

**VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER CROMATOGRAFIA DE
LÍQUIDS PER LA DETERMINACIÓ DEL PRINCIPI ACTIU
CLORTETRACICLINA I LES SEVES IMPURESES EN UN
MEDICAMENT D'ÚS VETERINARI**

Natalia Haro Anglès

Dirigit per Sílvia Bertolí Inglés

Supervisat per Maribel Escribano Català

i

Tutoritzat per Nicolás Carlos Pazos Pérez

TREBALL FI DE GRAU

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



Tarragona, 2021

CONFIDENCIALITAT

Al treballar a CENAVISA S.L., una empresa comercial de producció de fàrmacs d'ús veterinari, el projecte està subjecte a una clàusula de confidencialitat. Degut a això alguns termes específics no es mencionaran.

ÍNDIX

Confidencialitat	3
1. Resum	5
Abstract	5
2. Introducció	5
3. Objectiu	8
4. Fonaments de la cromatografia de líquids	9
5. Part experimental.....	10
5.1. Mètode analític	10
5.2. Reactius i estàndards.....	11
5.3. Preparació de les solucions patró i mostres.....	12
5.4. Mesura dels paràmetres avaluats	13
5.5. Anàlisis dels resultats	14
6. Resultats i discussió.....	14
6.1. Estabilitat de la mostra de clortetraciclina.....	14
6.2. Selectivitat	16
6.3. Linealitat.....	16
6.3.1. Linealitat del principi actiu clortetraciclina	16
6.3.2. Linealitat de les impureses.....	19
6.4. Precisió	22
6.4.1. Repetibilitat del sistema instrumental	23
6.4.2. Repetibilitat del mètode.....	25
6.4.3. Precisió intermèdia.....	26
6.4.4. Precisió intermèdia del principi actiu.....	26
6.4.5. Precisió intermèdia de les impureses.....	27
6.5. Exactitud.....	28
6.5.1. Exactitud del principi actiu	28
6.5.2. Exactitud de les impureses.....	28
6.6. Límits de detecció i quantificació	29
7. Conclusions.....	30
Conclusions.....	32
8. Futurs estudis	33
Agraïments	34
9. Bibliografia.....	35

10.	Annexos	38
10.1.	Annex I. Cromatograma del estàndard de clortetraciclina	38
10.2.	Annex II. Cromatograma del dissolvent de la preparativa de mostres	39
10.3.	Annex III. Cromatograma del placebo de la preparativa de les mostres	40
10.4.	Annex VI. Cromatograma de la clortetraciclina de la preparativa de les mostres.....	41
10.5.	Annex V. Cromatograma de la tetraciclina de la preparativa de les mostres.....	42
10.6.	Annex VI. Cromatograma del System Suitability de la preparativa de les mostres	43
10.7.	Annex VII. Cromatograma del Producte Farmacèutic de la preparativa de les mostres ..	44

1. RESUM

El present projecte té com a objectiu el desenvolupament i la validació d'un mètode analític per a la determinació del principi actiu clortetraciclina i les seves impureses en un medicament d'ús veterinari per polvorització cutània. Aquest s'ha dut a terme mitjançant la tècnica de cromatografia de líquids, *Liquid Chromatography* (LC). S'han avaluat diferents paràmetres per la validació del mètode, i s'han obtingut uns resultats correctes, per tant, es pot assumir que el mètode analític proposat utilitzant la tècnica LC és vàlid per a l'anàlisi del medicament.

ABSTRACT

The aim of this project is to develop and validate an analytical method for the determination of the active ingredient chlortetracycline and its impurities in a veterinary medicinal product for skin spraying. This has been carried out using the liquid chromatography technique, Liquid Chromatography (LC). Different parameters have been evaluated for the validation of the method, and correct results have been obtained, therefore, it can be assumed that the proposed analytical method using the LC technique is valid for drug analysis.

2. INTRODUCCIÓ

El Treball de Fi de Grau que es descriu a continuació s'ha realitzat al departament de Control de Qualitat de l'empresa CENAVISA S.L. Aquesta és una empresa farmacèutica que es dedica a la investigació, desenvolupament, fabricació i comercialització de medicaments nutricionals i biocides per a ús veterinari.

Durant els darrers anys, CENAVISA ha experimentat un creixement exponencial en la distribució de medicaments subjectes a prescripció veterinària degut a l'augment en l'interès i necessitat pels medicaments d'ús animal. Aquest augment ha estat causat per l'increment de la població, ja que des dels anys 60 fins ara, aquesta s'ha duplicat i ha passat de consumir 70 milions de tones de carn a consumir-ne 330 milions [1]. El creixement del sector ramader ha comportat un major risc de brots de malalties, i com a conseqüència ha augmentat la demanda de medicaments per als animals, fet que ha afavorit a les indústries farmacèutiques [2].

Aquest increment en la demanda de medicaments per a animals comporta uns riscos associats a la seva administració i manipulació que és necessari tenir en compte [3]. La seguretat dels propis animals, la de l'usuari, el medi ambient i la salut pública es poden veure afectats [4], és per això que els medicaments necessiten ser regulats. Concretament, els productes veterinaris tenen la seva base legal

en la Llei 29/2006 de garanties i ús racional dels medicaments i productes sanitaris. Aquesta normativa, regula la dispensació i el subministrament de medicaments per a ús animal, i inclou disposicions¹ emeses pel Ministeri de Sanitat, Serveis Socials i Igualtat i el Ministeri d'Agricultura, així com també els organismes dependents de les comunitats autònomes [5].

Una vegada completat tot el registre per poder comercialitzar un medicament, l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris (AEMPS) és l'encarregada d'autoritzar la comercialització [6]. L'AEMPS té com a missió garantir a la societat, des de la perspectiva de servei públic, la qualitat, seguretat, eficàcia i correcta informació dels medicaments i productes sanitaris, en el més ampli sentit, des de la seva investigació fins a la seva utilització, en interès de la protecció i promoció de la salut de les persones i dels animals [6].

Per tal de garantir els estàndards de qualitat dels productes, totes les empreses del sector farmacèutic han de treballar respectant les guies de Bones Pràctiques de Fabricació (BPF) o més conegudes com *Good Manufacturing Practices* (GMP) [7] i les Bones Pràctiques de Distribució, conegudes com *Good Distribution Practices* (GDP) [8].

Per tal de garantir la qualitat del producte és necessària la validació del mètode analític emprat en la determinació del principi actiu del medicament així com les seves impureses. És per això que les indústries farmacèutiques han de demostrar que els seus mètodes proporcionen resultats fiables. Aquest treball està enfocat en la validació d'un mètode analític per a la determinació d'un principi actiu i les seves impureses en un producte acabat desenvolupat a CENAVISA.

El producte en qüestió és la Clortetraciclina 20 mg/mL en suspensió per a polvorització cutània. Aquest medicament pertany al grup farmacoterapèutic dels antibiòtics per a ús tòpic. S'utilitza per al tractament de ferides superficials traumàtiques o quirúrgiques i infeccions superficials de peülles i pell contaminades per microorganismes sensibles a la clortetraciclina en diverses espècies de destí com ara aus, bovins i porcins.

Com el seu nom indica el principi actiu és la clortetraciclina, la qual és un antibiòtic bacteriostàtic del grup de les tetraciclines que s'uneix a la subunitat ribosomal 30S bloquejant la unió de tRNAs sobre el mRNA, per la qual cosa inhibeix la síntesi de proteïnes, matant la cèl·lula [9].

La clortetraciclina és un compost inestable en solució aquosa [10] [11], de tal manera que en la producció el medicament es dissol en alcohols anhidres i altres excipients per tal d'evitar la seva

¹ Disposició es refereix a una prescripció adoptada per una institució amb autoritat per poder establir normes.

degradació. Per tant, és important analitzar el medicament i conèixer la concentració del principi actiu i les seves impureses.

Existeixen 2 tipus d'impureses [12]:

- Impureses de síntesis. Es produeixen en la síntesis del principi actiu i la seva concentració es manté constant.
- Impureses de degradació. Aquestes impureses augmenten o disminueixen amb la degradació del principi actiu.

Per evitar que la concentració de clortetraciclina (principi actiu) disminueixi i augmenti la de les impureses, s'ha d'analitzar el fàrmac abans de la seva comercialització.

La molècula de clortetraciclina (Figura 1) presenta diferents grups funcionals com amines primàries i terciàries, alcohols, cetones i halògens, els quals són grups polars, però la seva disposició fa que la molècula sigui apolar [13]. Degut a la apolaritat de la molècula és adequat emprar la cromatografia de líquids en fase reversa on la fase estacionària és més apolar que la fase mòbil.

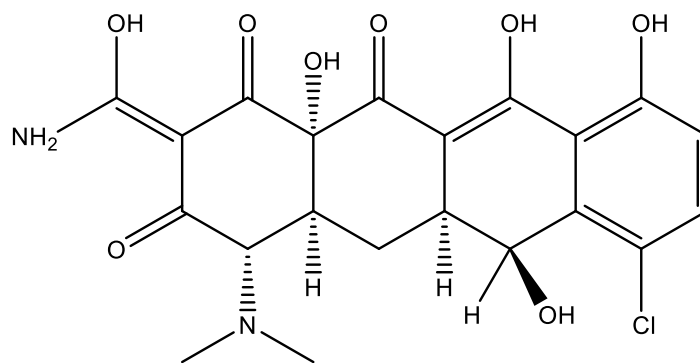


Figura 1. Estructura de la clortetraciclina.

Com s'ha mencionat anteriorment, la clortetraciclina pot degradar-se en diferents impureses entre les quals es troba la tetraciclina [11], on a la Figura 2 es mostra la seva estructura.

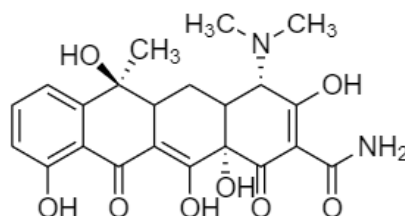


Figura 2. Estructura de la tetraciclina.

A part de la tetraciclina hi ha altres impureses (Taula 1) i, a l'Annex 9.1 es pot veure el cromatograma teòric [14] on apareixen totes les impureses i on s'observa, per tant, l'ordre d'elució d'aquestes.

