



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



VALIDACIÓ D'UN MÈTODE DE NETEJA PER UN MEDICAMENT D'ÚS VETERINARI MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ

TREBALL DE FI DE GRAU – GRAU EN QUÍMICA

GENER 2025

Alumne: Ainoa Colell Amposta

Tutor acadèmic: Anna Clotet Romeu

Empresa: Cenavisa S.L.

Tutora empresa: Sílvia Bertolí Inglés

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull expressar el meu més sincer agraïment a Cenavisa S.L. per haver-me donat l'oportunitat de dur a terme aquest treball i de fer les pràctiques externes en un entorn tan agradable. Agradeixo profundament la confiança dipositada en mi, així com els recursos, el temps i el suport necessari que m'han permès desenvolupar aquest projecte. Voldria destacar especialment la Maribel i en Roger, que han estat imprescindibles durant tot aquest camí. Gràcies per la seva dedicació, paciència i compromís.

Per altra banda, agraeixo també l'ajuda de la tutora acadèmica, Anna Clotet, pels seus consells i motivació que m'ha aportat durant aquest repte acadèmic.

També vull agrair a la meua família, que sempre ha estat al meu costat. Gràcies per donar-me suport en tot moment, per creure en mi fins i tot quan jo mateixa dubtava, i per oferir-me el suport necessari per tirar endavant. Els vostres consells i estima han estat fonamentals en aquest procés, no només acadèmic, sinó també personal.

No puc oblidar d'agrair a les meves amigues i amics, que han estat un refugi durant els moments d'estrès i dificultat. Gràcies per escoltar-me, per entendre'm i per saber treure'm un somriure en els moments més difícils. Tenir-vos a prop durant aquests anys ha sigut essencial.

Finalment, vull ressaltar que aquest treball és el resultat d'un esforç col·lectiu, en el qual he rebut l'ajuda, el suport i la confiança de moltes persones que han deixat una empremta significativa en aquest camí.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

1.	RESUM	6
	ABSTRACT	6
2.	OBJECTIUS	7
3.	INTRODUCCIÓ.....	8
4.	FONAMENTS TEÒRICS: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ	10
5.	PART EXPERIMENTAL	11
5.1	REACTIUS I MATERIAL.....	11
5.2	CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES	12
5.3	PROCÉS DE RECOLLIDA DE MOSTRES	13
5.4	OPTIMITZACIÓ DEL PROCÉS D'EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES.....	14
5.5	TRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES	15
5.6	VALIDACIÓ MÈTODE ANALÍTIC	16
5.6.1	LINEALITAT	16
5.6.2	SELECTIVITAT	17
5.6.3	PRECISIÓ	17
5.6.4	EXACTITUD	18
5.6.5	ROBUSTESA	18
6.	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	20
6.1	OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC	20
6.2	OPTIMITZACIÓ DEL TRACTAMENT DE LES MOSTRES.....	22
6.3	ESTABILITAT DE LES MOSTRES.....	27
6.3.1	ESTABILITAT EN SWAB	27
6.3.2	ESTABILITAT EN PLACA	29
6.4	VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC OPTIMITZAT	30
6.4.1	RESULTATS LINEALITAT	30
6.4.2	PRECISIÓ INTERMÈDIA.....	35
6.4.3	REPETIBILITAT DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	36
6.4.4	REPETIBILITAT DEL MÈTODE	38
6.4.5	EXACTITUD.....	39
6.4.6	SELECTIVITAT	40
6.4.7	ROBUSTESA.....	41
6.	CONCLUSIONS	42
7.	BIBLIOGRAFIA	44
8.	ANNEXOS.....	45
8.1	ANNEX 1: Taula de seguretat dels reactius	45
8.2	ANNEX 2: Cromatogrames referents a la selectivitat.....	46

ACORD DE CONFIDENCIALITAT

Amb l'objectiu de preservar la privacitat i seguretat de la informació inclosa, el document que es presenta ha estat censurat parcialment. Les dades subjectes a confidencialitat han estat eliminades o substituïdes per informació genèrica, sense comprometre la comprensió del treball ni els objectius acadèmics.

1. RESUM

Els laboratoris farmacèutics treballen amb estàndards de qualitat per tal d'assegurar que els medicaments siguin segurs, eficaços i de qualitat. Per aconseguir-ho, i d'acord amb les Normes de Correcta Fabricació, tot els procediments com per exemple els processos de fabricació, les neteges, els mètodes analítics etc., han d'estar correctament validats.

Aquest treball de fi de grau es centra en la validació d'un mètode de neteja per a determinar dos principis actius, el PA 1 i el PA2 , presents en un medicament veterinari. S'utilitza la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC¹), per tal d'assegurar la neteja completa de les restes d'aquests compostos en l'equip de producció. S'han establert i optimitzat diversos paràmetres analítics, com la selecció de condicions cromatogràfiques i l'estudi de la linealitat, per aconseguir un mètode fiable i robust. Aquesta validació és essencial per complir amb les normatives de qualitat en la producció de medicaments veterinari i garantir la seguretat dels animals.

ABSTRACT

Pharmaceutical laboratories work according to quality standards to ensure that medicines are safe, effective, and of high quality. To achieve this, and in compliance with Good Manufacturing Practices, all procedures such as manufacturing processes, cleaning, analytical methods, etc., must be properly validated.

This study is focused on the validation of a cleaning method to determine two active principles (PA1 and PA2) found in a veterinary medicinal product. High-performance liquid chromatography (HPLC¹) is used to ensure the complete clean-up of the traces of these compounds in the production equipment. Several analytical parameters, such as the selection of chromatographic conditions and the study of linearity, have been established and optimized to achieve a reliable and robust method. This validation is essential to comply with quality regulations in veterinary drug production and to ensure animal safety.

¹ High Performance Liquid Chromatography

2. OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquest treball és desenvolupar, optimitzar i validar un mètode analític, mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució, per analitzar mostres d'una validació de neteja d'un procés de fabricació d'un producte farmacèutic que conté dos principis actius.

A partir de l'objectiu principal, deriven altres objectius més concrets els quals es mencionen a continuació:

- Desenvolupar un mètode amb un temps d'anàlisi eficient per reduir el temps que es triga a obtenir resultats.
- Optimitzar el mètode per a analitzar diferents tipus de mostres com ara de superfície (SWAB) i aigües d'esbandit.
- Validar el mètode per tal de demostrar que s'ha obtingut un mètode selectiu, sensible, robust i reproduïble, capaç d'obtenir resultats veraces en el rang d'aplicació.

3. INTRODUCCIÓ

Aquest Treball de Fi de Grau s'ha dut a terme a Cenavisa S.L. Aquesta empresa és un laboratori farmacèutic veterinari europeu amb molts anys d'experiència i amb una extensa xarxa comercial.

L'empresa s'especialitza amb la investigació, el desenvolupament, la fabricació i la comercialització de productes veterinaris destinats a la producció animal. El compromís de l'empresa amb la qualitat, la seguretat i l'eficàcia ha obtingut reconeixement a escala nacional i internacional¹.

La fabricació de medicaments d'ús veterinari és de gran importància per garantir el benestar i la salut dels animals, i conseqüentment, la salut pública. En l'actualitat, els fàrmacs veterinaris tenen un paper molt important a l'hora de prevenir, controlar i tractar malalties tant en animals domèstics com en animals de granja.

La qualitat durant el procés de fabricació és crucial per assegurar que els fàrmacs no contenen cap mena de contaminació, però també per saber que són segurs i eficaços. És per això que les empreses del sector farmacèutic han de respectar les Normes de Correcta Fabricació, també conegudes com a *Good Manufacturing Practices* (GMP), entre d'altres².

Al llarg dels últims anys, el control de qualitat en la indústria farmacèutica ha experimentat millores significatives, impulsades per una combinació d'avanços tecnològics, normatives més estrictes i una major consciència sobre la importància de la qualitat. La implementació de tecnologies avançades, com l'anàlisi en temps real i l'automatització de processos, ha permès un monitoratge més precís i eficient en totes les etapes de producció³.

A més, les agències reguladores han elevat els estàndards de qualitat, fet que ha portat a les empreses a adoptar pràctiques més rigoroses i transparents⁴. En aquest context, moltes organitzacions han conreat una cultura de qualitat que emfatitza la millora contínua i la formació del personal, assegurant que tots els empleats se sentin compromesos amb la qualitat del producte.

Habitualment els departaments de control de qualitat i garantia de qualitat són els principals encarregats de realitzar diversos tipus de validacions, les quals són essencials per a garantir que els processos i sistemes compleixin amb els estàndards de qualitat i seguretat⁵. Entre aquestes, la validació de processos de fabricació s'enfoca a avaluar i documentar el procés de fabricació per a assegurar la consistència i el compliment d'especificacions establertes per cada un dels productes⁶.

Un altre aspecte important a contemplar és la validació de neteja. Aquest és el procediment que garanteix que els procediments de neteja d'equips i àrees de producció són efectius i capaços d'eliminar qualsevol residu, evitant la contaminació creuada⁷.

Les validacions de neteja en les empreses farmacèutiques són fonamentals per diverses raons interrelacionades. En primer lloc, garanteixen la seguretat del pacient en assegurar que no quedin residus de productes anteriors en els equips, la qual cosa podria contaminar nous lots i posar en risc la salut dels qui utilitzen els medicaments. A més, aquestes validacions són

necessàries per a complir amb les estrictes normatives de salut, que exigeixen estàndards de qualitat i seguretat en tots els processos⁸.

D'altra banda, la integritat del producte també està en joc, ja que una neteja inadequada pot afectar la qualitat i eficàcia dels medicaments, compromentent el seu rendiment i la confiança dels consumidors. Així mateix, les validacions ajuden a prevenir la contaminació creuada entre diferents productes, la qual cosa és especialment crítica en la fabricació de medicaments amb formulacions diverses. A més a més, des d'una perspectiva operativa, comptar amb processos de neteja validats optimitza el temps d'inactivitat dels equips i millora la productivitat general de la planta⁹.

Tal com s'ha mencionat anteriorment, en els laboratoris de les indústries farmacèutiques s'utilitzen diverses tècniques analítiques, com ara la cromatografia líquida, la cromatografia de gasos i les determinacions potenciomètriques, entre altres, que se seleccionen en funció de l'aplicació específica¹⁰. A causa de la gran varietat de mostres que s'analitzen i la complexitat d'alguns mètodes, és fonamental realitzar una validació per a garantir que aquestes tècniques siguin fiables. La validació assegura que els mètodes utilitzats generin resultats precisos i consistents, la qual cosa és essencial per a obtenir dades de qualitat i prendre decisions basades en ells. El fet de validar els mètodes analítics, redueix la possibilitat d'errors en les anàlisis i s'assegura que els resultats siguin de confiança en totes les etapes de producció¹¹.

Diversos organismes reguladors al voltant del món, com ara la EMA (*European Medicines Agency*) a Europa¹², la FDA (Food and Drug Administration) als Estats Units¹³ o la PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) al Japó¹⁴, imposen regulacions sobre la validació de mètodes analítics, generalment seguint directrius internacionals com les de la ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)¹⁵. Això assegura que els medicaments fabricats en diferents països siguin de qualitat i segurs per als pacients.

A més, un mètode validat permet controlar la variabilitat en els processos analítics i facilita la identificació de qualsevol desviació o font d'error. Això contribueix a la millora contínua i a l'optimització dels procediments de fabricació, la qual cosa al seu torn augmenta l'eficiència operativa, minimitza riscos i redueix el desaprofitaement de recursos. A més a més, aquests procediments també són essencials per a la realització d'estudis d'estabilitat, que permeten determinar la vida útil dels productes i garantir que es mantinguin efectius durant tot el període de validesa.

D'altra banda, la validació també assegura que el procés estigui documentat de manera adequada, la qual cosa facilita la traçabilitat dels resultats i permet complir amb els requisits d'auditories tant internes com externes. Aquesta documentació és vital per a demostrar que els mètodes analítics són adequats i compleixen amb les normatives reguladores, la qual cosa és necessari per a la comercialització dels productes.

En aquest treball, s'exposa el desenvolupament, l'optimització i la validació d'un mètode analític per cromatografia líquida d'alta resolució per determinar dos principis actius en mostres de validacions de neteja del procés de fabricació.

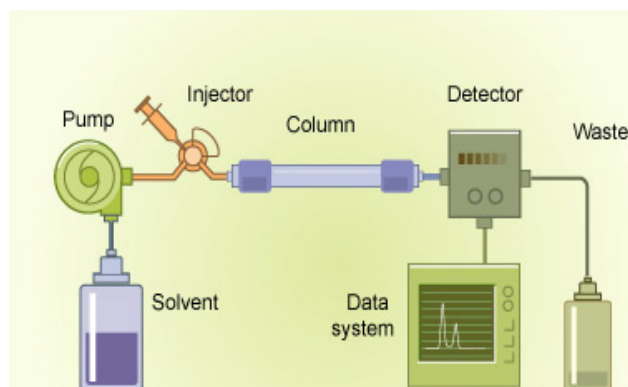
El PA1 és un principi actiu antimicrobià que pertany al grup de les sulfonamides. L'altre principi actiu que trobem és el PA2, que es classifica com una pirimidina modificada, pel fet que la seva estructura bàsica conté un anell de pirimidina amb grups funcionals addicionals.

Aquests principis actius es poden analitzar conjuntament mitjançant la tècnica analítica de cromatografia líquida d'alta resolució a causa de les seves propietats fisicoquímiques similars, com ser bases febles amb estructures químiques compatibles per a la separació en una columna. Tots dos compostos poden ser detectats eficientment mitjançant tècniques UV-Visible, ja que la seva estructura absorbeix en regions de l'espectre molt properes entre els 260 i 280 nm. A més, la tècnica de HPLC és molt versàtil i permet optimitzar una sèrie de condicions cromatogràfiques, com ara el tipus de columna i la fase mòbil, per aconseguir una separació adequada.

4. FONAMENTS TEÒRICS: CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ

La cromatografia de líquids d'alta resolució és una tècnica cromatogràfica capaç de separar, identificar i quantificar analits en dissolució. És una tècnica ràpida que permet analitzar una àmplia gamma d'analits de manera eficient i precisa. S'utilitza sovint per a l'anàlisi en laboratoris que realitzen control de qualitat i garantia de qualitat, així com per a proves mediambientals i aliments¹⁶.

Les principals parts d'un cromatògraf de líquids d'alta resolució són: una bomba, un injector, una columna i un detector. A la imatge 1 que es troba a continuació, es poden veure les parts d'un cromatògraf de líquids.



Imatge 1: Esquema de les parts d'un cromatògraf de líquids

Una separació mitjançant HPLC implica la injecció d'un volum petit d'una mostra líquida en una columna que conté partícules de mida petita (de 3 a 5 μm) les quals formen la fase estacionària. Els components de la mostra flueixen a través de la columna gràcies a la fase mòbil a alta pressió subministrada per una bomba¹⁶.

