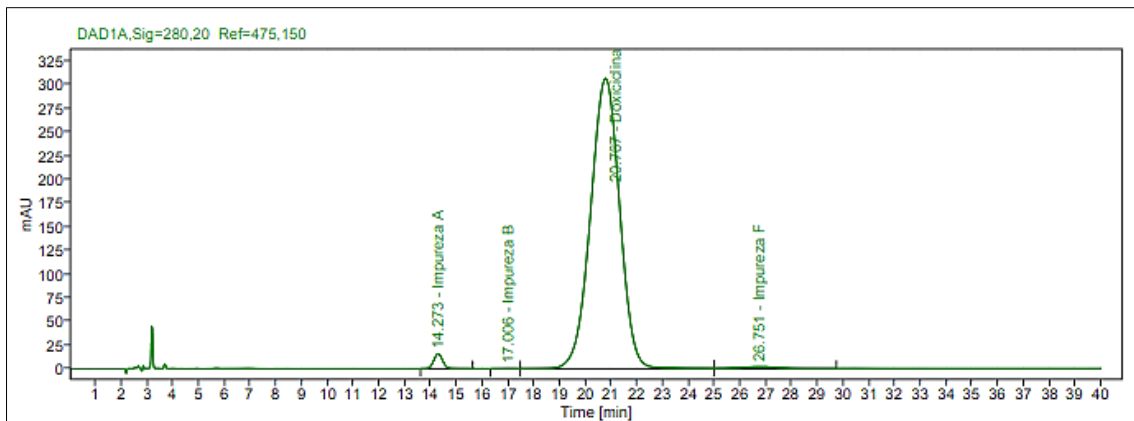


Figura 22. Cromatograma obtenido en el análisis de muestra MA100 (MA).

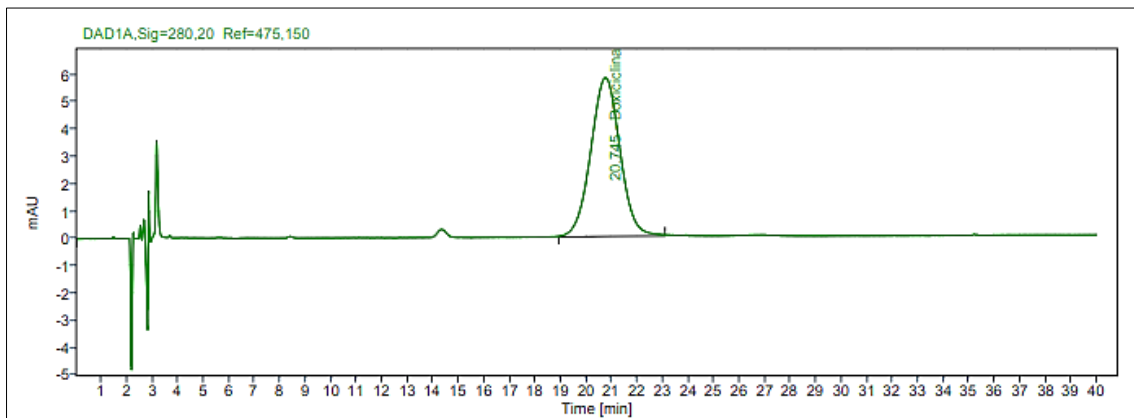


Figura 23. Cromatograma obtenido en el análisis de muestra MI100 (MI).