Taula 1. Estructures de les impureses del medicament que conté la clortetraciclina com a principi actiu.

4-epichlortetracycline IMPURESA A	Demeclocycline IMPURESA B	4-epidemethyltetracycline IMPURESA C
4-epitetracycline IMPURESA D	4-epidemethylchlortetracycline IMPURESA E	4-epiisochlortetracycline IMPURESA F
Isochlortetracycline IMPURESA G	2-acetil-2-decarboxamidochlortetracycline IMPURESA H	4-epianhydrotetracycline IMPURESA I
Anhydrotetracycline IMPURESA J	4-epianhydrochlortetracycline IMPURESA K	Anhydrochlortetracycline IMPURESA L

El mètode analític proposat per a la determinació de la clortetraciclina i les seves impureses en el producte farmacèutic es basa en el mètode de LC descrit a la monografia de la Farmacopea Europea [14]. Per tal de validar aquest mètode en el producte farmacèutic s'avaluaran els següents paràmetres: selectivitat, linealitat, repetibilitat del mètode, repetibilitat del sistema instrumental, precisió intermèdia, exactitud, robustesa i límits de detecció i quantificació. El significat de cadascun d'aquests paràmetres s'explica a la secció de resultats.

3. OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest treball és la validació d'un mètode analític que permeti determinar la concentració del principi actiu i les impureses en un medicament d'ús veterinari en suspensió per polvorització cutània mitjançant LC. Per realitzar la validació del mètode s'han seguit les guies descrites per l'Associació Espanyola de Farmacèutics de la Indústria (A.E.F.I.).

Els objectius personals a nivell formatiu són aplicar els coneixements adquirits durant el grau en l'àmbit de la química i aprendre a utilitzar la tècnica LC.

4. FONAMENTS DE LA CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS

La cromatografia de líquids és una tècnica cromatogràfica en columna que té com a objectiu separar diversos anàlits presents en una mateixa mostra. Tal i com es pot observar a la Figura 3, l'esquema general en cromatografia de líquids consta del sistema d'injecció, de la columna cromatogràfica, el sistema de bombeig, el detector i finalment el sistema d'adquisició de dades.

La columna està constituïda per un recobriment anomenat fase estacionària, que s'encarrega d'interactuar amb els anàlits. Els grups funcionals lliures interactuen amb la fase estacionària mitjançant interaccions iòniques, de Van der Waals o ponts d'hidrogen. Això donarà una major o menor afinitat als diferents anàlits a interaccionar amb la fase estacionària. Una major afinitat incrementarà el temps que els anàlits estaran units a la columna, separant-los dels anàlits amb menor afinitat. La fase mòbil acostuma a ser una mescla de dissolvents orgànics i solucions tampó, que tenen com a funció ajudar a eluir els anàlits que queden retinguts a la columna [15]. Habitualment es treballa amb elucions en gradient que permeten modificar la composició de la fase mòbil en el temps, cosa que afecta a l'afinitat dels anàlits per la fase estacionària, augmentant el seu poder de separació.

El funcionament general d'un sistema cromatogràfic consisteix en la introducció de la mostra mitjançant un injector. Un cop s'injecta la mostra, aquesta és transportada fins la columna mitjançant el flux de la fase mòbil que circula pel sistema gràcies al sistema de bombeig. Quan la mostra passa per la columna, els anàlits interaccionen tant amb la fase estacionària com amb la fase mòbil i queden retinguts a la fase estacionària en funció del grau d'afinitat que tinguin per aquesta. Si l'anàlit té més afinitat, aquest quedarà més temps retingut a la fase estacionària i, per tant, sortirà a un temps de retenció major que un anàlit que no tingui tanta afinitat i, per tant, no estigui tant de temps retingut. Un cop s'han eluït els anàlits, el flux de la fase mòbil arrossega els anàlits i els transporta fins al detector. Els compostos arriben per separat al detector, el qual en funció de quin tipus sigui, genera un tipus de senyal o un altre. El detector genera un gràfic de temps versus la quantitat de senyal que s'anomena cromatograma. Quan diferents anàlits surten de la columna, la intensitat de la senyal del detector augmenta, donant pics quan les molècules s'han separat correctament. La senyal detectada és directament proporcional a la quantitat de molècula que ha eluït, per tant, l'àrea del pic és també directament proporcional a la quantitat de molècula. Per últim, el software permet controlar l'equip, ajuda a la gestió de les dades obtingudes i permet fer la integració dels pics [16].

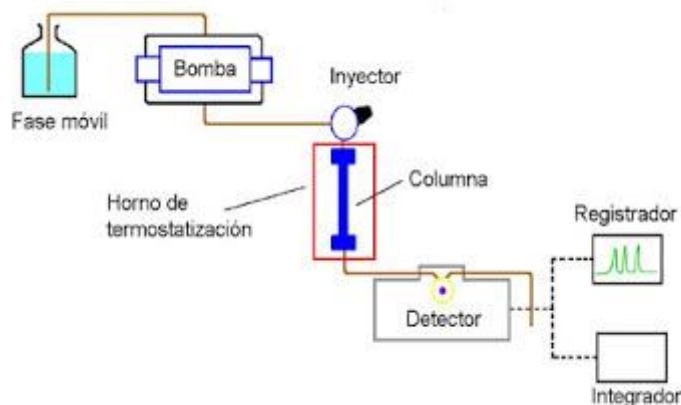


Figura 3. Esquema del funcionament d'un cromatògraf de líquids [17].

En aquest projecte es treballa amb cromatografia de líquids de fase reversa emprant una columna C8, la qual presenta una cadena de 8 carbonis en la seva estructura (Figura 4) que la fan apolar i els anàlits han de tenir una certa apolaritat per quedar retinguts en aquesta. Els anàlits també interaccionen amb la fase mòbil, que és més polar. Els anàlits que interaccionen més amb la fase mòbil que amb la fase estacionària elueixen primer, és a dir, l'ordre d'elució serà de més polar a més apolar. El recobriment d'aquesta està format per partícules molt petites, lo qual requereix l'ús d'elevades pressions per a que la fase mòbil, que arrossega els analits, passi en un temps considerable. Això augmenta el poder de resolució de la tècnica [18].

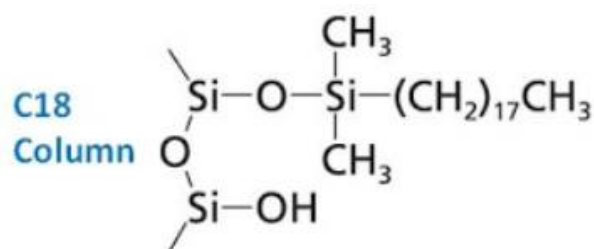


Figura 4. Estructura del recobriment d'una columna C8 [18].

5. PART EXPERIMENTAL

5.1. MÈTODE ANALÍTIC

Les anàlisis cromatogràfiques es van dur a terme amb un cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC 1260 Infinity II LC Systems, Agilent Technologies®) amb bomba binària (Bin Pump, Agilent Technologies®) i inyector automàtic acoblat a un detector de díodes en fila (DAD) [19] (Agilent Technologies®).

La separació cromatogràfica es va dur a terme mitjançant una columna de fase estacionària C8 del tipus Symmetry Shield RP8 (Waters) (3,5 µm, 4,6 x 75 mm). La temperatura del forn es va fixar a 45°C i el flux de treball era de 0,4 mL/min. Es va establir una longitud d'ona del detector de 280 nm per treballar al màxim d'absorbància per als derivatius de clortetraciclina [20]. Es van utilitzar dos volums d'injecció, 10 µl per a la quantificació del contingut en clortetraciclina i 20 µl per a la quantificació d'impureses. Es va utilitzar un gradient d'elució² amb dues bombes per tal de resoldre correctament els pics.

La fase mòbil estava composta per dues fases mòbils (A i B). La fase mòbil A contenia aigua, una solució 8,5% HClO₄ i DMSO (725:50:225), en canvi la fase mòbil B contenia els mateixos reactius en unes altres proporcions (250:50:700) [14]. Es va utilitzar un sistema de filtració de fases mòbils amb bomba al buit amb un filtre de membrana Nylon 0,2 µm 47 mmØ pK 50 (Teknokroma®).

Del minut 0 al 46 la fase mòbil passava d'un 100% (v/v) de A a un 100% (v/v) de B, del minut 46 al 50 es mantenia a un 100% (v/v) de B i del minut 50 al 58 tornava a les condicions inicials (Taula 2).

Taula 2. Gradient d'elució.

Temps (min)	Fase mòbil A (percentatge v/v)	Fase mòbil B (percentatge v/v)
0	100	0
46	0	100
50	0	100
58	100	0





5.2. REACTIUS I ESTÀNDARDS

Per a la validació es va utilitzar un estàndard de clortetraciclina HCl secundari que prèviament va ser estandarditzat amb un estàndard de clortetraciclina primari de Farmacopea Europea. Aquesta estandardització es va realitzar a CENAVISA abans de que m'unís al projecte. Es va utilitzar un estàndard de tetraciclina HCl de Sigma Aldrich i un estàndard de *System Suitability*³ de Farmacopea Europea contenint les impureses A, B, D, E, G, H, J, K i L. La resta de reactius utilitzats van ser HClO₄ i DMSO. A continuació a la Taula 3 es mostren els diferents reactius emprats, el proveïdor, la puresa, la perillositat i les indicacions de la seva manipulació.

² Gradient d'elució: canvi de la composició de la fase mòbil durant l'anàlisi.

³ El *System Suitability* és un estàndard que conté totes les impureses que es poden identificar en la clortetraciclina i serveix per comprovar aquestes impureses estan separades correctament i amb l'ordre d'elució adequat.

Taula 3. Dades de la perillositat i la manipulació recomanada dels diferents reactius emprats.