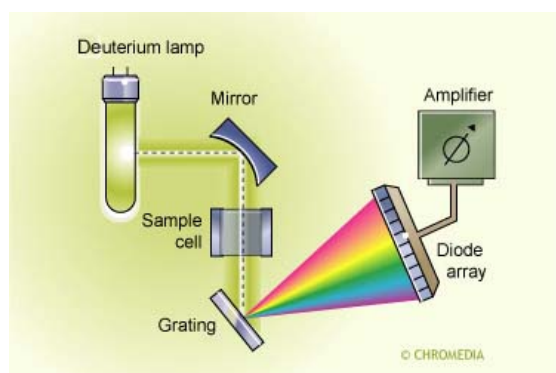
Les diverses interaccions químiques o físiques entre les molècules de la mostra i les partícules de la fase estacionària defineixen les propietats de selectivitat de la columna. Hi ha una gran varietat de columnes cromatogràfiques per tal de tenir un ampli ventall de compostos que es puguin separar amb una selectivitat adequada¹⁶.

Existeixen dos tipus de cromatografia de líquids d'alta resolució; fase normal o fase inversa. Les molècules amb una polaritat cromatogràfica similar tendeixen a atraure's entre si. És per això que en cromatografia de fase normal les substàncies no polars s'elueixen abans i les substàncies polars es detecten a temps de retenció més elevats. En canvi, en la cromatografia de fase inversa són les substàncies polars les que passen menys temps a la columna¹⁶.

Aquests components de la mostra, un cop separats, es detecten i es mesuren en sortir de la columna mitjançant un detector.

Els detectors poden ser universals, els quals detecten analits mitjançant la relació amb la massa, o específics, que són dissenyats per a substàncies específiques mitjançant propietats característiques, com ara la conductivitat, la fluorescència, l'absorció UV-Visible, entre altres¹⁶.

En aquest treball s'utilitza el detector DAD (*Detector de Array de Diodes*). Aquest detector, basat en l'absorció UV-Visible, està format per un conjunt de díodes que registren contínuament el senyal en unes posicions específiques i en un rang de longitud d'ona establert. Aquest detector també permet mesurar diverses longituds d'ona de manera simultània. Un cop es disposa de totes les dades, aquestes s'ajunten per a obtenir un espectre UV¹⁶. A la següent imatge (Imatge 2) podem observar un esquema amb les parts d'un detector DAD.



Imatge 2: Esquema detector DAD

5. PART EXPERIMENTAL

5.1 REACTIUS I MATERIAL

Els reactius necessaris per a dur a terme aquesta validació són els següents (es troba la taula de seguretat dels reactius utilitzats a l'Annex 1).

- Acetonitril (ACN)
- Àcid acètic glacial
- Metanol (MeOH)
- Hidròxid de sodi 0.5M (NaOH)
- Trietanolamina
- Trietilamina

A continuació, s'anomena el material que s'ha utilitzat per dur a terme la part experimental:

- Agitador vòrtex
- Bany d'ultrasons
- Bomba de filtració
- Cromatògraf de líquids d'alta resolució Agilent Technologies System, amb bomba quaternària, injector automàtic i detector DAD.
- Filtres de Nylon 0,2µm
- Micropipeta automàtica de volum variable de 100-1000 µl i de 1-5 ml
- Pipeta de vidre de doble enràs de 5ml
- Pipeta *Pasteur* de plàstic
- SWAB : *Sampling Swab Large* 125 mm de llargària (25 mm de punta). Isòtop de polièster
- Vials de vidre de 20 ml amb coll de rosca

5.2 CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

Les condicions cromatogràfiques del mètode analític van ser optimitzades amb l'objectiu d'obtenir un mètode ràpid, selectiu i eficaç (veure apartat 6.1). A continuació, es mostren les condicions cromatogràfiques establertes per aquest mètode analític (veure Taula 1).

Columna cromatogràfica	Columna de fase inversa amb grups funcionals C18		
Dissolvent de les mostres	Dissolvent 3 (75/25)		
Fase mòbil	CANAL A: Part aquosa (997 ml H ₂ O MilliQ, 3 ml Trietilamina i 2 ml Àcid acètic glacial) CANAL B: Acetonitril		
Temperatura de la columna	60°C		
Volum d'injecció	20 µl		
Flux	1,2 ml/min		
Pressió	200 bar		
Temps cromatograma	8 min + 2 min de postrun		
Longitud d'ona	260 nm, 4nm; Ref: 490nm, 100nm (PA1) 280 nm, 4nm; Ref: 490nm, 100nm (PA2)		
Gradient	Temps (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
	0,0	95	5
	1,5	95	5
	5,0	90	10
	8,0	90	10

Taula 1: Condicions cromatogràfiques establertes per al mètode

5.3 PROCÉS DE RECOLLIDA DE MOSTRES

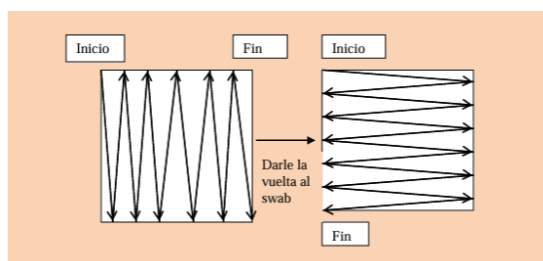
Les mostres es recullen fent un mostreig de les diferents superfícies del reactor de fabricació un cop ha finalitzat l'etapa de neteja de l'equip de fabricació complet. La superfície mostrejada és un paràmetre important que s'ha de fixar per tal de mostrejar sempre la mateixa àrea. És per això que durant les etapes de desenvolupament, optimització i validació del mètode, s'utilitzen plantilles d'acer de 10 x 10 cm, que simulen les parets del reactor. Les mostres es recullen fent servir una escombreta o *swab*. El *swab* és un petit bastonet amb una punta recoberta d'un material absorbent que s'usa per fregar la superfície d'un material i recollir les restes de principis actius i altres compostos que hagin pogut quedar a la superfície després de l'etapa de neteja¹⁷.

La selecció del *swab* és essencial per assegurar una extracció eficaç de les mostres. Els *swabs* poden estar fabricats per diversos materials, com ara Nylon, polièster o cotó. La selecció d'aquest material depèn de la naturalesa dels contaminants que es volen detectar, en aquest cas s'utilitzen *swabs* de fibres sintètiques de polièster per extraure el PA1 i el PA2. La Imatge 3 mostra els *swabs* que s'han emprat per al desenvolupament d'aquest mètode analític.



Imatge 3: Swab de fibres sintètiques de polièster

Per tal de recollir la mostra, s'humecta el *swab* amb aigua ultrapura, s'extreu l'excés d'aigua i es frega per la superfície d'interès sempre amb el mateix procés (veure Imatge 4) per tal d'assegurar que el procés de recollida de mostra és el més reproduïble possible i també per garantir que la quantitat de cada un dels principis actius recollits sigui tant representativa com sigui possible.



Imatge 4: Forma establerta de passar el swab per la superfície

Un cop s'han recollit les mostres, aquestes s'introdueixen en un vial de coll de rosca de vidre net i sec. Aquestes mostres es guarden en nevera per garantir que les mostres es preserven correctament sota unes condicions de temperatura i humitat controlades.

5.4 OPTIMITZACIÓ DEL PROCÉS D'EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES

Donat que els analits es troben retinguts en el material absorbent del *swab*, cal realitzar una etapa d'extracció sòlid-líquid per extreure el PA1 i el PA2 i posteriorment ser injectats al cromatògraf. Donat el gran volum de mostres que s'extreuen dels processos de validació de neteja, la necessitat d'obtenir resultats ràpidament i del consum de dissolvents que es genera, es fixa com a objectiu obtenir un procés d'extracció senzill, ràpid i fàcil de reproduir per analistes.

Per tal d'optimitzar aquesta etapa d'extracció, s'han dopat els *swabs* directament amb una concentració coneguda, amb la finalitat d'obtenir valors de recuperació dels analits per poder escollir les millors condicions d'extracció.

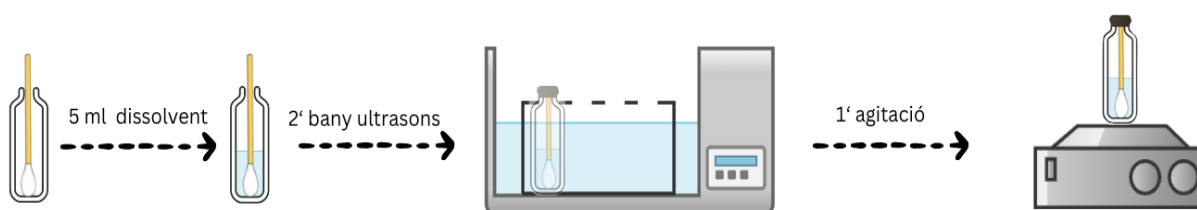
S'avaluen diversos paràmetres que poden afectar a la recuperació dels analits, els quals es troben mencionats a continuació:

- Tipus de dissolvent
- Volum del dissolvent
- Temps al bany d'ultrasons
- Temps amb agitació al vòrtex

Les condicions optimitzades del procés d'extracció de la mostra són les següents:

1. En primer lloc, s'afegeix 5 ml de dissolvent 3 a una proporció 75/25.
2. A continuació, es porta al bany d'ultrasons durant 2 min.
3. Finalment, s'agita durant 1 min al vòrtex.

A continuació s'adjunta un esquema (Imatge 5) dels passos que es segueixen per dur a terme l'extracció sòlid líquid dels dos principis actius.



Imatge 5: Extracció sòlid líquid

5.5 TRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

La demostració de l'estabilitat de la mostra i els patrons durant el període de temps entre la seva preparació i la finalització de l'anàlisi, especialment quan s'utilitzen equips automàtics on les mostres poden romandre hores abans de ser analitzades, és necessària per saber com s'ha de fer el tractament i la conservació de les mostres.

Per determinar aquest paràmetre es van fer diverses proves durant diversos dies consecutius per tal d'observar l'estabilitat tant en *swab* com en plaques d'acer inoxidable. Es prepara una solució de 100 ppm dels dos principis actius per poder dopar-les.

5.5.1 ESTABILITAT EN SWAB

Per tal de saber si el temps que passa des de la recollida de la mostra en *swab* fins a la seva anàlisi afecta la mostra, es duu a terme aquesta prova.

En primer lloc, es dopen plaques durant quatre dies consecutius amb 500 µl d'una solució de 100ppm (amb els dos principis actius) i els *swabs* de les extraccions es guarden a la nevera fins al dia de l'anàlisi. A continuació es pot observar detalladament que s'ha preparat cada dia durant el període establert:

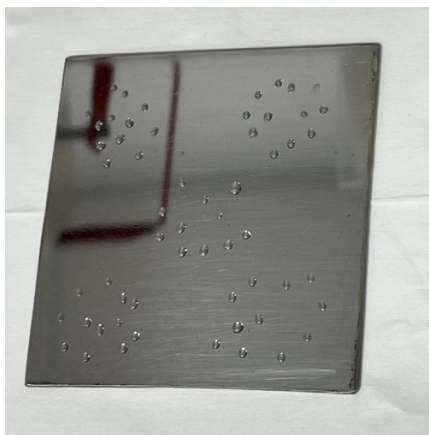
DIA 1→ Es dopen 6 plaques i es deixen assecar fins a l'endemà.

DIA 2→ Extracció amb *swab* de les plaques del dia 1 i es dopen 6 plaques.

DIA 3→ Extracció amb *swab* de les plaques del dia 2 i es dopen 6 plaques.

DIA 4→ Extracció amb *swab* de les plaques del dia 3.

DIA 5→ Injecció de les extraccions a l'equip.



Imatge 6: Placa recient dopada amb la solució de 100 ppm

De tal manera que els *swabs* obtinguts el dia 2 han estat 72 hores, els del dia 3 un total de 48 hores i els del dia 4 han estat 24 hores en el *swab* fins la seva extracció i injecció. I d'aquesta manera, es pot avaluar l'estabilitat en el temps de 0 a 72 hores.

A més a més, es prepara una recta de calibratge per quantificar els analits i cada dia s'introduirà en un vial la solució amb la qual es dopen les plaques per saber si al llarg dels dies la solució s'ha degradat o pateix algun canvi.

Els resultats de l'estabilitat en *swab* es troben a l'apartat 6.3.1.

5.5.2 ESTABILITAT EN PLACA

La finalitat de determinar l'estabilitat en placa és perquè hi ha cops en que el reactor es neteja però fins al cap de tres dies no es pren mostra amb el *swab* per quantificar els principis actius. Amb aquesta prova, es pretén determinar si aquest temps pot afectar-nos a l'hora de l'anàlisi.

Les plaques es dopen amb 500 µl de la solució preparada i es deixen a temperatura ambient fins al dia de l'anàlisi. En resum:

DIA 1→ Es dopen les plaques 1 i 2.

DIA 2→ Es dopen les plaques 3 i 4.

DIA 3→ Es dopen les plaques 5 i 6.

DIA 4→ Extracció amb *swab* de les plaques i injecció a l'equip.

En el cas de les plaques, ens trobem en que les plaques del dia 1 han estat 72 hores, les del dia 2 un total de 48 hores i les del dia 3 han estat 24 hores preparades fins a dur a terme l'extracció i seguidament la injecció a l'equip.

Els resultats de l'estabilitat en placa es troben a l'apartat 6.3.2.

5.6 VALIDACIÓ MÈTODE ANALÍTIC

La validació d'un mètode analític consisteix a aportar evidència documental que demostrï que un procediment serà capaç de generar resultats precisos i exactes, dins dels límits i especificacions establerts prèviament¹⁸. Desenvolupar una validació permet:

- Assegurar que els mètodes són apropiats per les anàlisis previstes en les condicions descrites.
- Treballar amb mètodes que ofereixen confiança i seguretat en els resultats obtinguts.
- Reduir els errors i la necessitat de repeticions, amb l'estalvi associat.
- Complir amb les exigències legals relatives al registre d'especialitats farmacèutiques i a les GMP.

5.6.1 LINEALITAT

La linealitat d'un mètode analític es defineix com la capacitat d'obtenir resultats de proves que siguin proporcionals a la concentració d'analits en mostres dins d'un rang determinat⁹. En aquest estudi, s'ha dut a terme l'avaluació de la linealitat del PA1 i PA2 en el rang de treball òptim per la determinació d'aquests principis actius en els nivells acceptables i permesos després de les etapes de neteja dels equips de fabricació.

La determinació de la linealitat s'ha realitzat en un interval de concentració d'1 a 250 ppm per a cada un dels principis actius. Es van establir 10 nivells a les concentracions d'1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 i 250 ppm. Cada un dels nivells es prepara per triplicat, a partir de 3 solucions mare diferents, amb l'objectiu d'assegurar la fiabilitat dels resultats.

Els resultats d'aquest test es troben a l'apartat 6.4.1

5.6.2 SELECTIVITAT

La selectivitat en un mètode analític que es defineix com la capacitat per mesurar amb precisió o de forma inequívoca un analit en presència d'interferències. En cromatografia líquida es pot optimitzar la selectivitat mitjançant la selecció de columnes òptimes, així com establint condicions cromatogràfiques com ara la composició de la fase mòbil, la temperatura de la columna i la longitud d'ona del detector⁹. Per tal de verificar que el mètode plantejat és selectiu es van injectar les solucions que s'indiquen continuació:

- Dissolvent no filtrat
- Dissolvent filtrat
- H₂O no filtrada
- H₂O filtrada
- Extracció d'un *swab* estèril no filtrada
- Extracció d'un *swab* estèril filtrada
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb dissolvent i no filtrada
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb dissolvent i filtrada
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb H₂O i no filtrada
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb H₂O i filtrada
- Extracció no filtrada d'un *swab* dopat amb una solució de 10ppm enrasada amb dissolvent
- Extracció filtrada d'un *swab* dopat amb una solució de 10 ppm enrasada amb dissolvent.

Les mostres es filtren amb un filtre de xeringa de niló de 0,45 µm.

5.6.3 PRECISIÓ

La precisió d'un mètode expressa la proximitat (grau de dispersió) entre una sèrie de mesures obtingudes a partir de la mateixa mostra. La precisió es pot estudiar a tres nivells: la repetibilitat, la precisió intermèdia i la reproductibilitat⁹.

- La repetibilitat és la mesura de la precisió del mètode amb les mateixes condicions operatives (equip, reactius, analista, laboratori) i en un període de temps curt.
- La precisió intermèdia avalua la precisió enfront a variacions dins del laboratori. Per exemple diferents dies, diferents analistes, diferents equips, etc.
- La reproductibilitat expressa la precisió dels resultats d'un mètode analític sobre la mateixa mostra però en condicions diferents (diferents analistes, equips, dies, etc.).

En aquest treball s'ha avaluat la repetibilitat (del mètode i del sistema instrumental) així com la precisió intermèdia. Malauradament, no ha existit la possibilitat d'avaluar la reproductibilitat amb un laboratori diferent.

La precisió intermèdia s'ha avaluat durant tres dies i per dos analistes diferents (Analista 1, redactora d'aquest treball i l'Analista 2, un dels companys i tècnic del laboratori). Aquest test s'ha avaluat a dos nivells de concentració diferents realitzant preparatives per triplicat.

La repetibilitat del mètode s'ha avaluat a dos nivells de concentració diferents, realitzant un total de 6 preparatives independents per a cada un dels nivells.

Per altra banda, per avaluar la repetibilitat del sistema instrumental s'ha injectat per sextuplicat un mateix patró de PA1 i PA2 a dos nivells de concentració per conèixer la variabilitat dels resultats produïda per l'equip.

Per l'avaluació dels resultats i el càlcul de les recuperacions s'ha injectat una recta de calibratge en el rang de treball per cada un dels tests indicats.

Els resultats d'aquest test es troben als apartats 6.4.2, 6.4.3 i 6.4.4.

5.6.4 EXACTITUD

L'exactitud és aquell paràmetre que expressa la proximitat entre el valor que és acceptat com a valor teòric i el valor trobat experimentalment. També es pot definir com la capacitat del mètode analític per proporcionar resultats més propers al valor teòric⁹.

Aquest paràmetre s'ha estudiat a tres nivells de concentració (1, 25 i 250 ppm) per tal d'avaluar-ho en tot el rang de treball. Es van preparar per triplicat cada una de les concentracions i es va calcular la recuperació obtinguda per tal de conèixer l'error del valor calculat respecte del valor de concentració teòric.

Els resultats d'aquest test es troben a l'apartat 6.4.5.

5.6.5 ROBUSTESA

Les proves de robustesa examinen l'efecte que tenen els paràmetres operatius en els resultats de l'anàlisi. Per determinar la robustesa, es canvien alguns paràmetres cromatogràfics (caudal, temperatura, volum d'injecció...) dins d'un rang realista. Si la influència quantitativa que es determina es troba dins d'una tolerància especificada prèviament, es pot concloure que el paràmetre es troba dins el rang de robustesa⁹.

Per a aquesta validació s'ha utilitzat el mètode Youden-Steiner. Aquesta, és una tècnica estadística que permet avaluar la robustesa i identificar els paràmetres que aplicant una petita variació, produeixen un major impacte en el resultat analític⁹.

Aquest test es fa servir per comprovar que el mètode analític proposat és robust i, per tant, no es veu afectat en petites variacions que es poden produir de forma aleatòria durant el procés analític rutinari. En aquest treball s'han seleccionat els paràmetres que es consideren més importants a tenir en compte així com aquells paràmetres que es poden veure afectats amb més facilitat. En la Taula 2 es mostren els paràmetres que s'han volgut estudiar en el test de robustesa.

Factor	Factor nominal	Factor	Factor alternatiu
A	Volum d'injecció (20µl)	a	Volum d'injecció (60µl)
B	Temperatura 60°C	b	Temperatura 55°C
C	Flux: 1,2 ml/min	c	Flux: 1,0 ml/min
D	Fase aquosa amb trietilamina	d	Fase aquosa amb trietanolamina
E	Columna utilitzada	e	Columna nova
F	Neteja d'agulla: activada	f	Neteja d'agulla: desactivada
G	Mostres sense refrigeració	g	Mostres amb refrigeració

Taula 2: Paràmetres seleccionats per avaluar la robustesa

Els resultats d'aquest test es troben a l'apartat 6.4.6 d'aquest treball.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1 OPTIMITZACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC

Inicialment, el laboratori on s'ha desenvolupat aquest treball, disposava d'un mètode analític optimitzat i validat per la determinació de PA1, PA2 i també per a les substàncies relacionades d'ambdós principis actius per a un medicament. Es poden veure les condicions d'aquest mètode analític a la Taula 3. Aquest mètode dura 30 minuts i treballa sota condicions de gradient per eluir el PA1, el PA2 i totes les impureses evitant la superposició dels diferents compostos.

Donat que es vol obtenir un mètode per determinar únicament els principis actius, s'optimitzen diversos paràmetres per obtenir un mètode més curt que permeti obtenir els resultats amb menys temps d'anàlisi. Els paràmetres que s'han optimitzat són el gradient, el temps d'anàlisi i el volum d'injecció.

Mètode inicial de partida			
Columna cromatogràfica	XBridge BEH C18 (Waters) (100mm x4.6mmx 2.5 µm)		
Fase mòbil	CANAL A: Part aquosa (997 ml H ₂ O MilliQ, 3 ml trietilamina i 2 ml àcid acètic glacial) CANAL B: Acetonitril		
Temperatura de la columna	60°C		
Volum d'injecció	5 µl		
Flux	1,2 ml/min		
Temps cromatograma	30 min		
Durada <i>postrun</i>	5 min		
Longitud d'ona	260 nm, 4nm; Ref: 490nm, 100nm (PA1) 280 nm, 4nm; Ref: 490nm, 100nm (PA2)		
Gradient fase mòbil	Temps (min)	Canal A [%]	Canal B [%]
	0,0	95	5
	1,5	95	5
	5,0	90	10
	15,0	70	30
	16,0	70	30
	20,0	30	70
	30,0	30	70

Taula 3: Condicions cromatogràfiques del mètode analític inicial

La taula amb les condicions del mètode optimitzat es troben a l'apartat 5.2 en la Taula 2.

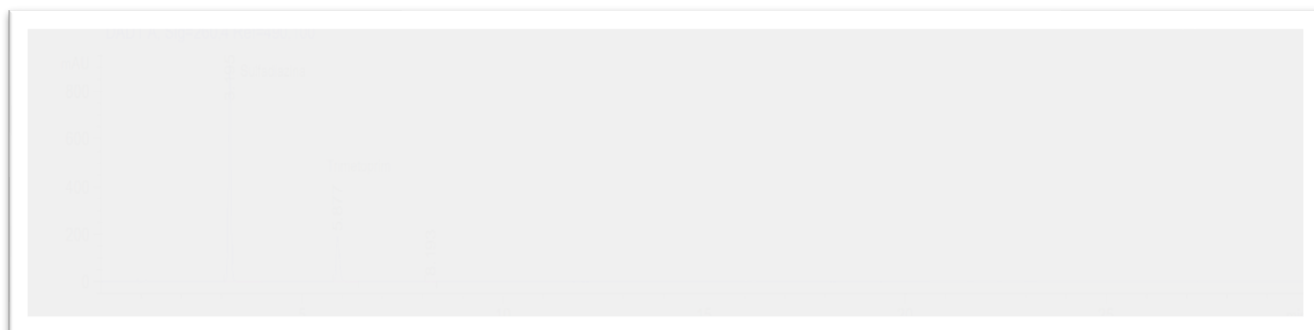
El primer canvi notable entre els dos mètodes és el temps de cromatograma. El mètode optimitzat ofereix un temps de cromatograma significativament més curt (8 minuts), en comparació amb el mètode inicial, que té un temps de cromatograma de 30 minuts. Aquesta reducció en el temps total de l'anàlisi comporta un augment de l'eficiència del procés. A més a més, la reducció del temps de cromatograma implica una disminució del temps de *postrun*, que passa de 5 minuts en el mètode inicial a només 2 minuts en el mètode optimitzat, reduint així el temps de neteja de la columna. Aquesta diferència significativa del temps es pot observar

comparant el cromatograma de la Imatge 7 amb el de la Imatge 8 amb una longitud d'ona de 260nm o comparant la Imatge 9 i 10 amb una longitud d'ona de 280nm.

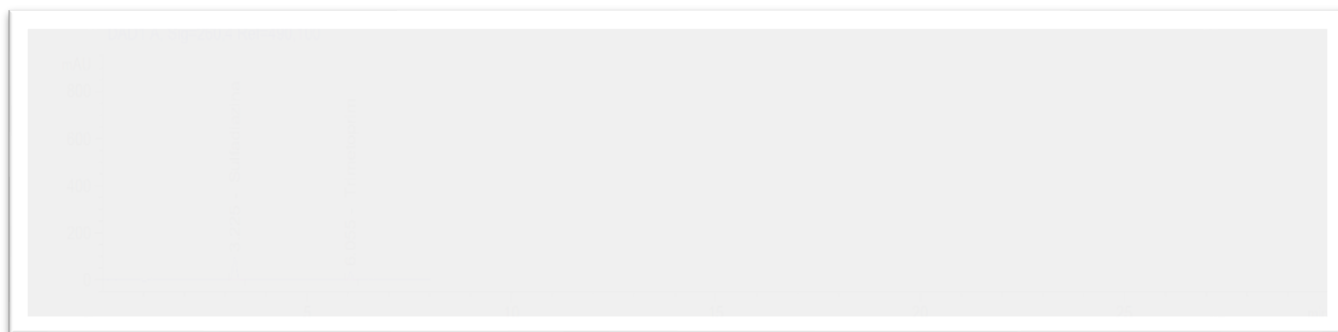
Aquesta disminució en el temps total de l'anàlisi implica també un ajust en el gradient de la fase mòbil. En el mètode optimitzat, el gradient és més curt i suau, gràcies a la reducció del temps del cromatograma. El gradient de temperatura en el mètode optimitzat garanteix que la separació dels compostos es dugui a terme en el temps establert.

També cal destacar que s'ha modificat el volum d'injecció de 5 µl a 20 µl per tal d'augmentar la sensibilitat de la detecció ja que en una neteja ens trobem a una concentració més baixa que en la detecció d'aquests principis actius en un medicament.

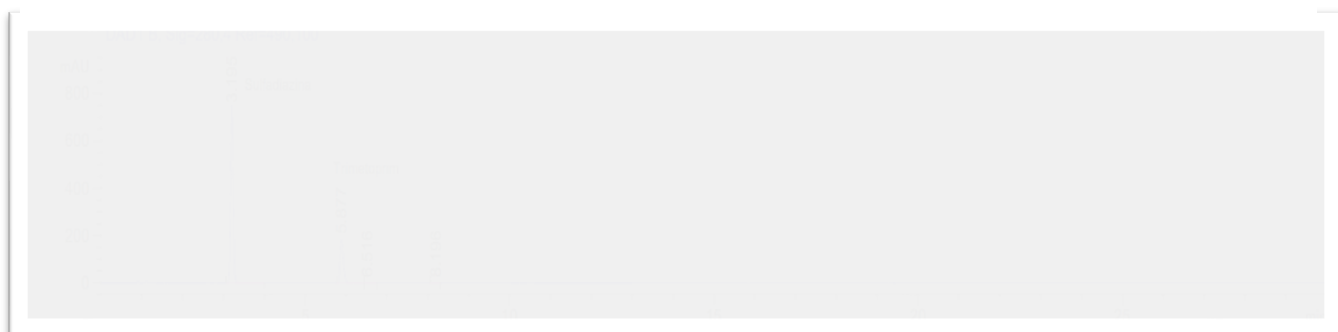
En definitiva, el mètode optimitzat destaca per la seva capacitat d'aconseguir resultats de qualitat amb un temps reduït, fent així que augmenti l'eficàcia i el rendiment al laboratori.



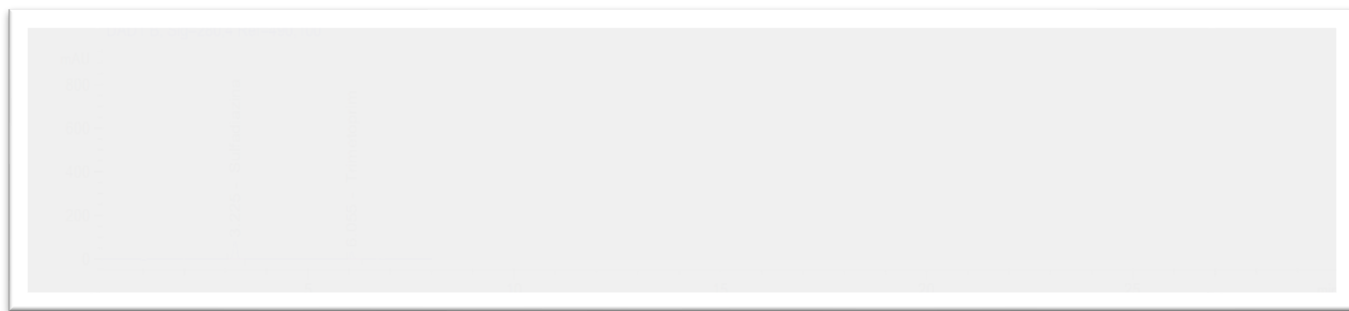
Imatge 7: Cromatograma del mètode inicial (260 nm)



Imatge 8: Cromatograma del mètode optimitzat (260 nm)



Imatge 9: Cromatograma del mètode inicial (280 nm)



Imatge 10: Cromatograma del mètode optimitzat (280 nm)

6.2 OPTIMITZACIÓ DEL TRACTAMENT DE LES MOSTRES

Per garantir que el mètode del tractament de les mostres sigui efectiu, és crucial fer diverses proves per tal d'optimitzar els paràmetres. S'han fet proves d'optimització com ara estudiar el temps òptim de vòrtex i del bany d'ultrasons, el volum òptim de dissolvent i el tipus de dissolvent adequat.

Per tal d'establir els paràmetres d'optimització, es calcula la recuperació en cada cas. La qual es calcula amb la següent fórmula:

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{\text{\AA}rea obtinguda}{\text{\AA}rea esperada} \times 100$$

On l'àrea esperada s'obté gràcies a la injecció de patrons amb una concentració coneguda.

6.2.1 OPTIMITZACIÓ DEL TEMPS AL BANY D'ULTRASONS

Observant les dades de la Taula 4 que mostra els percentatges de recuperació del PA1 i PA2 en funció del temps al bany d'ultrasons, podem concloure que els valors de recuperació del PA1 són similars entre ells, situant-se entre el 92,8% i el 95,5%. Això indica que el temps al bany d'ultrasons no afecta de manera significativa la recuperació d'aquesta substància. En el cas del PA2, es pot observar una variabilitat en els percentatges de recuperació, amb valors que oscil·len entre el 91,1% i el 102,7%, donat que es descarta el valor més alt obtingut (129,9%), ja que es considera un valor anòmal. També cal destacar que el valor màxim difereix molt de la resta de resultats i, per tant, es considera un valor atípic causat per qualsevol error pràctic, i queda descartat de l'estudi.