Reactiu	Proveïdor i Puresa	Perillositat (Pictogrames)	Manipulació
HClO ₄	Scharlab 70%		Bata, ulleres de seguretat, guants i vitrina
Dimetilsulfòxid	Honeywell > 99,7%		Bata, ulleres de seguretat, guants i vitrina
Clortetraciclina	EDQM 96,9%		Bata, ulleres de seguretat, guants i vitrina
Tetraciclina	Sigma Aldrich ≥ 95%		Bata, ulleres de seguretat, guants i vitrina
System Suitability	EDQM	-	Bata, ulleres i guants

5.3. PREPARACIÓ DE LES SOLUCIONS PATRÓ I MOSTRES

Per la realització de la validació del mètode es van realitzar diferents anàlisis, a continuació es mostra com es van preparar les solucions patró i les mostres per realitzar cada una de les analítiques:

Solució patró de clortetraciclina: 27,9 mg d'estàndard de clortetraciclina HCl es van dissoldre en 25 mL de fase mòbil B.

L'estàndard de clortetraciclina és una mescla de clortetraciclina HCl i tetraciclina HCl, per tant, en el cromatograma sortiran dos pics. De manera que, quan es parla de concentració nominal de 1000 ppm en el treball, són 1000 ppm de clortetraciclina més tetraciclina. Al llarg del treball s'observarà una concentració real que no és exactament 1000 ppm. Això és degut a què pesar exactament 27,9 mg no és fàcil. De tal manera que es pesava una quantitat semblant (27,4 mg - 2 8,3 mg) i amb el pes real es calculava la concentració real (981 ppm - 1014 ppm).

Solució patró de tetraciclina: 27,9 mg d'estàndard de tetraciclina HCl es van dissoldre amb 25 mL de fase mòbil B i es va fer una dilució de 0,5 mL a 10 mL.

Solució patró de les impureses: 5 mg de l'estàndard del *System Suitability* es van dissoldre amb 5 mL de fase mòbil B.

Mostra de placebo: 650 µl de matriu⁴ es van dissoldre amb fase mòbil B fins a 25 mL.

Mostra del producte farmacèutic: 0,5 g de producte farmacèutic es van dissoldre en 25 ml de fase mòbil B.

Per a totes les preparatives es van injectar 10 µl immediatament després de ser preparades, excepte la solució patró de les impureses que es van injectar 20 µl.

5.4. MESURA DELS PARÀMETRES AVALUATS

Per avaluar l'estabilitat d'una mostra d'estàndard de clortetraciclina HCl es va preparar una mostra a concentració nominal (1000 ppm) tot pesant la quantitat corresponent (25 mg de l'estàndard de clortetraciclina HCl), dissolent amb fase mòbil B i enrasant a 25 mL. Es va injectar de forma consecutiva 15 vegades durant 16 hores per veure quin ritme de degradació tenia la molècula.

Per tal d'avaluar la selectivitat del mètode i comprovar que no existien interferències entre els excipients i els anàlits d'interès, es van analitzar per separat el placebo (0,5 g/25 mL), la clortetraciclina (1000 ppm), la tetraciclina (50 ppm), les impureses (*System Suitability*) i el producte farmacèutic (0,5 g/25 ml).

L'avaluació de la linealitat de la clortetraciclina s'ha dut a terme en un rang de concentracions de 800 ppm a 1200 ppm en intervals de 100 ppm, per triplicat. Les mostres s'injecten immediatament després de la seva preparativa per evitar la seva degradació.

L'avaluació de la linealitat de les impureses s'ha dut a terme a concentracions de 1,5 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 20 ppm i 25 ppm de l'estàndard de clortetraciclina HCl. La preparativa de les mostres es va fer a partir d'una dilució d'una mostra de 1000 ppm.

Per a la repetibilitat del mètode es van analitzar 6 mostres amb preparatives independents a una concentració nominal de 1000 ppm.

Per a la repetibilitat del sistema instrumental, tant del principi actiu com de les impureses, es va analitzar una mostra 6 vegades de forma consecutiva. Aquesta mostra era la última de la repetibilitat del mètode.

⁴ La matriu inclou tots els components de la fórmula farmacèutica excepte el principi actiu.

Per a la precisió intermèdia es van avaluar mostres a una concentració nominal de 1000 ppm per triplicat i entre dos analistes durant 3 dies.

L'exactitud s'avalua per tal de reproduir el millor possible la mostra real però amb una concentració de principi actiu coneguda per veure si el mètode és capaç de mesurar la seva concertació real en les condicions indicades. Per a aquesta avaluació s'han analitzat 6 mostres a concentració nominal de clortetraciclina (1000 ppm). 27,9 mg de l'estàndard de clortetraciclina HCl s'han dissolt amb fase mòbil B, tot afegint una quantitat coneguda de placebo (650 µl) i enrasant a 25 mL. Per al principi actiu s'ha injectat immediatament de la preparativa, en canvi per a les impureses s'ha fet una solució intermèdia de 50 ppm i finalment una dilució directa al vial de 20 ppm. Les mostres es van injectar immediatament després de ser preparades.

Per tal de determinar els límits de detecció i quantificació s'han realitzat mostres a diferents concentracions (0,25 ppm, 0,50 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm i 1,5 ppm). Es van fer una sèrie de dilucions a partir de la mostra de 1000 ppm.

5.5. ANÀLISIS DELS RESULTATS

Una vegada obtinguts els cromatogrames amb el programa OPENLAB *ChemStation*, s'integren els pics de manera automàtica. La integració és necessària per poder quantificar. Aquesta busca el nivell base i va mirant a mesura que passa el temps quan hi ha una pujada per veure on comença el pic, quin és el punt més alt del pic i quan acaba aquest pic, és a dir quan s'estabilitza de nou [21].

Els anàlisis estadístics s'han realitzat manualment utilitzant l'Excel considerant un nivell de significança fiança del 0,05%.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. ESTABILITAT DE LA MOSTRA DE CLORTETRACICLINA

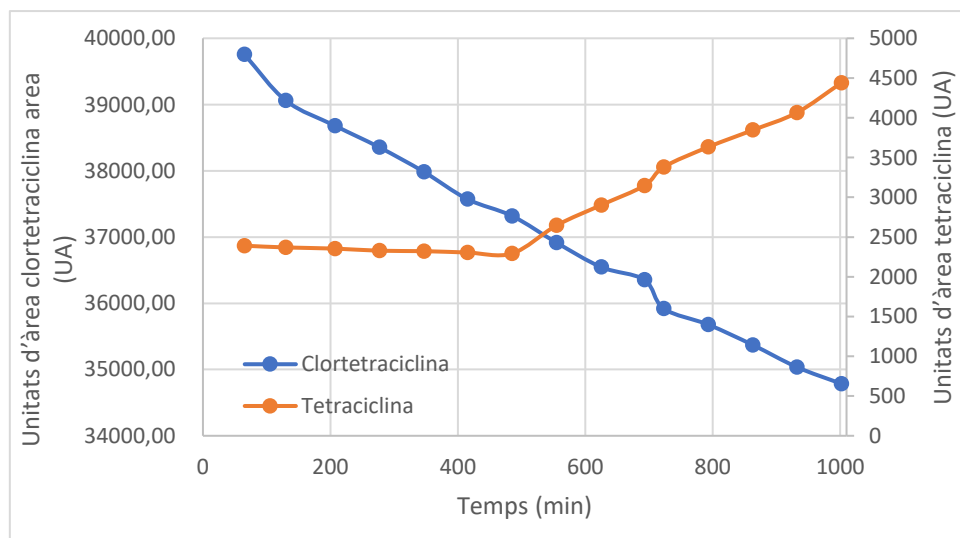
Per realitzar un estudi de l'estabilitat del patró estàndard per veure quant de temps podia estar preparada i que els resultats obtinguts fossin correctes. Es va preparar una mostra a una concentració nominal de 1000 ppm de clortetraciclina i es va analitzar consecutivament en intervals de temps de 65 minuts. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.

Taula 4. Estabilitat en el temps d'una mostra a concentració nominal.

Temps (h)	Unitats d'àrea clortetraciclina	Unitats d'àrea tetraciclina	Factor resposta
0	39757,0	2390,8	42,0
1:05	39060,6	2369,2	41,3
2:10	38681,1	2354,5	40,9
3:15	38353,4	2327,9	40,6
5:20	37982,6	2322,4	40,2
6:25	37571,8	2305,4	39,8
7:30	37319,0	2292,9	39,5
8:35	36915,0	2646,4	39,4
9:40	36546,5	2902,4	39,3
10:45	36353,5	3147,6	39,4
11:50	35920,3	3380,6	39,2
12:55	35678,2	3632,0	39,2
13	35370,6	3845,7	39,1
14:05	35037,0	4064,4	39,0
15:10	34784,8	4439,8	39,1

Observant el factor resposta⁵ es va veure com aquest disminuïa a mesura que avançava el temps, per tant, es va veure que la mostra no era estable. Per aquest motiu es va concloure que les mostres s'havien de preparar immediatament abans de les anàlisis.

Per altra banda, també es va observar que a mesura que l'àrea de la clortetraciclina disminuïa, la de la tetraciclina augmentava, de manera que es va determinar que la clortetraciclina es degrada a altres impureses, entre les quals es troba la tetraciclina (Gràfic 1).



Gràfic 1. Relació del temps respecte les unitats d'àrea de la clortetraciclina i la tetraciclina.

⁵ Factor resposta: relació entre l'àrea del pic cromatogràfic i la concentració teòrica.

6.2. SELECTIVITAT

La selectivitat d'un mètode analític és la capacitat d'identificar individualment els anàlits d'interès en una mostra en presència d'altres components. Les conclusions dels estudis de selectivitat estan vinculats a l'origen de la mostra, l'optimització de la preparació, l'especificitat de la mesura i les condicions instrumentals, per tant, qualsevol canvi pot suposar una reconsideració de l'estudi realitzat [22]. Els cromatogrames obtinguts es troben adjuntats com a Annex (9.2 - 9.7).

Es va observar que en el producte farmacèutic els pics de la clortetraciclina i la tetraciclina tenien els mateixos temps de retenció que en els estàndards corresponents. Per altra banda, les impureses observades en el producte farmacèutic es podien identificar amb el cromatograma obtingut en l'anàlisi del patró de les impureses. Per tant, es va determinar que no hi havia cap interferència amb els nostres anàlits i totes les impureses es trobaven ben resoltes, de manera que es va concloure que el mètode era selectiu.

6.3. LINEALITAT

La linealitat d'un mètode analític és la capacitat de proporcionar resultats directament proporcionals a la concentració de l'anàlit a la mostra dins d'un rang establert. El rang es defineix com l'interval entre la concentració superior i inferior de l'anàlit per al qual s'ha demostrat la correcta precisió, exactitud i linealitat del mètode. En l'àmbit farmacèutic, s'acostumen a realitzar rangs de linealitat del 80-120% respecte la concentració nominal del principi actiu en el producte farmacèutic. De la mateixa manera, per a la quantificació d'impureses s'acostuma a establir un rang de linealitat des del límit de quantificació fins a un 120% de la impuresa màxima permesa per l'especificació [22].

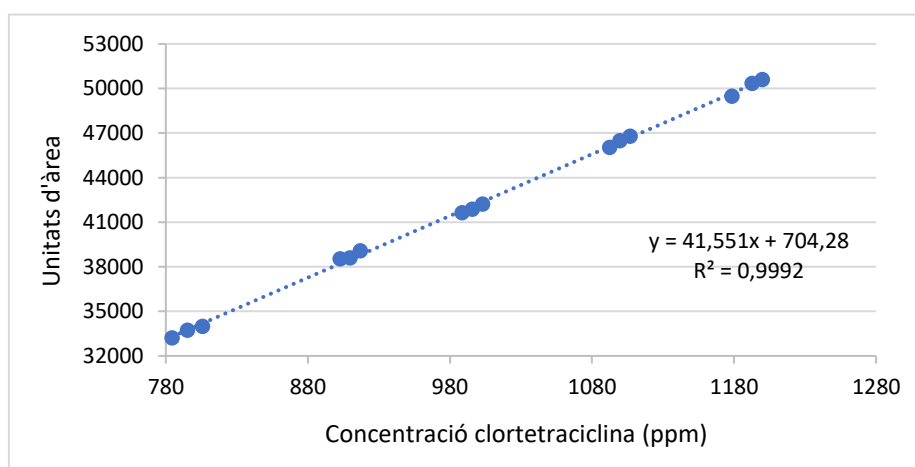
Amb els resultats obtinguts de les anàlisis de les diferents solucions es relaciona la concentració (x) amb la resposta de l'àrea del pic (y). La relació entre aquestes dues variables s'expressa com una recta de regressió de tipus: $y = bx + a$.

6.3.1. Linealitat del principi actiu clortetraciclina

Per tal d'avaluar la linealitat del mètode a concentracions elevades s'han estudiat 5 nivells de concentració per triplicat amb un total de 15 determinacions. Els nivells escollits per al rang han estat del 80, 90, 100, 110, 120% de la concentració nominal. A la Taula 5 es mostren els resultats obtinguts i al Gràfic 2 es representa la recta de regressió obtinguda, la seva equació i el coeficient de correlació (R^2).

Taula 5. Paràmetres de l'estudi de la linealitat del principi actiu clortetraciclina.

Concentració teòrica (ppm)	Concentració real (ppm)	Unitats d'àrea totals	Factor resposta	Desviació estàndard	Variància
80% → 800	784,5	33217,6	42,3	0,13	0,02
	795,2	33729,6	42,4		
	806,0	33987,3	42,2		
90% → 900	917,0	39089,8	42,6	0,14	0,02
	902,7	38549,4	42,7		
	909,8	38613,0	42,4		
100% → 1000	1003,0	42228,4	42,1	0,03	0,00
	988,6	41645,5	42,1		
	995,8	41890,0	42,1		
110% → 1100	1092,5	46047,1	42,1	0,07	0,01
	1106,8	46784,7	42,3		
	1099,7	46492,1	42,3		
120% → 1200	1178,5	49480,2	42,0	0,12	0,01
	1192,8	50342,1	42,2		
	1200,0	50607,3	42,2		
CV (%)			0,48	G_{exp}	0,34
CV (%) segons especificació			≤ 2%	G_{tab} (α=0.05; K=5; n=3)	0,68



Gràfic 2. Recta de regressió de la linealitat del principi actiu.

El coeficient de correlació indica el grau de relació entre la variable x (concentració) i la variable y (unitats d'àrea) i el seu valor màxim és 1. El valor experimental ha de ser igual o superior a 0,999 segons els requeriments de la guia A.E.F.I. [22]. El coeficient de correlació obtingut és 0,9992, per tant, es pot afirmar que existeix una correlació lineal entre la concentració i les unitats d'àrea.

El coeficient de variació del factor resposta s'ha calculat relacionant la mitja dels resultats amb la desviació estàndard d'aquests i té un valor del 0,48%, està per sota del valor màxim acceptat (2%), per

tant es considera vàlid. També s'observa que el factor resposta es manté constant sobre el valor de 42, de manera que també es demostra que no hi ha cap falta de linealitat.

L'estudi de la linealitat no només implica la bondat de la recta de calibratge, si no que s'han de determinar diferents paràmetres estadístics tal com una anàlisi de la variància, un test de Cochran, un anàlisi dels residuals i un test t de Student.

Una anàlisi de la variància (ANOVA) compara diferents mitjanes obtingudes a partir de dades experimentals. Es pot saber si els resultats són comparables o no, però no quin és diferent. Per poder realitzar un anàlisi ANOVA s'han de complir els següents requisits [22]:

- Homogeneïtat de variàncies

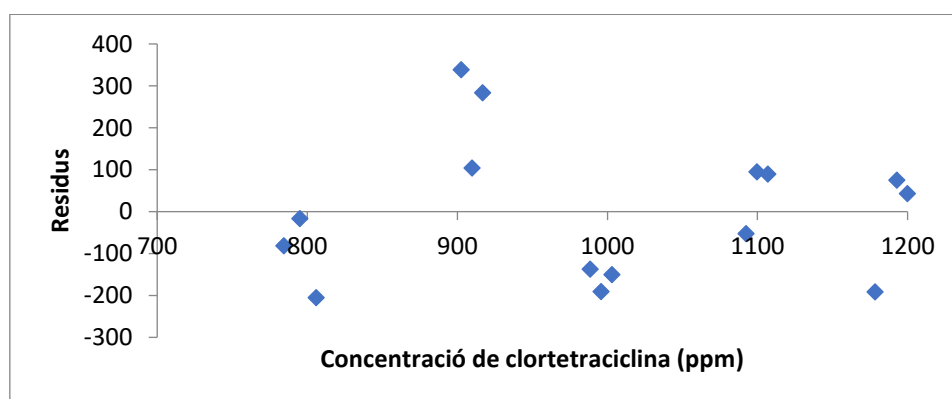
Per comprovar la homogeneïtat de les variàncies s'aplica un test de Cochran, el qual indica si el factor concentració té alguna influència en la variabilitat dels resultats. El valor G_{exp} es calcula amb l'expressió (1) on S^2 és la variància de cada grup K i $S^2_{màx}$ és la variància màxima dels grups K.

$$G_{exp} = \frac{S_{exp}^2}{\sum S^2} = 0,34 \quad (1)$$

El valor experimental trobat és 0,34, el qual és inferior al valor tabulat $G_{tab,(\alpha=0.05; K=5; n=3)} = 0,68$, de manera que les variàncies entre els grups de les diferents concentracions són comparables, per tant, el factor concentració no influeix en la variabilitat dels resultats.

- Anàlisi dels residuals

La normalitat dels residuals es comprova mitjançant la representació gràfica que es mostra en el Gràfic 3, aquesta no ha de presentar cap tendència.



Gràfic 3. Gràfic dels residuals.

Tal i com podem veure en el Gràfic 3, no s'observa cap tendència significativa, per tant, el gràfic dels residuals és correcte.

Per tal de comprovar la validesa de l'anàlisi de la regressió s'ha de fer un test t de Student per a cada paràmetre (a i b) de la regressió. t_{exp} es calcula segons l'expressió (2) on $|a|$ és el valor absolut de la ordenada en l'origen i S_a l'error típic d'aquesta.

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} = 2,153 \quad (2)$$

Com que el valor experimental (2,153) és menor que el valor tabulat $t_{(n-2, 0.05)} = 2,160$, el valor calculat per a la ordenada en l'origen, 704,28, no es pot donar com a correcte. S'ha d'assumir que la recta passa per l'origen de coordenades.

Per tal de comprovar que existeix un pendent significativament diferent de zero es fa mitjançant una prova t de Student, utilitzant l'expressió (3) on $|b|$ és el valor absolut de la pendent i S_b l'error típic d'aquesta.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = 128,0 \quad (3)$$

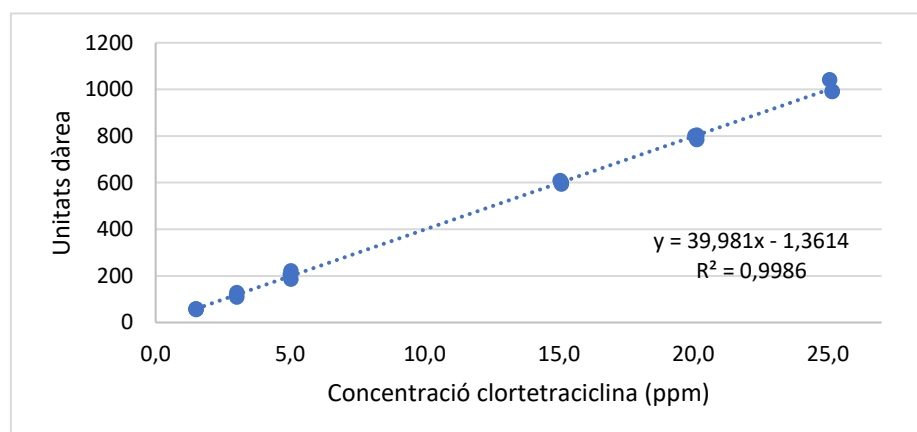
Com que el valor experimental (128,0) és major que el valor tabulat $t_{(n-2, 0.05)} = 2,160$, el pendent és significativament diferent de zero i es pot acceptar el valor trobat.

6.3.2. Linealitat de les impureses

Segons la guia ICH [23] és necessari estudiar un rang de linealitat que va des del límit de quantificació al 120% de la impuresa màxima, on el límit de quantificació ha de ser mínim un 0,3% de la concentració del principi actiu. A la Taula 6 es mostren els resultats obtinguts i al Gràfic 4 es representa la recta de regressió obtinguda, la seva equació i el coeficient de correlació (R^2).

Taula 6. Paràmetres de l'estudi de la linealitat de les impureses.