En definitiva, el temps al bany d'ultrasons no afecta de manera significativa la recuperació dels dos principis actius. En conseqüència, es decideix establir 2 minuts com a temps òptim, ja que representa una opció eficient, especialment per reduir el temps total del procés sense comprometre l'eficiència de recuperació.

Recuperació %		
Temps	PA1	PA2
1min	93,8	102,7
	94,0	99,6
2min	92,8	102,5
	95,5	98,6
3min	94,2	99,1
	93,8	129,9
4min	94,2	97,1
	93,7	94,0
5min	94,2	91,1
	93,9	91,4

Taula 4: Valors de recuperació depenent del temps al bany d'ultrasons

6.2.2 OPTIMITZACIÓ DEL TEMPS D'AGITACIÓ

La següent taula (Taula 5) mostra els percentatges de recuperació en funció del temps d'agitació amb vòrtex. Els valors de recuperació del PA1 augmenten lleugerament amb el temps, encara que la diferència no és molt significativa. L'altre principi actiu també presenta un augment en la recuperació en augmentar el temps d'agitació. Cal comentar que a la taula s'observa un valor anòmal de recuperació al PA2 (129,9%). Aquest valor es descarta i no es té amb compte.

La selecció d'1 minut com a temps òptim es basa en el fet que la recuperació en tots dos principis actius és eficient i, per altra banda, si prolonguem el temps a 2 minuts, no ofereix un avantatge significatiu en la recuperació. És a dir, escollir 1 minut optimitza el procés en termes de temps i eficiència.

Temps	PA1 (Recuperació %)	PA2 (Recuperació %)
0 min	93,0	97,1
	89,5	94,0
0,5 min	92,9	102,7
	94,2	99,6
1 min	94,6	102,5
	94,6	98,6
2min	94,6	99,1
	95,6	129,9

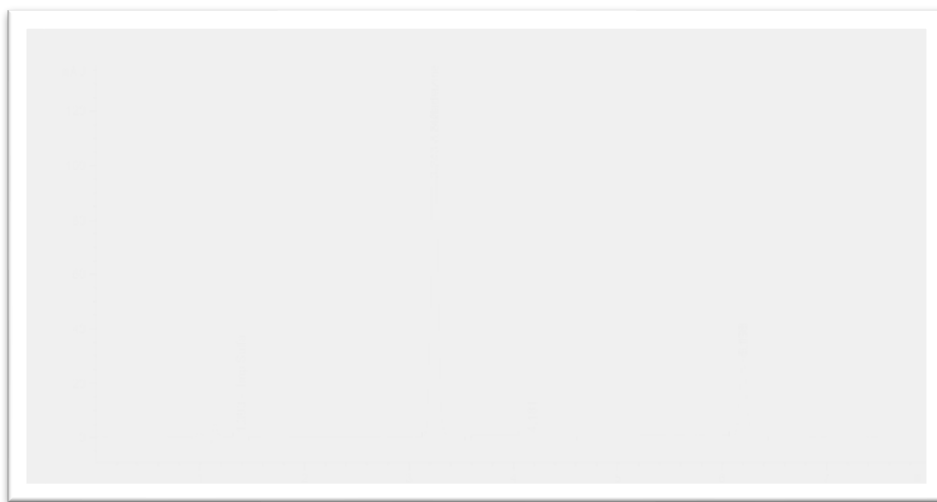
Taula 5: Valors de recuperació depenent el temps de vòrtex

6.2.3 OPTIMITZACIÓ DEL TIPUS I DEL VOLUM DE DISSOLVENT

Per altra banda, s'han realitzat proves amb diversos tipus de dissolvents i amb diferents volums d'extracció per tal d'optimitzar la forma més adient d'extreure els principis actius i obtenir major rendiment. El dissolvents que s'han provat són els següents:

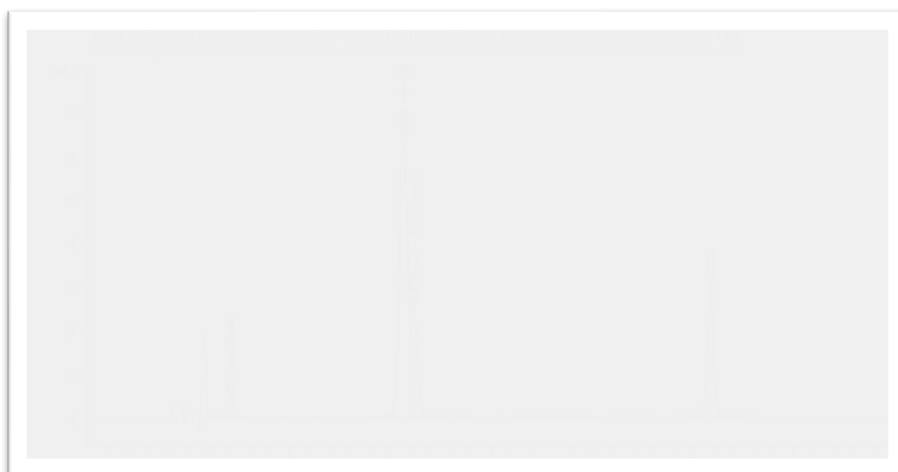
- Dissolvent 1
- Dissolvent 2
- Dissolvent 3 (50/50)
- Dissolvent 3 (75/25)
- Dissolvent 4
- Dissolvent 5

Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que utilitzar el dissolvent 1 ofereix resultats cromatogràfics acceptables, ja que els pics estan ben definits i la línia base es manté constant, la qual cosa indica una bona separació dels compostos analitzats (veure Imatge 11).



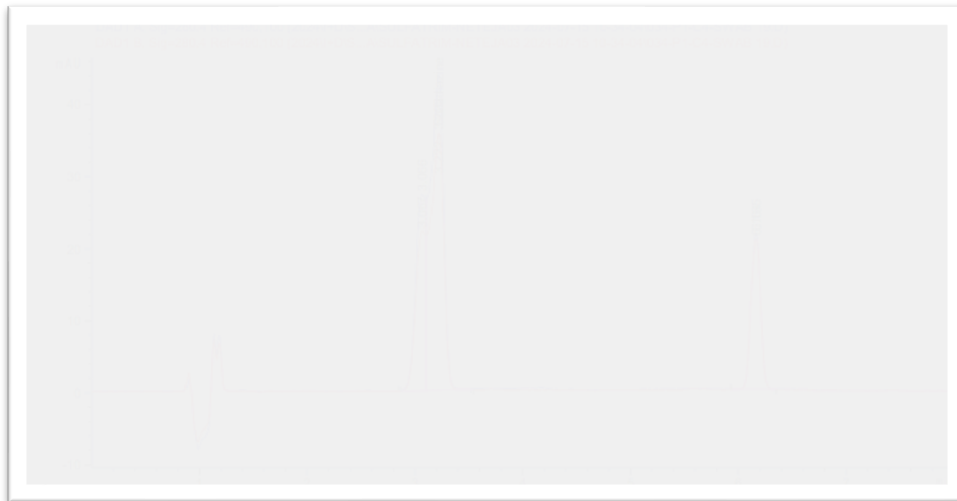
Imatge 11: Cromatograma utilitzant el dissolvent 1

D'altra banda, l'ús del dissolvent 2 no és una opció, ja que provoca el desdoblament del pic del PA1, indicant una resolució inadequada (veure Imatge 12).



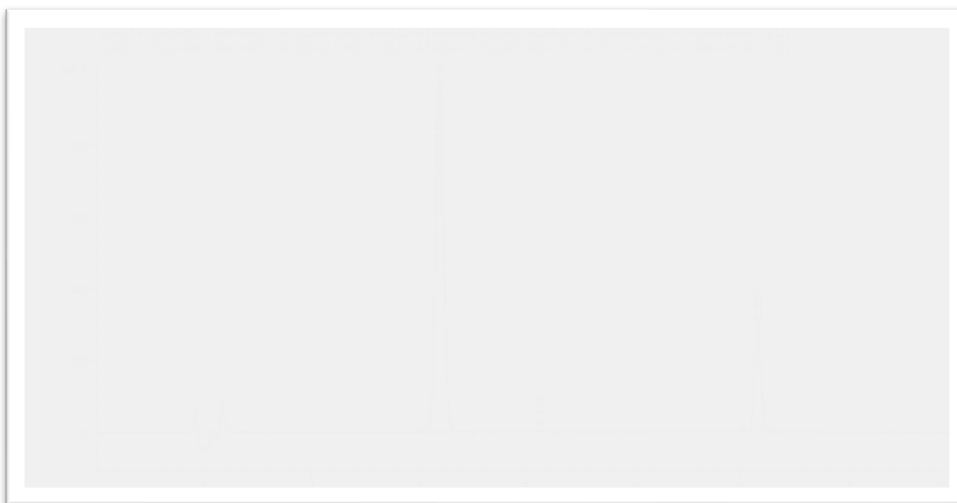
Imatge 12: Cromatograma utilitzant el dissolvent 2

Respecte el dissolvent 3, s'ha observat que una proporció 50/50 provoca també el desdoblament del pic del PA1 (veure Imatge 13). Per tant, aquest dissolvent també queda descartat per tal de dur l'extracció.



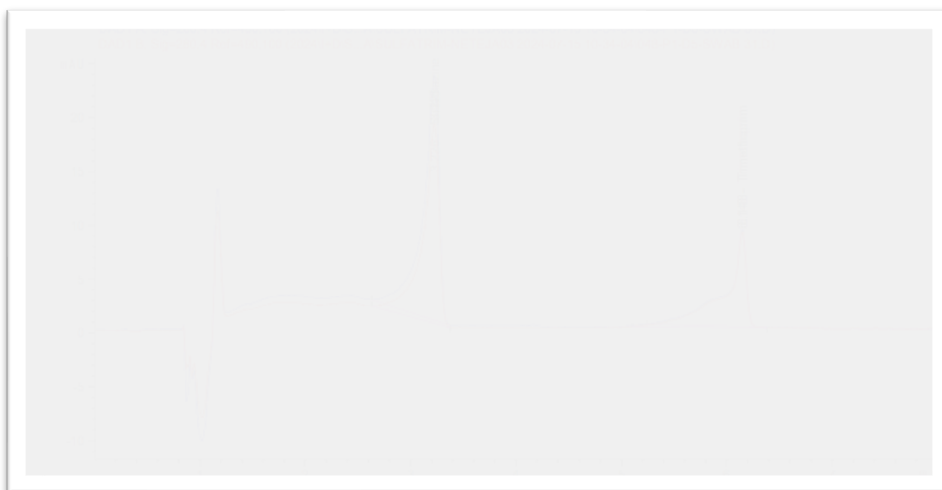
Imatge 13: Cromatograma utilitzant el dissolvent 3 (50/50)

No obstant això, quan la proporció s'ajusta a 75/25 (veure Imatge 14), els pics dels dos principis actius es representen nets, sense desdoblament. De tal manera que ens suggereix una altra combinació eficaç per a la separació d'aquests dos compostos.



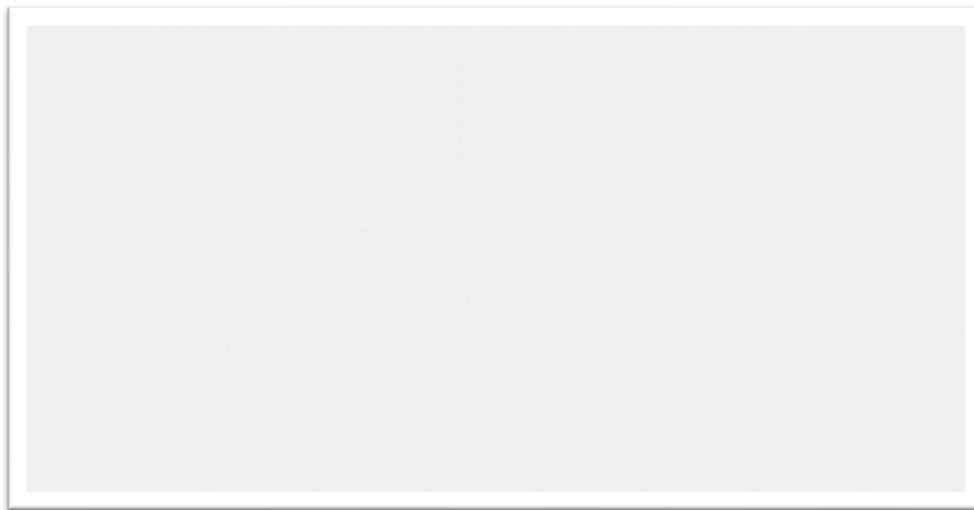
Imatge 14: Cromatograma utilitzant el dissolvent 3 (75/25)

L'ús del dissolvent 4 provoca irregularitats a la línia base, cosa que afecta la qualitat del cromatograma (veure Imatge 15). En efecte, es descarta com a bon dissolvent per a l'extracció dels dos principis actius.



Imatge 15: Cromatograma utilitzant el dissolvent 4

El mateix passa amb el dissolvent 5, que a més de provocar irregularitats, també fa que els pics del PA1 es solapin amb les seves impureses (veure Imatge 16). Així doncs, tant el dissolvent 4 com el dissolvent 5 no són adequats per a aquesta aplicació cromatogràfica.



Imatge 16: Cromatograma utilitzant el dissolvent 5

En conclusió, els dissolvents més eficients per a la cromatografia d'aquestes substàncies són el dissolvent 1 i el dissolvent 3, en proporció 75% i 25%. Mentre que altres dissolvents no ens proporcionen resultats bons per a l'extracció.

Un altre paràmetre que s'ha optimitzat és el volum de dissolvent a utilitzar per a l'extracció. Aquest paràmetre s'estudia únicament per als dos dissolvents que presenten un bon perfil cromatogràfic que són el dissolvent 1 i el dissolvent 3 amb les proporcions 75/25.

Les recuperacions obtingudes (veure taula 6) són majors a l'utilitzar un volum de 5ml. Tot i que entre ells, utilitzant 5ml, no hi ha diferències en els resultats, es decideix utilitzar el dissolvent 3 a una proporció 75/25 ja que coincideix amb el dissolvent del mètode.

Dissolvent	Volum d'extracció (ml)	Recuperació PA1 (%)	Recuperació PA2 (%)
1	2	87,0	71,3
	5	92,2	86,4
3 (75/25)	2	85,2	75,6
	5	91,9	86,5

Taula 6: Recuperacions dels principis actius segons cada dissolvent i volum emprats

En definitiva, un cop realitzades totes les proves de tractament de mostra, es decideix el volum d'extracció de 5 ml, el temps de vòrtex de 1 min, el temps al bany d'ultrasons de 2 min i el dissolvent 3 amb una proporció de 75/25 respectivament.

6.3 ESTABILITAT DE LES MOSTRES

6.3.1 ESTABILITAT EN SWAB

En aquest apartat es comenta l'estabilitat dels dos principis actius en els *swabs*. Mitjançant les recuperacions de cada principi actiu, es pot comentar si l'interval de temps entre la presa de mostra en *swab* fins l'extracció, afecta als resultats de l'anàlisi.

Respecte la Taula 7, s'observa que les recuperacions per al PA1 els dies 1, 2 i 4 són relativament bones, ja que obtenim valors superiors al 85%. El dia 3 obtenim un valor de mitjana de 77,1%, però neguem la possible degradació de del PA1 al llarg dels dies perquè el dia 4 té una recuperació més alta.