Concentració teòrica (ppm)	Concentració real (ppm)	Unitats d'àrea Clortetraciclina	Factor resposta	Desviació estàndard	Variància
1,5	1,5	58,4	38,7	0,94	0,89
	1,5	55,8	37,0		
	1,5	57,9	38,5		
3,0	3,0	128,2	42,5	3,14	9,83
	3,0	109,4	36,2		
	3,0	116,4	38,7		
5,0	5,0	221,6	44,0	3,50	12,26
	5,0	186,4	37,0		
	5,0	204,8	40,8		
15,0	15,1	601,2	39,8	0,57	0,32
	15,1	594,2	39,4		
	15,0	609,0	40,5		
20,0	20,1	804,1	39,9	0,57	0,33
	20,1	784,2	39,0		
	20,1	801,5	40,0		
25,0	25,2	991,7	39,4	1,24	1,53
	25,2	990,3	39,4		
	25,1	1041,1	41,5		
CV (%)			4,84	G_{exp}	0,49
CV (%) segons especificació			≤ 5	G_{tab} (α=0.05; K=5; n=3)	0,68



Gràfic 4. Recta de regressió de la linealitat de les impureses.

El coeficient de regressió té un valor de 0,9986, i com per a una linealitat d'impureses s'accepten valors igual o superiors a 0,990 [22], a més, el coeficient de variació experimental té un valor de 4,84%, el qual es troba per sota del valor d'especificació (5%) [22], es pot considerar vàlid. Però si s'observa el factor resposta, hi ha un valor del qual es pot sospitar que sigui un punt discrepant, aquest és el de 44,0 (concentració 5 ppm), de manera que es va fer un test de Dixon [24] per determinar si era un punt discrepant o no i, per tant, si es podia eliminar. Per altra banda, observant el gràfic, a concentració 25

ppm hi ha un punt que se surt de la recta i, per tant, també es va sospitar que fos un punt discrepant, es va comprovar mitjançant un test de Grubbs [25]. $G_{exp} < G_{tab}$

Test de Dixon

Amb aquest test es determina si el valor més gran es pot rebutjar o no.

$$Q_n = \frac{M_n - M_{n-1}}{M_n - M_1} = \frac{44,0 - 42,5}{44,0 - 36,2} = 0,20 \quad (4)$$

On M_2 és el valor contigu al valor més petit; M_1 és el valor més petit; M_n és el valor més gran i M_{n-1} és el valor contigu al valor més gran.

Per al valor més gran com que el valor calculat (0,20) era menor que el tabulat (0,313), es va concloure que el valor més gran no calia rebutjar-lo.

Test de Grubbs

Amb aquest test es determina si el valor sospitós a la concentració de 25,1 ppm es rebutja o no.

$$G_{cal} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} = \frac{|41,5 - 39,6|}{1,9} = 1,00 \quad (5)$$

Com que el valor calculat (1,00) era menor al valor tabulat $G_{tab, \alpha=0,05} = 2,68$, es va concloure que aquest valor no es rebutjaria.

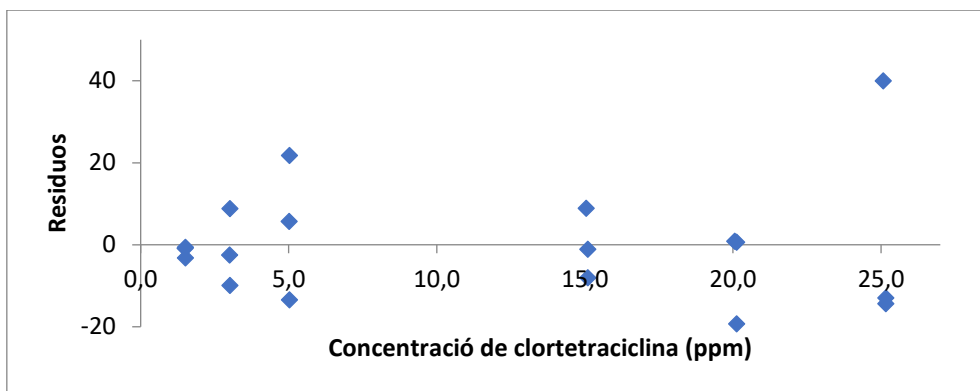
Com anteriorment, s'ha de comprovar estadísticament que la linealitat és correcta. En el cas de l'ANOVA, primer s'ha de comprovar que compleix els següents requisits:

- Homogeneïtat de variàncies

Com s'ha explicat abans, es va utilitzar el test de Cochran fent ús de l'expressió (1). Com que el valor experimental (0,49) és inferior al tabulat ($G_{tab, (\alpha=0,05; K=5; n=3)} = 0,68$), les variàncies es poden considerar iguals. Per tant, l'ANOVA és aplicable.

- Normalitat dels residuals

La normalitat dels residuals es comprova tal i com s'ha explicat anteriorment. La inspecció visual mitjançant la representació gràfica (Gràfic 5) no mostra cap tendència. Per tant, es pot assumir la normalitat dels residuals.



Gràfic 5. Gràfic dels residuals.

A continuació s'avalua la validesa dels anàlisis de regressió com s'ha comentat anteriorment.

Per avaluar si la recta passa per l'origen de coordenades determinant si la variable independent és significativament diferent de zero, cal aplicar un test t de Student utilitzant l'expressió (2). Com que el valor experimental (0,243) és menor que el valor tabulat (2,160), el valor calculat per a la ordenada en l'origen, 39,98, no es pot donar com a correcte. S'ha d'assumir que la recta passa per l'origen de coordenades.

Per comprovar que existeix un pendent significativament diferent de zero es fa una prova t de Student utilitzant l'expressió (3). Com que el valor experimental (105,165) és major que el valor tabulat (2,160), el pendent és significativament diferent de zero.

6.4. PRECISIÓ

La precisió mesura el grau de concordança entre diversos resultats, és a dir, es mesura múltiples vegades una mostra en les mateixes condicions i si els resultats obtinguts són semblants entre ells, la mesura serà precisa, en canvi si no són semblants entre ells, la mesura no serà precisa [26]. En aquest estudi es vol conèixer la variabilitat del mètode, la qual és deguda a errors aleatoris inherents.

Tal i com s'observa a la Figura 5, exactitud i precisió són dos termes diferents. Un mètode pot ser precís però inexacte i a la inversa. Un mètode precís significa que els resultats entre ells són molt pròxims, però no assegura que els resultats siguin pròxims al valor vertader. En canvi, que un mètode sigui exacte significa que aquests resultats s'assemblen al valor acceptat com a vertader, és a dir, el valor de referència. El que s'espera és que el mètode sigui tan precís com exacte.

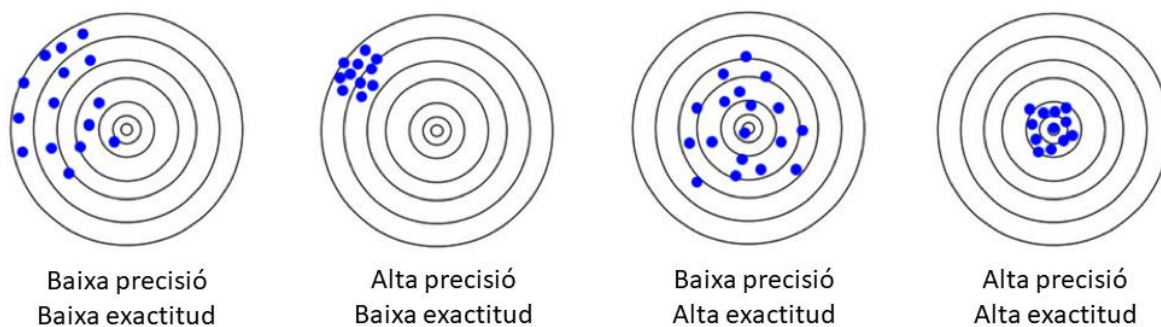


Figura 5. Precisió i exactitud [27].

Per avaluar la precisió del mètode, es poden estudiar diversos factors: la repetibilitat del mètode, la repetibilitat de l'instrument, la precisió intermèdia i la reproductibilitat. En aquest cas, es van estudiar tots els factors a excepció de la reproductibilitat.

Per tal d'avaluar la precisió es calcula el coeficient de variació (CV) d'una sèrie de mesures segons l'equació (6), on s és la desviació estàndard de les diferents mesures i \bar{x} és la mitjana aritmètica d'aquestes mesures:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (6)$$

6.4.1. Repetibilitat del sistema instrumental

La repetibilitat del sistema instrumental té com a objectiu estudiar la variabilitat deguda únicament a l'instrument.

Aquest paràmetre es determina analitzant de forma consecutiva, com a mínim 6 vegades una mateixa mostra a concentració nominal. L'estimació de la repetibilitat del sistema instrumental es realitza amb el càlcul del coeficient de variació de les respostes obtingudes. Per a medicaments i matèries primeres s'acostumen a acceptar valors inferiors al 1-2%, mentre que per a anàlisis d'impureses els valors acceptats són al voltant del 5% [22].

6.4.1.1. Repetibilitat del sistema instrumental per al principi actiu

Per a la repetibilitat del sistema instrumental s'ha analitzat una mateixa mostra 6 vegades a una concentració nominal de 1000 ppm. Els resultats obtinguts es troben a la Taula 7.

Taula 7. Resultats de la repetibilitat del sistema instrumental per al principi actiu.

Concentració real (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea totals	Factor resposta
1003,0	981,5	41488,1	41,4
1003,0	973,0	41134,3	41,0
1003,0	963,7	40745,6	40,6
1003,0	956,9	40465,4	40,3
1003,0	949,2	40143,9	40,0
1003,0	939,7	39749,6	39,6
CV (%)			1,57
CV (%) especificació			≤ 1,37

Com que s'ha treballat amb una sola concentració (n=1) i amb un interval de confiança del 0,05%, el CV (%) màxim acceptat és 1,37%. El resultat experimental està fora d'especificació (1,37%) [22]. Això pot ser degut a què la mostra és inestable en el temps, per tant, no permet avaluar correctament la influència de l'error sistemàtic per part del sistema instrumental. Així doncs caldria fer repetir l'anàlisi de la repetibilitat del sistema instrumental i comparar-lo amb l'anàlisi realitzat de l'estabilitat de la mostra i així poder concloure si el sistema instrumental afecta o la disminució del factor resposta és deguda a la inestabilitat de la mostra.

6.4.1.2. Repetibilitat del sistema instrumental per les impureses

Per la repetibilitat del sistema instrumental s'ha analitzat una mateixa mostra 6 vegades a una concentració nominal de 20 ppm. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 8.

Taula 8. Resultats de la repetibilitat del sistema instrumental per a les impureses.

Concentració real (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea Clortetraciclina	Factor resposta
20,1	20,0	796,6	39,6
20,1	20,0	798,0	39,6
20,1	19,9	793,6	39,4
20,1	19,8	789,8	39,2
20,1	19,8	789,0	39,2
20,1	19,8	791,1	39,3
CV (%)			0,46
CV (%) especificació			≤ 2,74

El coeficient de variació obtingut té un valor del 0,46%, està per sota del valor d'especificació (2,74%) [22], per tant, el resultat és vàlid. Es pot concloure que els paràmetres associats al sistema instrumental no afecten en la variabilitat dels resultats. Per altra banda, s'observa com el factor resposta no disminueix, és pràcticament constant. Això es justifica amb el fet de què la mostra que s'ha avaluat està a una concentració menor a l'avaluada a l'apartat anterior.

6.4.2. Repetibilitat del mètode

La repetibilitat del mètode consisteix en analitzar una sèrie de mostres independents a concentració coneguda en les mateixes condicions operatives (un mateix analista, mateixos aparells i reactius, etc.). L'estimació d'aquest paràmetre es realitza amb el càlcul del coeficient de variació de les recuperacions⁶ obtingudes [22].

6.4.2.1. Repetibilitat del mètode per al principi actiu

Per a la repetibilitat del mètode s'analitzen 6 mostres preparades independentment a una concentració nominal de 1000 ppm. Els resultats obtinguts es troben a la Taula 9.

Taula 9. Resultats de la repetibilitat del mètode per al principi actiu.

Concentració real (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea totals	Recuperació (%)
999,4	980,2	41433,1	98,1
1003,0	983,1	41553,1	98,0
1003,0	989,4	41815,6	98,6
1010,1	986,4	41688,4	97,6
1003,0	976,1	41264,5	97,3
1010,1	979,3	41395,1	96,9
		CV (%)	0,62
		CV (%) especificació	≤ 1,94

Com que s'ha treballat a una sola concentració (n=1) i amb un interval de confiança del 0,05%, el coeficient de variació màxim acceptat és 1,94% [22]. El valor experimental obtingut del coeficient de variació va ser de 0,62%, i es troba per sota del valor d'especificació i per tant, el resultat és acceptat.

6.4.2.2. Repetibilitat del mètode per a les impureses

Per a l'avaluació d'aquest paràmetre s'han analitzat 6 mostres preparades independentment a una concentració nominal de 20 ppm. Els resultats obtinguts es troben a la Taula 10.

⁶ Recuperació: comparació de la concentració obtinguda respecte la teòrica.

Taula 10. Resultats de la repetibilitat del mètode per a les impureses.

Concentració real (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea Clortetraciclina	Recuperació (%)
20,2	20,1	792,4	100,0
20,3	20,1	797,3	100,6
20,0	20,1	791,0	99,2
20,2	20,0	790,6	100,8
20,0	20,1	786,6	99,7
20,1	20,1	804,3	100,1
CV (%)			1,60
CV (%) especificació			≤ 3,88

El coeficient de variació obtingut té un valor del 1,6%. Com que està per sota del valor d'especificació (3,88%) [22], el resultat es considera acceptat.

6.4.3. Precisió intermèdia

La precisió intermèdia té com a objectiu determinar la variabilitat del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis en un mateix laboratori però en condicions operatives diferents (diferent instrument, diferent analista, diferent dia, etc.). No és necessari estudiar tots aquests factors, si no que es recomana fer un estudi de manera aleatòria, en el qual s'analitzin les mostres com a mínim per triplicat en els diversos factors a estudiar. L'estimació de la precisió intermèdia es realitza amb el càlcul del coeficient de variació global de les recuperacions obtingudes, és a dir, considerant cada resultat independentment. Generalment s'accepten valors per al coeficient de variació que siguin el doble del coeficient de variació obtingut en la repetibilitat del mètode [22].

Per a l'anàlisi d'aquest paràmetre, s'ha fet una anàlisi de les mostres a concentració nominal per triplicat i realitzat per dos analistes durant 3 dies consecutius.

6.4.4. Precisió intermèdia del principi actiu

En el cas del principi actiu les mostres es van preparar a una concentració nominal de 1000 ppm. El resultat de la precisió global s'ha calculat amb cadascuna de les recuperacions obtingudes els tres dies (Taula 11).

Taula 11. Resultats de la precisió intermèdia.

Analista	Recuperacions (%)	Recuperacions (%)	Recuperacions (%)
	dia 1	dia 2	dia 3
1	101,4	100,6	101,4
	102,5	100,7	100,1
	100,5	100,3	100,8
2	100,8	101,7	100,9
	101,0	100,3	100,7
	100,1	101,6	100,5
Coefficient de variació (%)		0,82	0,62
Coefficient de variació global (%)		0,62	

El coeficient de variació global té un valor de 0,62%.

Els resultats obtinguts els diferents dies tenen un valor del coeficient de variació inferior al de la especificació (1,2%) [22], i el resultat global també es troba per sota del valor d'especificació. D'aquesta manera es pot concloure que el mètode no és variable si es realitza per diferents analistes i en diferents dies.

6.4.5. Precisió intermèdia de les impureses

En el cas de les impureses, les mostres es van preparar a una concentració nominal de 20 ppm. El resultat de la precisió global es calcula amb cadascuna de les recuperacions obtingudes els tres dies. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 12.

Taula 12. Resultats de la precisió global.

Analista	Recuperacions (%)	Recuperacions (%)	Recuperacions (%)
	dia 1	dia 2	dia 3
1	100,1	98,1	99,0
	99,5	97,6	99,6
	96,5	98,0	99,1
2	102,1	99,6	101,3
	101,0	98,8	101,0
	99,1	98,0	99,5
Coefficient de variació (%)		1,9	0,73
Coefficient de variació global (%)		1,55	

Els resultats obtinguts dels diferents dies tenen un valor del coeficient de variació inferior al d'especificació (3,2%) [22], per tant, els resultats es poden considerar vàlids. A més, els resultat dels tres dies, també es troba per sota del valor d'especificació. Es pot concloure que el mètode no és variable si es realitza entre diferents analistes i en diferents dies.

6.5. EXACTITUD

L'exactitud d'un mètode analític expressa la proximitat entre el valor de referència i el valor experimental. Aquesta s'expressa com el percentatge de recuperació en la valoració d'una quantitat coneguda d'anàlit afegida sobre la mostra [22].

6.5.1. Exactitud del principi actiu

Per tal d'avaluar l'exactitud s'han analitzat 7 mostres a una concentració nominal de 1000 ppm de l'estàndard de clortetraciclina HCl tot afegint una quantitat coneguda de placebo (650 µl). El placebo conté les impureses a una concentració coneguda, així s'imita el medicament final. Les mostres s'injecten immediatament després de ser preparades.

El resultat d'aquesta s'ha calculat com el percentatge d'anàlit recuperat. A la Taula 13 es presenten els resultats obtinguts en l'exactitud del principi actiu.

Taula 13. Resultats de l'exactitud del mètode per a la determinació del principi actiu.

Concentració real (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea totals	Recuperació (%)
999,4	997,3	42143,0	99,8
1003,0	995,5	42069,9	99,3
1003,0	1012,9	42791,4	101,0
1006,5	1022,1	43175,2	101,5
995,8	1012,5	42775,9	101,7
1003,0	1021,6	43153,5	101,9
1003,0	1012,5	42773,5	100,9
		Mitja	100,9
		CV (%)	0,98

Per comprovar si existeix una diferència significativa entre la recuperació mitja i 100%, cal aplicar un test t fent ús de l'expressió (7) on x és la mitja de les recuperacions, n és el número mostres analitzades i CV el coeficient de variació.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100-x|\cdot\sqrt{n}}{\text{CV}} = \frac{|100-100,9|\cdot\sqrt{7}}{0,98} = 2,30 \quad (7)$$

Com que el valor calculat (2,30) és menor que el valor tabulat $t_{\text{tab}} (\alpha=0,05; \text{gl} = 7-1 = 6) = 2,45$, no existeix diferència significativa entre la recuperació mitja i 100%, per tant, l'exactitud és correcta.

6.5.2. Exactitud de les impureses

Per tal d'avaluar l'exactitud s'han analitzat 7 mostres a una concentració nominal de clortetraciclina de 20 ppm. A la Taula 14 es recullen els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'exactitud per a les impureses del principi actiu.

Taula 14. Resultats de l'exactitud del mètode per a la determinació de les impureses.

Concentració teòrica (ppm)	Concentració experimental (ppm)	Unitats d'àrea Clortetraciclina	Recuperació (%)
20,3	20,2	806,0	99,6
20,1	20,2	805,8	100,6
20,3	20,4	812,8	100,4
20,2	20,3	809,0	100,3
20,3	20,4	815,3	100,7
20,1	19,9	795,2	99,3
20,1	19,7	785,7	98,1
Mitja			99,9
CV (%)			0,94

Per comprovar si existeix una diferència significativa entre la recuperació mitja i 100%, cal aplicar un test t fent ús de l'expressió (7) com s'ha especificat en l'apartat 6.5.1.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - x| \cdot \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 99,9| \cdot \sqrt{7}}{0,94} = 0,29$$

Com que el valor calculat (0,29) és menor que el valor tabulat $t_{\text{tab}} (\alpha = 0,05; \text{gl} = 6) = 2,45$, no existeix diferència significativa entre la recuperació mitja i 100%, per tant, l'exactitud és correcta.