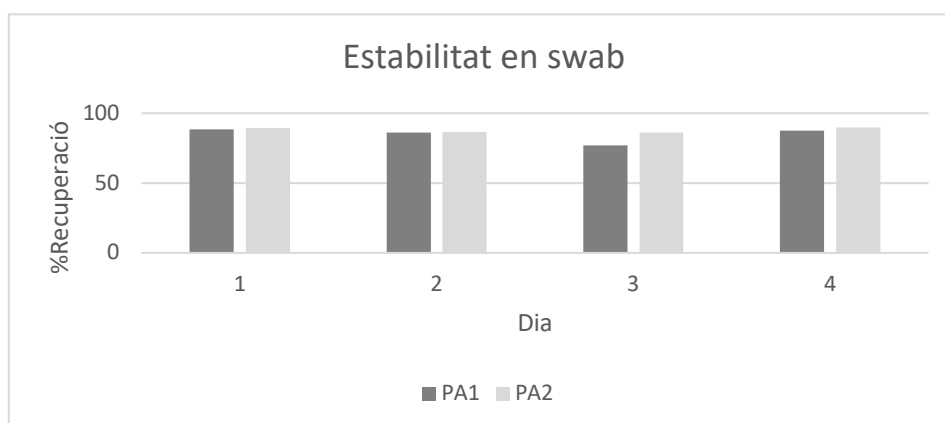
En el cas del PA2, les recuperacions es mantenen superiors al 85% durant els quatre dies. Per tant, aquest principi actiu presenta una estabilitat robusta al llarg del temps.

El valor de recuperació ressaltat en negreta de la Taula 7 no es té en compte a l'hora de calcular la mitjana, ja que és un valor anòmal i com tenim 6 repeticions per cada dia, podem menysprear aquest valor. Aquest error ha pogut ser degut a una contaminació o un error de pipeteig.

En definitiva, tant el PA1 com el PA2 es mantenen estables al llarg del temps tal i com es pot observar conjuntament al Gràfic 1. Cal destacar que el PA1 presenta una pèrdua notable de recuperació el dia 3, però aquesta no està associada a una pèrdua d'estabilitat.

	Swab	Àrea PA1 (ua ²)	Recuperació PA1 (%)	Àrea PA2 (ua)	Recuperació PA2 (%)
DIA 1	1.1	572,7	88,1	142,1	90,9
	1.2	575,0	88,5	138,3	88,5
	1.3	572,8	88,2	136,5	87,3
	1.4	580,7	89,4	140,6	89,9
	1.5	568,3	87,5	135,0	86,3
	1.6	579,4	89,2	145,0	92,8
		Mitjana	88,5	Mitjana	89,3
DIA 2	2.1	569,8	87,7	139,8	89,4
	2.2	559,9	86,2	132,9	85,0
	2.3	560,7	86,3	134,7	86,1
	2.4	566,8	87,2	143,5	91,8
	2.5	577,2	88,9	137,0	87,6
	2.6	535,3	82,4	125,7	80,4
		Mitjana	86,4	Mitjana	86,7
DIA 3	3.1	482,8	74,3	130,7	83,6
	3.2	515,8	79,4	138,0	88,3
	3.3	513,7	79,1	135,2	86,5
	3.4	495,5	76,3	135,3	86,5
	3.5	506,2	77,9	135,2	86,5
	3.6	492,7	75,8	132,9	85,0
		Mitjana	77,1	Mitjana	86,0
DIA 4	4.1	600,2	92,4	143,1	91,5
	4.2	561,0	86,4	141,4	90,4
	4.3	571,5	88,0	142,2	91,0
	4.4	563,1	86,7	140,5	89,9
	4.5	557,7	85,8	135,2	86,5
	4.6	553,2	85,2	3279,4	2106,5
		Mitjana	87,4	Mitjana	89,9

Taula 7: Estabilitat del swab dels dos principis actius



Gràfic 1: Recuperació dels principis actius segons el dia de l'extracció

² Unitats arbitràries

6.3.2 ESTABILITAT EN PLACA

Els resultats de l'estudi sobre l'estabilitat en placa del PA1 i el PA2 es troben adjunts a la Taula 8 i 9 respectivament.

En el cas del PA1 es pot observar que durant els tres dies s'obté una recuperació superior al 87%. Es pot observar una petita disminució entre el primer i el segon dia, el qual ens indicaria una possible degradació de la mostra. Però entre el segon i el tercer dia, la mitjana es manté constant. Per tant, es pot considerar que el PA1 presenta una estabilitat en plaques durant tres dies i aquesta variació entre el primer i segon dia pot ser causat per un error instrumental.

Per al cas del PA2, podem observar una estabilitat entre els diferents dies amb una recuperació molt bona, on la mínima és de 84,5%.

A manera de conclusió, es pot dir que tots dos principis actius mostren una gran estabilitat en placa al llarg dels tres dies.

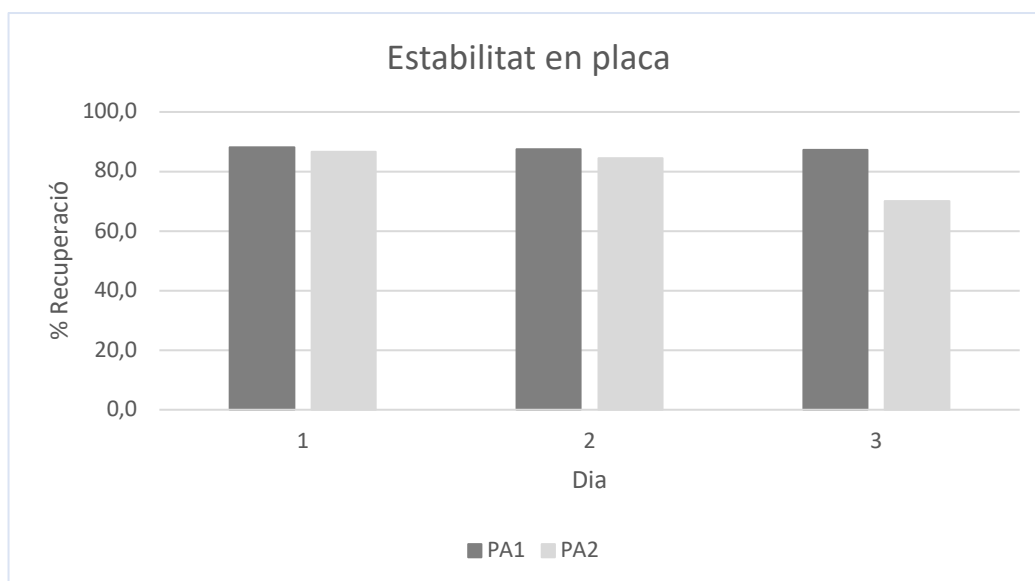
Els valors de recuperació dels dos principis actius es troben representats al Gràfic 2, per proporcionar una visió més clara d'aquests.

	Swab	PA1 (ua)	Recuperació (%)
DIA 1	1.1	572,5	87,6
	1.2	580,7	88,8
		Mitjana	88,2
DIA 2	2.1	571,3	87,4
	2.2	572,3	87,5
		Mitjana	87,4
DIA 3	3.1	565,1	86,4
	3.2	577,5	88,3
		Mitjana	87,4

Taula 8: Estabilitat en placa (PA1)

	Swab	PA2 (ua)	Recuperació (%)
DIA1	1.1	140,0	85,5
	1.2	143,9	87,8
		Mitjana	86,6
DIA 2	2.1	136,1	83,1
	2.2	140,7	85,9
		Mitjana	84,5
DIA 3	3.1	138,9	84,8
	3.2	145,3	88,7
		Mitjana	86,8

Taula 9: Estabilitat en placa (PA2)



Gràfic 2: Valors de recuperació Mitjans dels principis actius al llarg dels tres dies

6.4 VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC OPTIMITZAT

Cal esmentar que al llarg d'aquest apartat es comenten resultats respecte el percentatge del factor resposta.

Aquest paràmetre ens descriu la relació entre el senyal obtingut d'un analit, és a dir, l'àrea del pic obtinguda, respecte la concentració de l'analit. La fórmula per calcular aquest paràmetre és la següent:

$$FR (\%) = \frac{\text{Àrea obtinguda de l'analit}}{\text{Concentració analit}} \times 100$$

6.4.1 RESULTATS LINEALITAT

Com s'ha comentat anteriorment, per tal de determinar la linealitat es defineixen 10 nivells a una concentració diferent que cobreixen tot el rang de treball. Es realitzen tres rèpliques de cada concentració per tenir una fiabilitat dels resultats obtinguts.

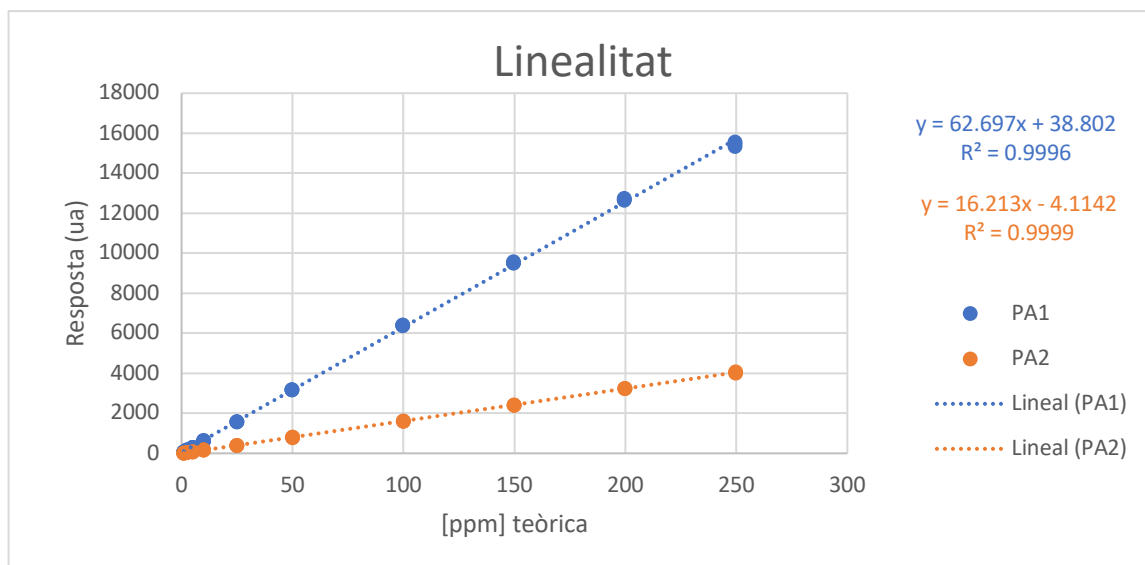
A la següent pàgina es troba la Taula 10, on es pot observar les dades obtingudes per al PA1 i el PA2. També està adjunta la Gràfica 3 a la pàgina 31, on es mostren aquests resultats de manera visual, juntament amb les rectes i els coeficients de correlació per cadascun.

Respecte la taula esmentada anteriorment, es pot observar que els factors resposta del PA1 es mantenen relativament constants indicant així, una resposta quasi lineal de l'àrea d'aquest principi actiu.

Per al cas del PA2 també s'obté una resposta creixent respecte la concentració, amb un valor de coeficient de variació més petit que en el del PA1. Això indica una resposta més constant i menys variable per al cas del PA2, encara que els valors del PA1 són òptims.

[ppm]	Àrea PA1 (ua)	%FR PA1	Àrea PA2 (ua)	%FR PA2
1,0	63,1	63,2	15,8	15,8
	63,4	63,6	16,0	16,0
	63,0	63,1	15,7	15,7
2,5	157,5	63,1	39,7	15,9
	158,6	63,6	40,3	16,1
	157,5	63,1	40,3	16,1
5,0	311,9	62,5	80,3	16,1
	313,3	62,8	80,3	16,1
	313,3	62,8	79,9	16,0
10,0	637,7	63,9	160,5	16,1
	632,3	63,4	161,3	16,1
	635,6	63,7	160,2	16,0
25,0	1589,0	63,7	397,2	15,9
	1588,6	63,7	398,3	15,9
	1593,8	63,9	398,4	15,9
50,0	3178,1	63,7	797,1	15,9
	3167,3	63,5	795,2	15,9
	3196,4	64,0	799,2	16,0
100,0	6413,9	64,3	1614,7	16,2
	6420,6	64,3	1616,5	16,2
	6395,0	64,1	1605,6	16,1
150,0	9525,5	63,6	2414,2	16,1
	9520,8	63,6	2411,3	16,1
	9584,8	64,0	2421,6	16,2
200,0	12637,3	63,3	3250,8	16,3
	12673,0	63,5	3250,9	16,3
	12746,0	63,8	3260,0	16,3
250,0	15351,8	61,5	4012,4	16,1
	15473,5	62,0	4061,1	16,3
	15556,7	62,3	4056,3	16,2
	Mitjana	63,4	Mitjana	16,1
	Desv. estàndard	0,65	Desv. estàndard	0,14
	CV (%)	1,03	CV (%)	0,89

Taula 10: Resultats de la linealitat dels dos principis actius



Gràfic 3: Estudi de la linealitat dels dos principis actius

Seguidament, en aquest apartat també es presenta la informació estadística necessària per establir la linealitat del mètode analític. Un anàlisi fonamental per estudiar la linealitat mitjançant l'estadística és mitjançant l'anàlisi ANOVA, però abans de fer aquest pas, és imprescindible comprovar si es compleix la homogeneïtat de les variàncies⁹.

Per tal d'estudiar aquesta homogeneïtat s'aplica el Test de Cochran que ens indica si el factor de concentració té alguna influència en la variabilitat dels resultats.

- **Test de Cochran**

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_i^2} < G_{tab(0.05)}$$

On S_{max}^2 és la major variància entre els grups i S_i^2 és la variància de cada grup. El valor calculat de G_{exp} es compara amb el valor de G_{tab} per a les dues substàncies. A la Taula 11 es pot observar que els valors experimentals són més petits que els valors tabulats per a tots dos principis actius. Això implica que les variàncies són homogènies, es a dir, no presenten diferències significatives. Per tant, es compleix la premissa clau per tal de realitzar l'anàlisi ANOVA⁹.

Substància	G_{exp}	$G_{tab} (\alpha=0.05, K=5, n-1)$
PA1	0,26	0,45
PA2	0,37	0,45

Taula 11: Valors del Test de Cochran

A continuació, es mostren les Taules 12 i 13 on es troba l'anàlisi ANOVA per a cada principi actiu. Amb la qual es pot avaluar si les variacions observades en la variable dependent poden ser explicades a partir de la variable independent en funció de les concentracions⁹.

Tots dos anàlisis d'ANOVA mostren que la variable independent (concentració) té un efecte significatiu en la variable dependent (resposta), tant per al PA1 com per al PA2, ja que els valors de F són molt grans i els valors de probabilitat per a les variables x1 són extremadament baixos, la qual cosa ens indica una alta significació estadística. Per tant, s'afirma que existeix una relació lineal entre les variables.