6.6. LÍMITS DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ

El límit de detecció (LOD) és la mínima quantitat d'anàlit en la mostra que es pot detectar i, habitualment s'expressa com a 3 vegades la relació senyal/soroll d'un blanc. El límit de quantificació (LOQ) és la mínima quantitat d'anàlit present a la mostra que es pot quantificar, i s'expressa com a 10 vegades la relació senyal/soroll. Per determinar-los cal analitzar el placebo (blanc) i mirar l'alçada del soroll al temps de retenció de la clortetraciclina. A partir d'aquest valor es realitzen càlculs teòrics per estimar el límit de quantificació i de detecció.

A partir del cromatograma del placebo es va mirar quina alçada de soroll hi havia al temps de retenció de la clortetraciclina i es va obtenir un valor de 0.1693 mAu, a partir de la qual es van realitzar els següents càlculs:

Càlcul teòric del LOD: $0,1693 \cdot 3 = 0,5079$ mAu

Càlcul teòric del LOQ: $0,1693 \cdot 10 = 1,693$ mAu

Aquests valors obtinguts de forma teòrica s'han de comprovar de forma experimental, per aquest motiu s'analitzen mostres a diferents concentracions: 0,25 ppm, 0,50 ppm i 1 ppm de clortetraciclina.

Una vegada obtinguts els cromatogrames es va comparar el soroll de fons al temps de retenció de la clortetraciclina entre el cromatograma del placebo i el de les mostres. Amb el cromatograma del placebo es va mirar l'alçada del soroll que hi havia al temps de retenció de la clortetraciclina i es va comparar amb l'alçada de l'àrea del pic obtinguda en els diferents cromatogrames de les mostres a diferents concentracions de l'estàndard de clortetraciclina.

Experimentalment en el cromatograma de la mostra de 1 ppm l'alçada del pic de la clortetraciclina tenia un valor de 1,34945 mAu, per tant, es va realitzar el recàlcul experimental:

Càlcul experimental del LOD:

$$0,5079 \text{ mAu} \cdot \frac{1 \text{ ppm}}{1,34945 \text{ mAu}} = 0,37 \text{ ppm}$$

Càlcul experimental del LOQ:

$$1,693 \text{ mAu} \cdot \frac{1 \text{ ppm}}{1,34945 \text{ mAu}} = 1,25 \text{ ppm}$$

Tot i obtenir un LOD de 0,37 ppm, experimentalment es va veure que a concentracions inferiors a 0,5 ppm no s'observava el pic de la clortetraciclina, per tant, vam fixar el límit de detecció a un nivell de concentració més alt. Experimentalment vam obtenir que el límit de detecció es situava a 0,75 ppm i complia amb la relació senyal/soroll estipulada.

Tot i obtenir un LOQ de 1,25 ppm, experimentalment es va veure que aquesta concentració no complia amb la relació senyal/soroll, per tant, vam fixar el límit de quantificació a un nivell de concentració més alt. Experimentalment vam obtenir que el límit de quantificació es situava a 1,5 ppm i que complia amb la relació senyal/soroll estipulada.

7. CONCLUSIONS

- En aquest treball s'ha validat un mètode analític per la determinació del principi actiu clortetraciclina i les seves impureses en el medicament Clortetraciclina 20 mg/mL en suspensió per a polvorització cutània. Per la validació s'ha seguit la guia AEFI i la monografia descrita a la Farmacopea Europea utilitzant la tècnica LC.
- La tècnica de cromatografia de líquids ha demostrat ser una tècnica adequada per a l'anàlisi del medicament complint els requeriments estipulats per l'AEFI.

- Per a la validació del mètode s'han avaluat diferents paràmetres tals com la selectivitat, la linealitat, la repetibilitat del mètode, la repetibilitat del sistema instrumental, la precisió intermèdia, l'exactitud, la robustesa i els límits de detecció i quantificació.
- De l'estudi de l'estabilitat de la mostra s'ha arribat a la conclusió de què la preparació d'aquesta s'ha de fer immediatament abans de ser injectada al LC, ja que la clortetraciclina es degrada.
- Pel que fa a la linealitat de la clortetraciclina, s'ha determinat que el rang de concentracions establert proporciona una recta de regressió lineal, per tant, l'àrea del pic de la clortetraciclina més el de la tetraciclina és directament proporcional a la seva concentració.
- Per a la linealitat de les impureses, el rang establert proporciona una recta de regressió lineal i, de tal manera que, l'àrea del pic de la clortetraciclina és directament proporcional a la seva concentració.
- S'ha demostrat que el mètode és precís mitjançant l'estudi de repetibilitats:
 - L'estudi de la repetibilitat del sistema instrumental de la clortetraciclina no mostra resultats semblants entre 6 mesures. Com que aquest anàlisi s'ha realitzat a concentracions elevades, i la mostra és inestable a aquestes, la variabilitat en els resultats pot ser deguda a la inestabilitat de la mostra. Per tant, és probable que la degradació de clortetraciclina expliqui el resultat i el sistema instrumental no presenti cap problema. Però això no és conclusiu amb els resultats obtinguts fins ara i, s'hauria de comprovar amb un anàlisi estadístic de l'estabilitat.
 - Per a la repetibilitat del sistema instrumental de les impureses s'ha determinat que aquest no influeix en l'obtenció dels resultats, per tant, és adequat per a l'anàlisi.
 - Per a la repetibilitat del mètode, tant en l'estudi de la clortetraciclina com de les impureses, s'ha demostrat que no hi ha variabilitat en els resultats per a mostres independents. Així doncs es conclou que el mètode compleix amb els requeriments que estipula la guia AEFI.
 - Pel que fa a la precisió intermèdia de l'estudi de la clortetraciclina i les impureses s'ha determinat que no hi ha variabilitat en els resultats obtinguts quan l'anàlisi es duu a terme per diferents analistes en diferents dies, per tant, es considera que el mètode pot ser realitzat per qualsevol analista i no hi haurà diferències en els resultats.
- L'exactitud s'ha considerat correcta, ja que la mitjana de les recuperacions dona un valor de 100,9% era semblant a 100%.
- El límit de detecció del mètode és 0,75 ppm i el límit de quantificació és de 1,5 ppm. Aquests valors són adequats ja que permeten detectar i quantificar el principi actiu clortetraciclina i les seves impureses en el medicament.

CONCLUSIONS

- In this work, an analytical method to determine the active ingredient and impurities in the drug Chlortetracycline 20 mg / mL in suspension for skin spraying has been validated according to the AEFI and the monograph described in the European Pharmacopoeia procedures using LC.
- Liquid chromatography technique has proven to be an appropriate technique for the analysis of the drug in compliance with the requirements stipulated by the AEFI.
- For the validation of the method, different parameters such as selectivity, linearity, repeatability of the method, repeatability of the instrumental system, intermediate precision, accuracy, robustness and the limits of detection and quantification have been assessed.
- In the study of the stability of the sample, it was concluded that the preparation of the sample should be done immediately before being injected, as chlortetracycline is degraded to other impurities.
- Regarding the linearity of chlortetracycline, it has been determined that the established range of concentrations provides a linear regression line and, therefore, the peak area of chlortetracycline plus tetracycline is directly proportional to its concentration.
- For the linearity of impurities, the established range provides a linear regression line and, therefore, the chlortetracycline peak area is directly proportional to its concentration.
- The method has been shown to be accurate by studying repeatability:
 - For the repeatability for the instrumental system of chlortetracycline does not show similar results between 6 measures. However, these experiments were performed at high concentrations of chlortetracycline and, as the sample is unstable at these concentrations, the variability in the results may be due to the instability of the sample. Therefore, it is likely that chlortetracycline degradation explains the result and the instrumental system does not present any problems. But this is not conclusive with the results obtained so far and should be verified with a statistical analysis of stability.
 - For the repeatability of the instrumental system of impurities we concluded that the instrument does not influence the obtaining of the results, therefore it is suitable for analysis.
 - In regard of the repeatability of the method in both the study of chlortetracycline and in impurities, it has been shown that there is no variability in the results for independent samples. It is therefore concluded that the method complies with the requirements stipulated in the AEFI guide.

- The study of the intermediate accuracy of the chlortetracycline and impurities showed that there is no variability in the results obtained by different analysts in different days for similar samples, therefore, the method can be performed by any analyst and there will be no differences in the results.
- The accuracy was considered correct, as the average of the recoveries (100,9%) was similar to 100%.
- The detection limit of the method was 0,75 ppm and the quantification limit was 1,5 ppm. These values are appropriate because they allow the detection and quantification of the active ingredient chlortetracycline and its impurities in the drug.

8. FUTURS ESTUDIS

Degut a la durada limitada de l'estància per realitzar el TFG, no s'han pogut estudiar tots els paràmetres. Per a la clortetraciclina i per a les impureses hem estudiat tots els paràmetres necessaris a excepció de la robustesa. I encara no hem estudiat cap dels paràmetres per la tetraciclina.

En l'avaluació de la robustesa caldrà analitzar una mostra a concentració nominal tot fent petits canvis en el mètode proposat per veure com afecten. Alguns d'aquests canvis són el tipus de columna, la temperatura del forn, el volum d'injecció entre d'altres.

Per tal de comprovar que el sistema instrumental no influeix en la variabilitat dels resultats, s'haurà de fer un anàlisi estadístic de l'estabilitat per comprovar que tota la reducció en la resposta és deguda a la degradació de la clortetraciclina.

Una vegada avaluats tots els paràmetres es determinarà si aquest mètode és vàlid per a l'anàlisi de la Clortetraciclina 20 mg/mL en suspensió per a polvorització cutània.

AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair especialment a algunes persones la seva ajuda i recolzament.

En primer lloc a la Maria Torelló i la Sílvia Bertolí, que em van donar l'oportunitat de poder fer aquest projecte i formar part del seu equip durant aquesta estada a CENAVISA. A la Maribel Escribano que m'ha supervisat en la realització d'aquest i ha estat una gran ajuda. A tots els companys que he tingut al laboratori, que sempre que ho he necessitat han estat allà per ajudar-me. Al Nicolás Pazos que com a tutor m'ha donat el seu assessorament i m'ha conduït en la realització del treball. A la Paula Haro i al Gerard Castro, que han sigut un pilar fonamental en la redacció de la memòria.

I per últim a la meua família i amics, que m'han recolzat en tot moment.