Anàlisis de variància del PA1						
	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana dels quadrats	F	Valor crític de F	
Regressió	1	59311571,97	59311571,97	494707,51	5,17E-61	
Residus	28	3356,98	119,89			
Total	29	59314928,95				

	Coeficients	Error típic	Estadístic t	Probabilitat	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepció	38,80	26,68	1,46	0,16	-15,84	93,44
Variable x1	62,70	0,23	275,82	1,25E-49	62,23	63,16

Taula 12: Dades d'anàlisis de variància del PA1

Anàlisis de variància del PA2						
	Graus de llibertat	Suma de quadrats	Mitjana dels quadrats	F	Valor crític de F	
Regressió	1	59311571,97	59311571,97	494707,51	5,17E-61	
Residus	28	3356,98	119,89			
Total	29	59314928,95				

	Coeficients	Error típic	Estadístic t	Probabilitat	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepció	-4,11	2,71	-1,52	0,14	-9,66	1,43
Variable x1	16,21	0,02	703,35	5,17E-61	16,17	16,26

Taula 13: Dades anàlisi de variància PA2

- **Correlació lineal**

Per altra banda, a la Taula 14 es pot observar els valors de r^2 que obtenim per tots dos principis actius. Aquests valors tan propers a 1 ens indiquen que amb les rectes proporcionades podem explicar quasi tota la variabilitat de y en funció de x, és a dir podem tenir una bona predicció del comportament de y a partir de x ⁹.

També s'inclouen els valors dels errors estàndards d'estimació tant de la intersecció com del pendent. Els dos valors dels errors són molt més petits per al PA2, la qual cosa indica que la recta per aquest és molt més precisa en la seva estimació que per al PA1. Per al PA1 el valor de S_b és molt més elevat que S_a . Això indica que hi ha més incertesa en l'estimació del pendent⁹.

Paràmetre	PA1	PA2
Equació lineal	$y = 62,697x + 38,802$	$y = 16,213x - 4,1142$
r	0,99	0,99
r^2	0,99	0,99
S_a	0,23	0,02
S_b	19,69	2,01

Taula 14: Correlació lineal dels principis actius

- Interval de confiança**

Per determinar si els coeficients de la recta són significativament diferents de 0, es calcula el valor de la T_{exp} , que compara el valor absolut del coeficient amb el seu error estàndard⁹. En aquest cas, els resultats mostren que els coeficients de la recta per ambdós principis actius són estadísticament significatius, ja que els seus valors de T_{exp} superen el valor crític, T_{tab} per un nivell de significació $\alpha = 0,05$. Aquests valors es troben representats a la Taula 18 i 19.

Per al PA1, el valor de T_{exp} per al coeficient a , és considerablement superior a T_{tab} . Per al coeficient b , el valor de T_{exp} també supera al valor de T_{tab} . Això indica que els dos coeficients són significatius per aquest compost. En el cas del PA2, els valors de T_{exp} per als coeficients a i b també són molt més grans que T_{tab} , fet que implica que els coeficients siguin significatius per aquest compost.

Aquests resultats ens indiquen que els models de regressió utilitzats per als dos principis actius són lineals, precisos i fiables. També s'observa que els coeficients de regressió són estadísticament significatius i, per tant, s'assegura l'homogeneïtat de les variàncies.

A continuació es troben les taules (veure Taula 15 i 16) amb les fórmules corresponents, utilitzades per calcular el valor de T experimental. En aquestes dos fórmules trobem el paràmetre b que fa referència a la pendent i el paràmetre a que fa referència a l'ordenada a l'origen.

$$T_{exp} = \frac{|a|}{S_a} > t_{(n-2, \alpha=0,05)}$$

Substància	T_{exp}	$T_{tab} (n-2, \alpha=0,05)$
PA1	1683,32	2,05
PA2	178,48	2,05

Taula 15: Valors de T_{exp} i T_{tab} per al coeficient a

$$T_{exp} = \frac{|b|}{S_b} > t_{(n-2, \alpha=0,05)}$$

Substància	T_{exp}	$T_{tab} (n-2, \alpha=0,05)$
PA1	3,18	2,05
PA2	8,05	2,05

Taula 16: Valors de T_{exp} i T_{tab} per al coeficient b

6.4.2 PRECISIÓ INTERMÈDIA

Els resultats de la precisió intermèdia per al PA1 (veure Taula 17) indiquen que el mètode utilitzat és fiable i consistent.

Les mitjanes dels resultats obtinguts durant els 3 dies d'anàlisi són pràcticament iguals entre els dos analistes, amb petites variacions entre els resultats de cada dia, fet que ens indica que el mètode és estable i que les mesures no es veuen afectades per factors externs.

Pel que fa a la dispersió de les dades, les desviacions estàndard tenen valors molt baixos, això vol dir que els resultats obtinguts estan agrupats al voltant de la mitjana de manera molt estreta. Això significa que el mètode és capaç de generar resultats molt precisos i repetibles.

El coeficient de variació (CV%) es un indicador de la precisió del mètode, i per tant, un valor baix com el que es mostra en aquests resultats, indica que els resultats obtinguts són molt constants. A més a més, els valors de CV% es troben per sota del valor d'especificació del CV això vol dir que el mètode compleix amb les especificacions establertes per a una bona precisió intermèdia.

Per altra banda, els resultats de la precisió intermèdia per al PA2 mostren també una alta consistència i fiabilitat del mètode utilitzat (veure Taula 18).

Les mitjanes obtingudes entre els tres dies d'anàlisi i entre els analistes són molt similars. Els valors entre les desviacions estàndard també són similars i si s'analitza els resultats del CV% respecte al valor d'especificació CV% es veu que estan els valors per sota i que, per tant, els resultats obtinguts pel PA2 ens mostren una alta fiabilitat en el mètode.

En conclusió, tant el PA1 com el PA2 mostren una alta precisió intermèdia. Les mitjanes són consistents i les desviacions estàndard i coeficients de variació baixos indiquen que el mètode és precís i fiable. Tots els valors compleixen amb les especificacions establertes, demostrant que és un mètode adequat per anàlisis repetides.

Resultats precisió intermèdia PA1 (200 ppm)						
	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Mostra 1	102,3	100,0	101,7	101,4	100,6	101,0
Mostra 2	101,4	99,8	101,9	101,3	100,6	101,2
Mostra 3	101,5	100,0	101,5	101,2	100,1	101,1
Desviació estàndard	0,48	0,10	0,21	0,12	0,28	0,10
Mitjana	101,7	99,9	101,7	101,3	100,5	101,1
CV (%)	0,47	0,10	0,21	0,12	0,28	0,10
Desviació estàndard	1,1		0,3		0,4	
Mitjana	100,8		101,5		100,8	
CV (%)	1,0		0,26		0,39	
Desviació estàndard				0,70		
Mitjana				101,0		
CV (%)				0,69		
Especificació CV (%)				<1,1		

Taula 17: Resultats precisió intermèdia PA1 (200ppm)

RESULTATS PRECISIÓ INTERMÈDIA PA2 (200 ppm)						
	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Mostra 1	100,7	98,6	102,7	100,8	100,0	100,4
Mostra 2	99,4	98,4	100,5	100,7	100,6	100,7
Mostra 3	99,4	98,7	101,6	100,1	100,1	100,9
Desviació estàndard	0,74	0,19	1,1	0,33	0,33	0,24
Mitjana	99,8	98,6	101,6	100,4	100,3	100,7
CV (%)	0,74	0,20	1,10	0,33	0,33	0,24
Desviació estàndard	0,85		0,98		0,34	
Mitjana	99,2		101,0		100,5	
CV (%)	0,85		0,97		0,34	
Desviació estàndard			1,1			
Mitjana			100,2			
CV (%)			1,1			
Especificació CV (%)			< 1,2			

Taula 18: Resultats precisió intermèdia PA2 (200ppm)

6.4.3 REPETIBILITAT DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

En l'estudi de la repetibilitat del sistema instrumental per a tots dos principis actius, es pot observar que, en general, el sistema mostra una alta precisió i consistència en les mesures a concentracions més baixes, però presenta algunes diferències a concentracions altes, però sempre per sota del límit especificat.

Per al PA1 a concentracions baixes (veure Taula 19), les dades mostren que el coeficient de variació (CV) és extremadament baix, amb un CV de 0,18%. Aquesta variabilitat tan petita ens indica de que el sistema instrumental és altament repetible i estable, i compleix fàcilment amb les especificacions de repetibilitat establertes (<1,37% de CV). La baixa desviació estàndard també corrobora aquesta conclusió, ja que les dades estan molt a prop de la mitjana, indicant que els resultats obtinguts són molt consistents en totes les repeticions.

Els valors obtinguts a 200 ppm, és a dir, a concentracions altes, també són bons (veure Taula 21). El CV per al PA1 és 0,45%, també situat per sota el límit especificat de 1,94%, la qual cosa reafirma la consistència i fiabilitat del sistema instrumental en la mesura d'aquesta substància a concentracions més elevades.

En el cas del PA2 a concentracions baixes (veure Taula 20), el sistema també mostra un CV baix de 0,45%, que es manté per sota del límit especificat de 1,37%. Això indica una bona repetibilitat en aquestes condicions. A concentracions altes (veure Taula 22), el PA2 presenta un CV de 0,65 %, situat per sota del límit especificat.

En resum, tant per al PA1 com per al PA2, el sistema instrumental mostra una major repetibilitat a concentracions baixes que en altes, però en tots dos casos s'obté un CV baix que compleix les especificacions de repetibilitat.

[] teòrica ppm	Resposta PA1 (ua)	FR (%)
25,0	1611,5	64,6
	1606,0	64,4
	1607,1	64,4
	1609,3	64,5
	1612,4	64,6
	1605,5	64,3
Mitjana	1608,7	64,5
Desv. Estàndard	2,91	0,12
CV (%)	0,18	0,18
Especificació CV (%)	<1,37	

Taula 19: Valors PA1 per a la repetibilitat del sistema instrumental (25 ppm)

[] teòrica ppm	Resposta PA2 (ua)	FR (%)
25,0	401,7	40,2
	398,6	39,9
	400,8	40,1
	403,4	40,3
	400,9	40,1
	399,0	39,9
Mitjana	400,8	16,0
Desv. Estàndard	1,79	0,07
CV (%)	0,45	0,45
Especificació CV (%)	<1,37	

Taula 20: Valors PA2 per a la repetibilitat del sistema instrumental (25 ppm)

[] teòrica ppm	Resposta PA1(ua)	FR (%)
199.65	12683,6	63,5
	12695,1	63,6
	12686,5	63,5
	12764,3	63,9
	12682,8	63,5
	12742,7	63,8
Mitjana	12709,17	63,66
Desv. Estàndard	35,28	0,18
CV (%)	0,28	0,28
Especificació CV (%)	<1,37	

Taula 21: Valors PA1 per a repetibilitat del sistema instrumental (200 ppm)

[] teòrica ppm	Resposta PA2 (ua)	FR (%)
199,94	3283,1	16,4
	3229,6	16,2
	3237,3	16,2
	3247,0	16,2
	3228,0	16,1
	3230,5	16,2
Mitjana	3242,6	16,2
Desv. Estàndard	21,04	0,11
CV (%)	0,65	0,65
Especificació CV (%)	<1,37	

Taula 22: Valors PA2 per a la repetibilitat del sistema instrumental (200 ppm)

6.4.4 REPETIBILITAT DEL MÈTODE

Els resultats obtinguts en aquest experiment mostren que, en general, els valors de recuperació per les dues substàncies són molt pròxims al 100%, indicant que els mètodes utilitzats per a la quantificació d'aquestes substàncies són precisos i fiables.

En el cas de del PA1, partint d'una concentració teòrica de 25 ppm (veure Taula 23), obtenim una recuperació del 100,3% de mitjana. Això implica que les respostes obtingudes són gairebé exactament iguals a les concentracions teòriques. La desviació estàndard de 0.54 i el coeficient de variació (CV) de 0,54% confirmen que hi ha molt poca variabilitat entre les respostes obtingudes en les diferents repeticions de l'experiment. Tanmateix, un CV amb valors per sota del valor d'especificació del CV (%) ens afirma que els resultats són repetibles.

Per a una concentració de 200 ppm teòrica (veure Taula 24), es mantenen els valors d'una bona recuperació i d'un valor de CV molt baix.

Pel que fa al PA2, les recuperacions són una mica més variables, amb una mitjana de 99,3% per a les concentracions teòriques de 25 ppm. La desviació estàndard és de 0,62 i el CV és de 0,63%, que també estan per sota del límit de 1.94%, indicant que la precisió de les mesures és bona, tot i que no sigui tan bona com la del PA1.

A una concentració de 200 ppm la recuperació està lleugerament per sobre del 100% però els valors de CV es mantenen a un valor inferior al d'especificació.

Cal comentar que en aquest apartat la majoria de recuperacions donen per sobre del 100%, degut possiblement a un error de pipeteig. Aquest estudi no s'ha repetit ja que en la repetibilitat del mètode ens fixem si els valors són similars entre ells i no si són exactes, es a dir, propers al valor real.

En conclusió, aquests resultats ajuden a afirmar que el mètode utilitzat té una molt bona repetibilitat i que per tant, els anàlisis fets amb aquest mètode seran coherents i representatius.

[] (ppm)	Resposta PA1 (ua)	Recuperació (%)	%FR	Resposta PA2 (ua)	Recuperació (%)	%FR
25	1604,8	99,3	64,3	398,3	98,5	15,9
	1615,7	100,0	64,7	400,9	99,2	16,0
	1624,6	100,6	65,1	399,4	98,8	16,0
	1626,1	100,7	65,2	405,2	100,3	16,2
	1621,1	100,4	65,0	400,6	99,1	16,0
	1625,8	100,7	65,1	403,1	99,7	16,1
Mitjana	1619,7	100,3	64,9	401,2	99,3	16,0
Desviació estàndard	8,28	0,54	0,33	2,51	0,62	0,10
CV (%)	0,51	0,54	0,51	0,63	0,63	0,63
Especificació CV (%)	<1,94			<1,94		

Taula 23: Dades repetibilitat del mètode a 25 ppm

[] (ppm)	Resposta PA1 (ua)	Recuperació (%)	Resposta PA2 (ua)	Recuperació (%)
200	12704,9	102,6	3225,8	100,03
	12821,2	103,5	3275,9	101,59
	12687,7	102,4	3228,4	100,11
	12721,8	102,7	3252,0	100,85
	12649,0	102,1	3228,2	100,11
	12807,1	103,4	3233,4	100,27
Mitjana	12732,0	102,8	3240,6	100,5
Desviació estàndard	68,24	0,55	19,77	0,61
CV (%)	0,54	0,54	0,61	0,61
Especificació CV (%)	<1,94		<1,94	

Taula 24: Dades repetibilitat del mètode a 200ppm

6.4.5 EXACTITUD

Els valors obtinguts per a l'exactitud ens mostren, tant per al PA1 (veure Taula 25) com per al PA2 (veure Taula 26), una recuperació alta.

A concentracions baixes, s'observen uns valors de desviació estàndard i uns coeficients de variació més alts que a una concentració de 250 ppm. Com menor sigui el %CV, menys variabilitat hi ha entre les mesures.

La covariància ens indica la dispersió entre les diferents mostres d'una mateixa concentració. Amb els valors obtinguts es pot dir que a concentracions baixes, tenim un valor de covariància alt. En canvi, a concentracions altes aquest valor és molt petit.

Les conclusions que podem extreure del mètode amb els valors obtinguts per a l'exactitud són:

- A concentracions baixes, tant en el PA1 com en el PA2, tenim uns valors de desviació estàndard, de covariància i de CV elevats respecte els valors que obtenim a concentració alta.
- La recuperació dels principis actius és alta a les tres concentracions estudiades.

En definitiva, és un mètode amb una exactitud bona però amb una petita variabilitat a concentracions baixes.

[PA1]	Resposta (ua)	Recuperació (%)	Mitjana	Desv. Estàndard	Covariància	CV%
2	115,4	92,34	92,3	2,32	5,38	2,51
	119,5	95,63				
	113,9	91,14				
25	1411,7	88,05	88,1	3,28	10,76	3,73
	1383,7	86,3				
	1309,9	81,7				
250	13721,9	89,3	89,3	0,226	0,051	0,25
	13664,5	88,93				
	13659,4	88,9				
	Mitjana	89,1				
	Desv.est.	3,89				
	CV (%)	4,37				

Taula 25: Valors de l'estudi d'exactitud (PA1)

[PA2]	Resposta (ua)	Recuperació (%)	Mitjana	Desv. Estàndard	Covariància	CV%
2	28,7	89,0	93,9	9,8	98,9	10,4
	28,2	87,5				
	33,9	105,2				
25	347,3	87,2	89,4	14,4	14,4	4,2
	347,0	87,2				
	373,3	93,8				
250	3462,4	87,4	87,5	0,09	0,01	0,1
	3469,4	87,6				
	3466,7	87,5				
	Mitjana	90,2				
	Desv.est.	6,0				
	CV (%)	6,6				

Taula 26: Valors de l'estudi d'exactitud (PA2)

6.4.6 SELECTIVITAT

Els resultats obtinguts mostren una bona selectivitat del mètode utilitzat, ja que no s'han detectat interferències entre els cromatogrames obtinguts per a les diferents mostres analitzades. Tant les mostres de dissolvents com les de l'extracció dels *swabs*, filtrades i no filtrades, s'ha obtingut una separació clara dels pics corresponents als principis actius sense que hi hagi superposicions. Al no mostrar cap tipus d'interferències en totes les proves, incloent-hi

dissolvents i aigua filtrada o no filtrada, confirma que el mètode és capaç de separar i identificar els analits de forma clara, reflectint així una bona selectivitat.

6.4.7 ROBUSTESA

Per poder avaluar la robustesa, s'utilitza el mètode Youden-Steiner, que ens permet estudiar la influència o efecte resultant de la modificació dels 7 factors descrits a la següent taula:

Factor	Factor nominal
A/a	Volum d'injecció (20µl/60µl)
B/b	Temperatura (60°C/55°C)
C/c	Flux (1,2 ml/min / 1 ml/min)
D/d	Fase aquosa (trimetilamina/trietanolamina)
E/e	Columna (utilitzada/nova)
F/f	Neteja d'agulla (activada/desactivada)
G/g	Refrigeració mostres (no/si)

Taula 27: Factors avaluats a la robustesa

Els valors nominals dels factors representen el percentatge del factor resposta associat a les lletres majúscules i els valors alternatius, al de les lletres minúscules. Aquests valors de estan especificats a la Taula 28.

Per saber l'efecte de cada factor es calcula la diferència entre la mitjana dels valors nominals i la mitjana dels valors alternatius, prenent el resultat en valor absolut. Els resultats es troben detallats a la Taula 29.

Per saber quin factor afecta significativament al mètode i quin no afecta, s'ha de calcular el valor límit per cada principi actiu (Taula 30). Aquest valor límit es calcula com:

$$\sqrt{2} * s$$

On s es la desviació estàndard obtinguda en la repetibilitat del mètode a una concentració de 25ppm, ja que aquest experiment es duu a terme a la mateixa concentració (Taula 23, apartat 6.4.4).

Si el resultat obtingut en la diferència en valor absolut es major que el valor límit, aquest factor afecta al mètode significativament. Només el factor C supera els valors límits calculats. Per tant, es mostra que el flux és un factor crític que afecta substancialment el mètode.

Els altres factors com ara la neteja de l'agulla, el volum d'injecció, la refrigeració de les mostres, el canvi de columna, canvi de la fase aquosa i la temperatura són factors que no afecten significativament al mètode, ja que es troben per sota dels valors límits i per tant, no tenen cap repercussió significativa als resultats obtinguts.

EXPERIMENT								
FACTORS	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Mètode	s	t	u	v	w	x	y	z
Àrea PA1	1605	1938	1610	1943	3237	3865	3219	3843
% FR PA1	64,5	77,7	64,4	77,8	64,8	77,4	64,6	77,0
Àrea PA2	393,6	447,25	393,05	475,9	789,9	945,25	790,8	945,75
%FR PA2	15,8	19,1	15,7	19,1	15,8	18,9	15,8	18,9

Taula 28: Valors de robustesa segons els diferents factors

V _{nominal} - V _{alternatiu}		
	PA1	PA2
Factor A	0,15	0,08
Factor B	0,15	0,03
Factor C	12,90	3,23
Factor D	0,15	0,03
Factor E	0,40	0,13
Factor F	0,0	0,03
Factor G	0,10	0,03

Taula 29: V_{nominal} - V_{alternatiu} per als diferents factors

	PA1	PA2
Valor límit	0,47	0,14

Taula 30: Valors límits per als dos principis actius

6. CONCLUSIONS

Una vegada obtinguts tots els resultats per a cadascun dels paràmetres estudiats per a la validació, es pot arribar a els següents conclusions:

- Amb la optimització del mètode analític, s'ha aconseguit determinar els dos principis actius amb un temps d'anàlisi molt més curt, fent així que la productivitat del laboratori augmenti notablement.
- Mitjançant la optimització del tractament de mostra s'han pogut obtenir els paràmetres més adequats per obtenir major recuperacions i la reproductibilitat en el procés d'extracció de mostres.
- Els resultats obtinguts respecte l'estabilitat dels dos principis actius, afirmen l'estabilitat per un període de temps significatiu tant en el *swab* com en les plaques.

- Pel que fa a la linealitat dels dos compostos, s'han determinat valors del coeficient de correlació molt propers a 1. De tal manera que es recolza la idea de l'ús de la regressió lineal per tal de determinar els principis actius.
- S'ha demostrat la precisió del mètode mitjançant l'estudi de les repetibilitats:
 - La repetibilitat del mètode, tant a concentracions baixes com altes, ha mostrar resultats semblants entre les mesures.
 - La precisió intermèdia no ha presentat diferències significatives entre diferents analistes i dies.
 - La repetibilitat del sistema instrumental, s'ha determinat amb valors repetitius en els dos nivells de concentració.
- La selectivitat ha mostrat una resolució dels pics excel·lent per tal de quantificar-los de manera precisa i sense interferències.
- L'exactitud del mètode determina una petita variació en les mostres a concentracions baixes. Tot i això, l'exactitud es considera acceptable.
- S'ha determinat que el flux de la fase mòbil és un paràmetre que afecta al mètode gràcies a l'estudi de la robustesa.

Once all the results for each of the parameters studied for validation have been obtained, the following conclusions can be drawn:

- Optimization of the analytical method: The two active ingredients have been determined in a much shorter analysis time, significantly increasing the laboratory's productivity.
- Optimization of sample treatment: The most appropriate parameters for obtaining higher recoveries and reproducibility in the sample extraction process have been identified.
- Stability of the active ingredients: The results regarding the stability of the two active ingredients confirm their stability over a significant period, both in the *swabs* and in the plates.
- Linearity: The correlation coefficient values obtained for the two compounds are very close to 1, supporting the use of linear regression to determine the active ingredients.
- Method precision: The precision of the method has been demonstrated through the study of repeatability:
 - Repeatability: The repeatability of the method, both at low and high concentrations, shows similar results between measurements.
 - Intermediate precision: No significant differences were observed between different analysts and days.
 - Instrumental repeatability: The instrumental repeatability was determined with consistent values at both concentration levels.
- Selectivity: The method shows excellent peak resolution, allowing for precise quantification and without interferences.
- Accuracy: The method shows a small variation in samples at low concentrations. However, the accuracy is considered acceptable.
- Robustness: It has been determined that the flow rate is a parameter that affects the method, as demonstrated by the robustness study.

7. BIBLIOGRAFIA

1. *Cenavisa animal health & aquaculture*. Cenavisa.com. <https://cenavisa.com/> (accés 2024-10-14).
2. *Guía de Normas de Correcta Fabricación*. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/> (accés 2024-10-14).
3. *Buenas prácticas de distribución de medicamentos - AENOR*. Aenor.com. <https://www.aenor.com/certificacion/quimico-farmaceutico-y-cosmetico/buenas-practicas-distribucion-medicamentos> (accés 2024-10-15).
4. *Delegated regulation - 2017/1569 - EN - EUR-Lex*. Europa.eu. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017R1569> (accessed 2024-10-15).
5. Walsh, A. Cleaning Validation for the 21st Century: Overview of New ISPE Cleaning Guide. Researchgate.net. https://www.researchgate.net/profile/Andrew-Walsh-23/publication/262875577_Cleaning_Validation_for_the_21_Century_Overview_of_New_ISPE_Cleaning_Guide/links/00b7d5390cc94d175e000000/Cleaning-Validation-for-the-21-Century-Overview-of-New-ISPE-Cleaning-Guide.pdf (accés 2024-10-16).
6. Rezquellah, W. Validación de Los Procesos de Limpieza En La Industria Farmacéutica, Mediante La Aplicación Del Análisis de Riesgo, Seguridad Toxicológica y UPLC. **2015**.
7. Mendenhall, D. W. Cleaning Validation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1989**, 15 (13), 2105–2114. <https://doi.org/10.3109/03639048909052522>.
8. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. Ich.org. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (accés 2024-10-18).
9. Ortega, L. A.; García, García, F. J.; Et-al. Validación de Métodos Analíticos; AEFI: Barcelona, **2001**.
10. Talero-Pérez, Y. V.; Medina, Ó. J.; Rozo-Núñez, W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ. Sci. (Bogotá)* **2013**, 19 (1), 11–28. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>.
11. Aguilar, B.; Hernández, R. G. Protocolo de Validación de Métodos Analíticos Para La Cuantificación de Fármacos. *Revista Cubana de Farmacia* **1996**, 30 (1), 0–0.
12. **European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare**. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 10th ed.; European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: Strasbourg, France, **2020**; Chapter 5.1.10: Cleaning validation (accés 2024-10-21).
13. U.S. Food and Drug Administration. **Animal Veterinary**. <https://www.fda.gov/animal-veterinary> (accés 2024-10-21).
14. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). <https://www.pmda.go.jp/> (accés 2024-10-21).
15. International Council for Harmonisation. <https://www.ich.org/> (accés 2024-10-23).
16. Chromedia. *Chromatography Knowledge Base*. <https://www.chromedia.org/> (accés 2024-10-30).
17. *Lab-Tips® Bastoncillo de poliéster de punto grande (LTP125)*. Productos Para Salas Blancas | Berkshire España. <https://berkshire.com.es/tienda/hisopo-bastoncillos->

limpieza-sala-limpia/hisopos-de-poliester/lab-tips-large-applicator-polyester-swab/
(accés 2024-10-30).

18. Kumar, R.; Gupta, P.; Jain, S. Validation of Cleaning Processes in the Pharmaceutical Industry. *J. Valid. Technol.* **2011**, 17 (1), 50–57 (accés 2024-10-31).

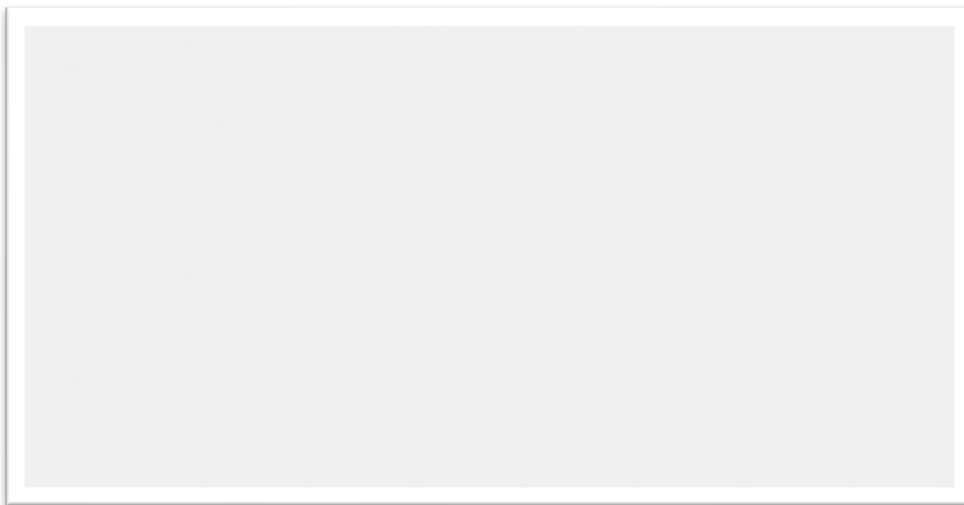
8. ANNEXOS

8.1 ANNEX 1: Taula de seguretat dels reactius

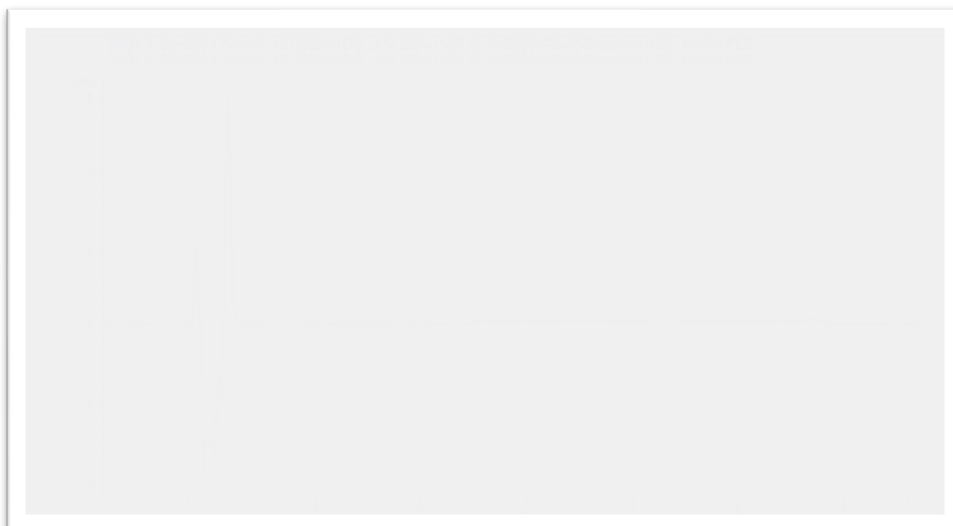
Reactiu	N CAS	Perillositat	Proveïdor	Puresa	Manipulació
MeOH	67-56-1		ITW Reagents	99,9%	Bata, ulleres de seguretat i guants
ACN	75-05-8		ITW Reagents	99,9%	Bata, ulleres de seguretat i guants
Àcid acètic glacial	64-19-7		Scharlau	99,8%	Bata, ulleres de seguretat i guants
Trietilamina	121-44-8		Scharlau	99,7%	Bata, ulleres de seguretat i guants
NaOH 0.5M	1310-73-2		Scharlau	99,9%	Bata, ulleres de seguretat i guants
Trietanolamina	102-71-6		Scharlau	98,0%	Bata, ulleres de seguretat i guants

8.2 ANNEX 2: Cromatogrames referents a la selectivitat

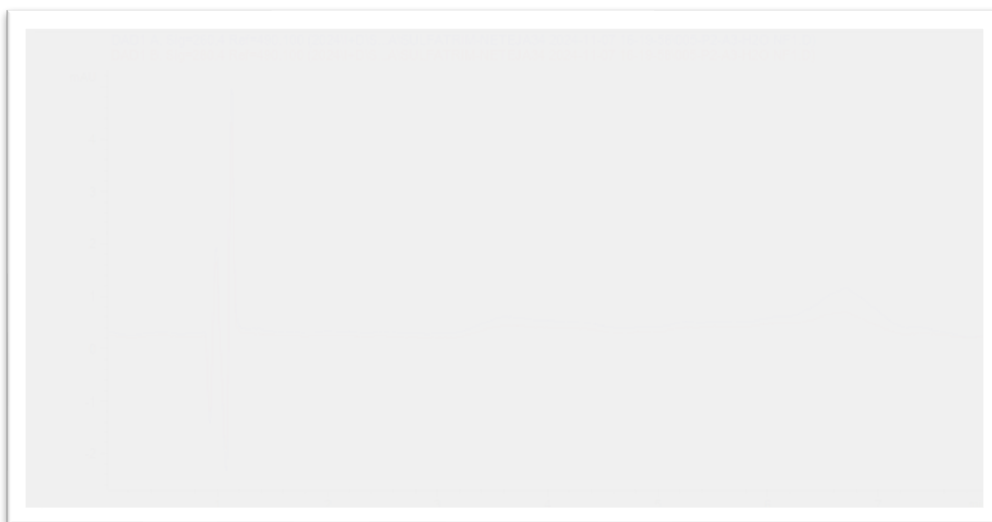
- Dissolvent no filtrat



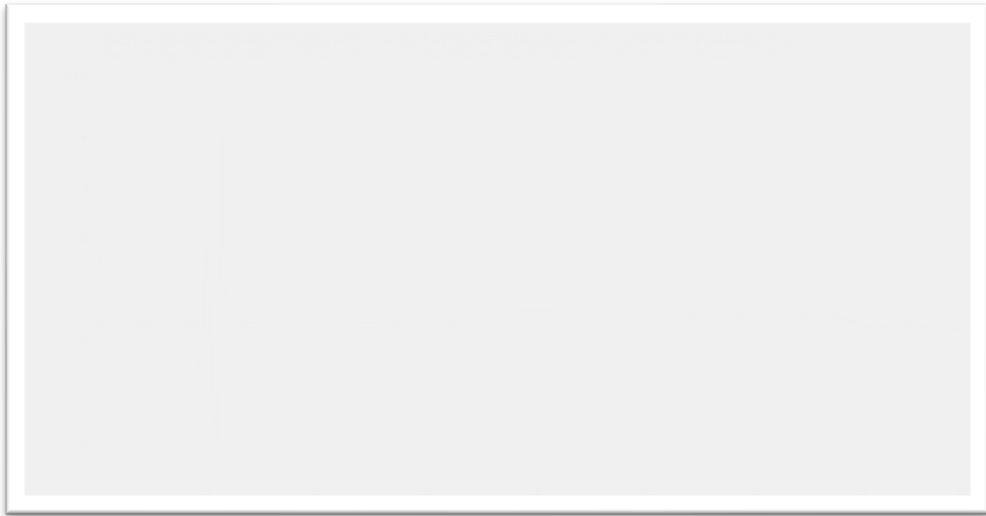
- Dissolvent filtrat



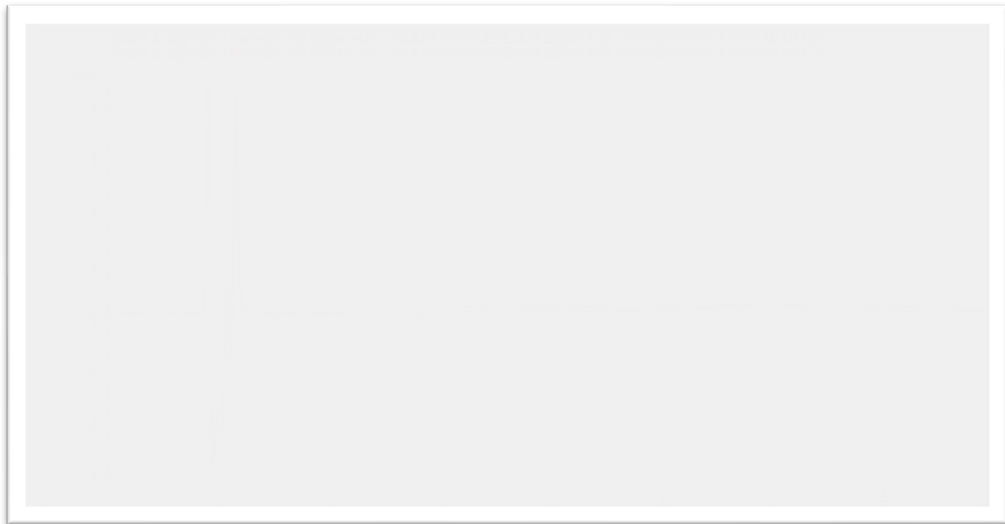
- H₂O no filtrada



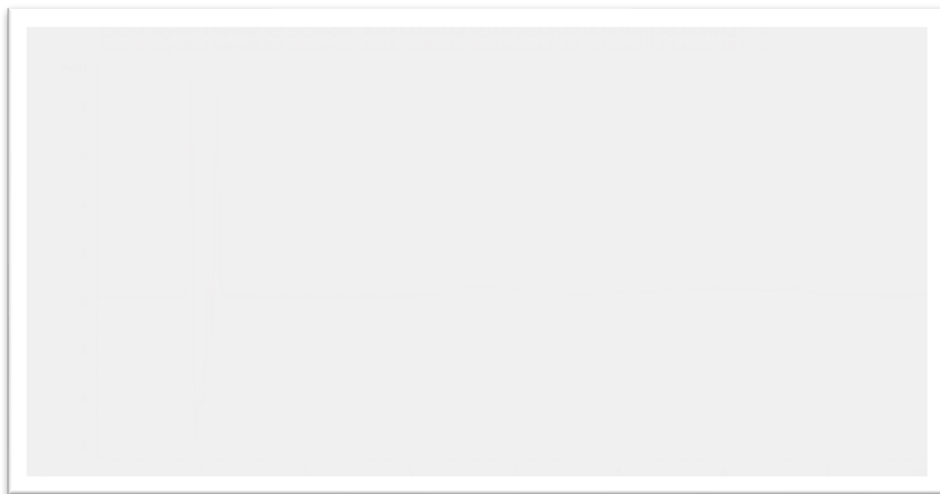
- H₂O filtrada



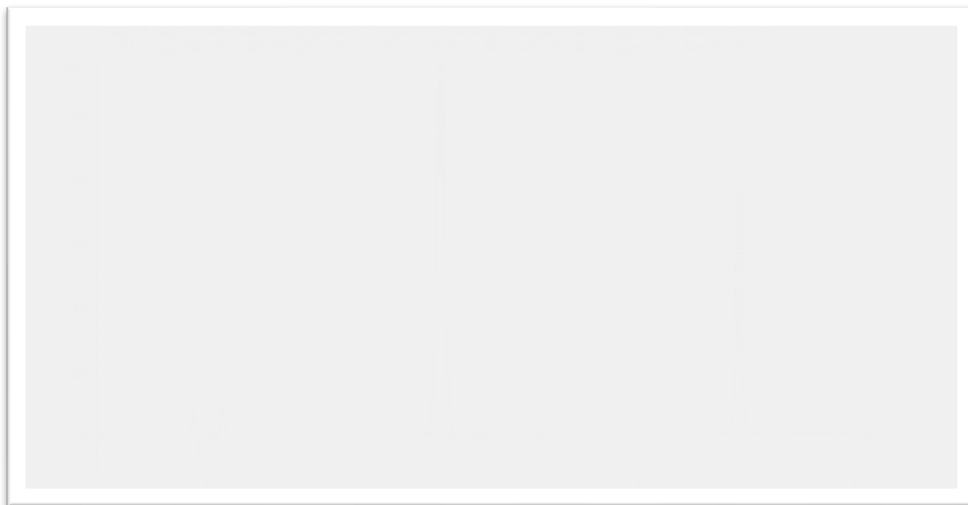
- Extracció d'un *swab* estèril no filtrada



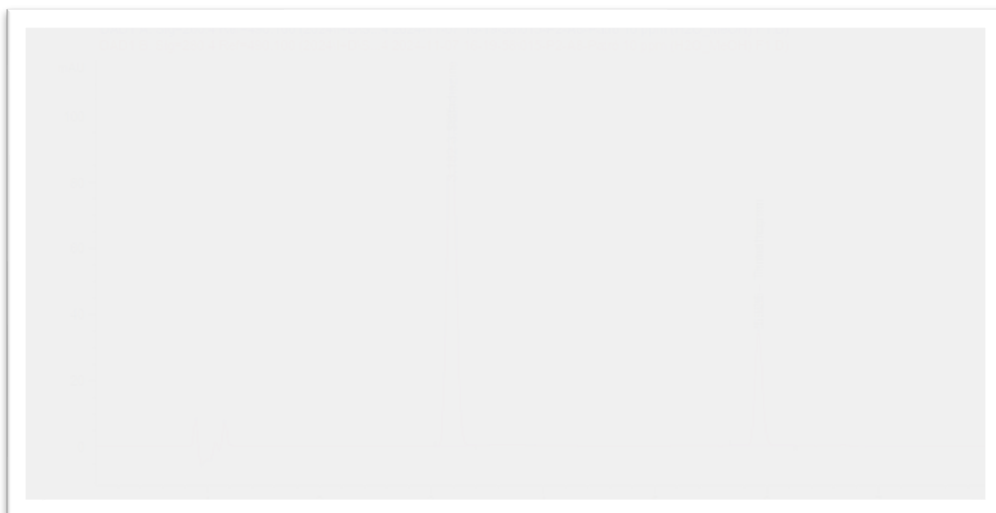
- Extracció d'un *swab* estèril filtrada



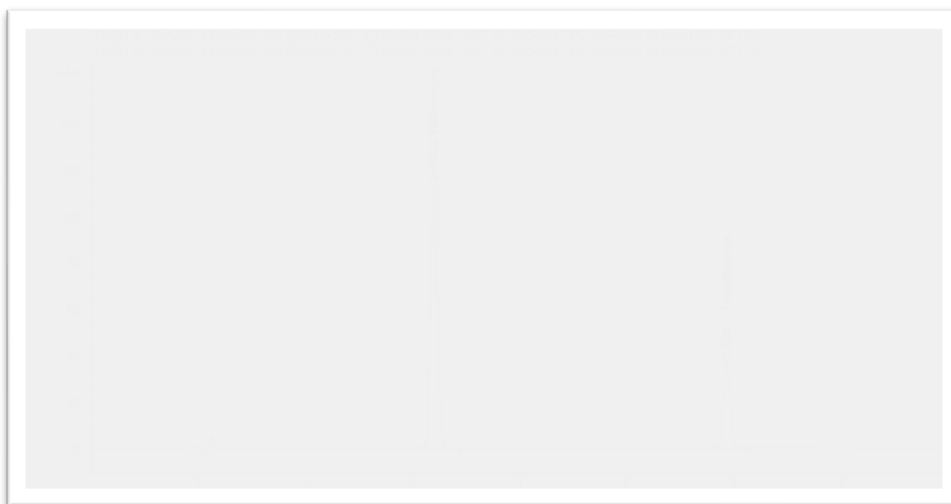
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb dissolvent i no filtrada



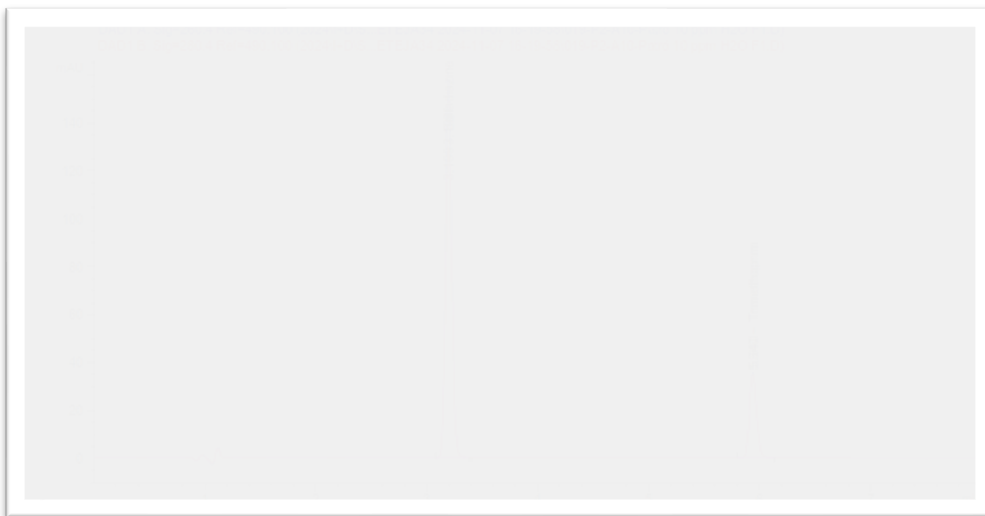
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb dissolvent i filtrada



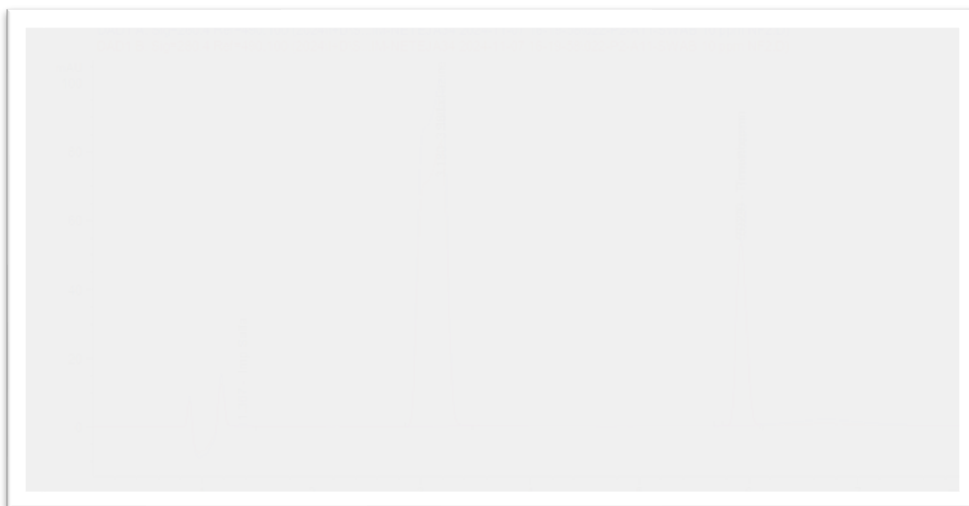
- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb H₂O i no filtrada



- Patró 10 ppm de PA1 i PA2 enrasat amb H₂O i filtrada



- Extracció no filtrada d'un *swab* dopat amb una solució de 10ppm enrasada amb dissolvent



- Extracció filtrada d'un *swab* dopat amb una solució de 10 ppm enrasada amb dissolvent