9. BIBLIOGRAFIA

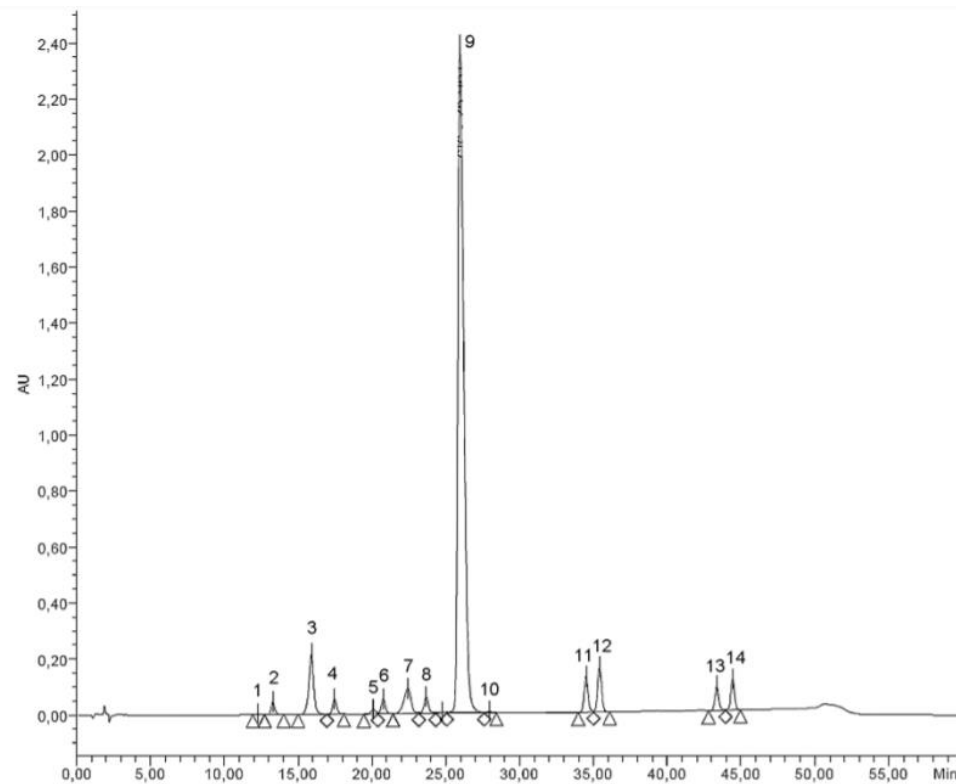
- (1) Ritchie, H. Qué Países Del Mundo Consumen Más Carne. *BBC News*. Oxford February 4, 2019.
- (2) OECD/FAO. Carne. In *OCDE-FAO Perspectivas agrícolas*; OECD: París, 2017; pp 121–123. <https://doi.org/10.1787/agr-data-en>.
- (3) de Pedro, J. *Farmacia Profesional Economía y Gestión.*; Haymarket, 1987; Vol. 19.
- (4) *Guía de Uso Responsable de Medicamentos Veterinarios: Bovino*; Agrícola Española, S.A.
- (5) Ortega Martínez, P. *Medicamentos de Uno Animal Responsabilidades Profesionales Para La Salud Pública*; Castellón, 2016.
- (6) *Cómo se Regulan Los Medicamentos y Productos Sanitarios en España*; Madrid, 2014.
- (7) Good manufacturing practice | European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice> (Accés 15 juny 2021).
- (8) Good distribution practice | European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/compliance/good-distribution-practice> (Accés 15 juny 2021).
- (9) *Ficha Técnica (Resumen de Características Del Producto)*; 2014.
- (10) Loftin, K. A.; Adams, C. D.; Meyer, M. T.; Surampalli, R. Effects of Ionic Strength, Temperature, and PH on Degradation of Selected Antibiotics. *J. Environ. Qual.* **2008**, 37 (2), 378–386. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0230>.
- (11) Halling-Sørensen, B.; Sengeløv, G.; Tjørnelund, J. Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, 42 (3), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0017-2>.
- (12) Identificación y cuantificación de impurezas: un aspecto crucial en el Desarrollo

- Farmacéutico <https://www.azierta.com/blog/toxicologia/identificacion-cuantificacion-impurezas-aspecto-crucial-desarrollo-farmaceutico> (Accés 13 juny 2021).
- (13) Sanchez Gonzaga, V. Polaridad de moléculas <https://www.youtube.com/watch?v=Q7l-sd-UcIA> (Accés 10 maig 2021).
- (14) Chlortetracycline Hydrochloride. In *European Pharmacopeia*; Strasbourg, 2016; pp 4390–4392.
- (15) Recasens, R. M. M. Tema 5. Cromatografia de Líquids; Tarragona.
- (16) Suarez Ospina, D.; Morales Hernández, Y. Principios Básicos de La Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento Para La Separación y Análisis de Mezclas. *América Rev. Semilleros Form. Investig.* **2018**, *4*.
- (17) Cromatografía de Líquidos <https://cromatografo.blogspot.com/2018/05/cromatografia-de-liquidos.html> (Accés 13 juny 2021).
- (18) Choudhary, A. Difference between C8 and C18 Columns Used in HPLC System : Pharmaceutical Guidelines <https://www.pharmaguideline.com/2018/05/difference-between-c8-and-c18-columns.html> (Accés 10 juny 2021).
- (19) García De Marina, A.; Dolores, B.; Marco, J. Y.; Yusá, J.; Arte, M. *HPLC INSTRUMENTAL*; 2016.
- (20) Abdulghani, A. J.; Jasim, H. H.; Hassan, A. S. Determination of Tetracycline in Pharmaceutical Preparation by Molecular and Atomic Absorption Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography via Complex Formation with Au(III) and Hg(II) Ions in Solutions. *Int. J. Anal. Chem.* **2013**. <https://doi.org/10.1155/2013/305124>.
- (21) *Familiarización Con Agilent ChemStation*; Alemania, 2009.
- (22) Ortega, L. A.; García, F. J.; Et-al. *Validación de Métodos Analíticos*; AEFI: Barcelona, 2001.
- (23) ICH Official web site : ICH <https://www.ich.org/> (Accés 15 juny 2021).
- (24) Constante de Dixon o contraste "Q"
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CriteriodeDixon_32320.pdf (Accés 13 juny 2021).

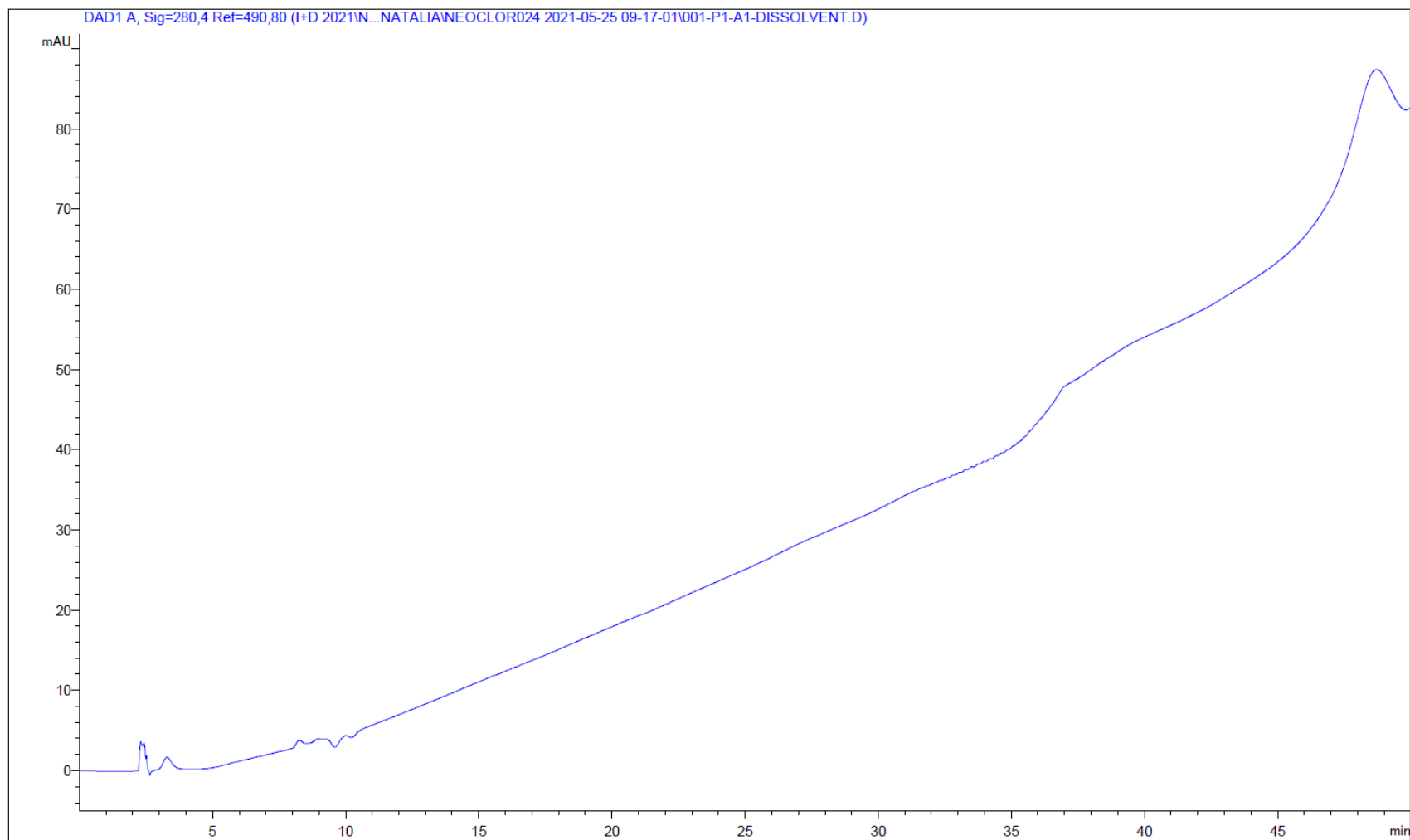
- (25) Riu, J. Tema 1-Estadística Avançada; Tarragona, 2019.
- (26) Campillo Seva, N. Tema 3 Introducción a La Quimiometría; Murcia, 2011.
- (27) Exactitud y precisión
http://formacion.intef.es/pluginfile.php/246707/mod_resource/content/1/exactitud_y_precisin.html (Accés 10 juny 2021).

10.ANNEXOS

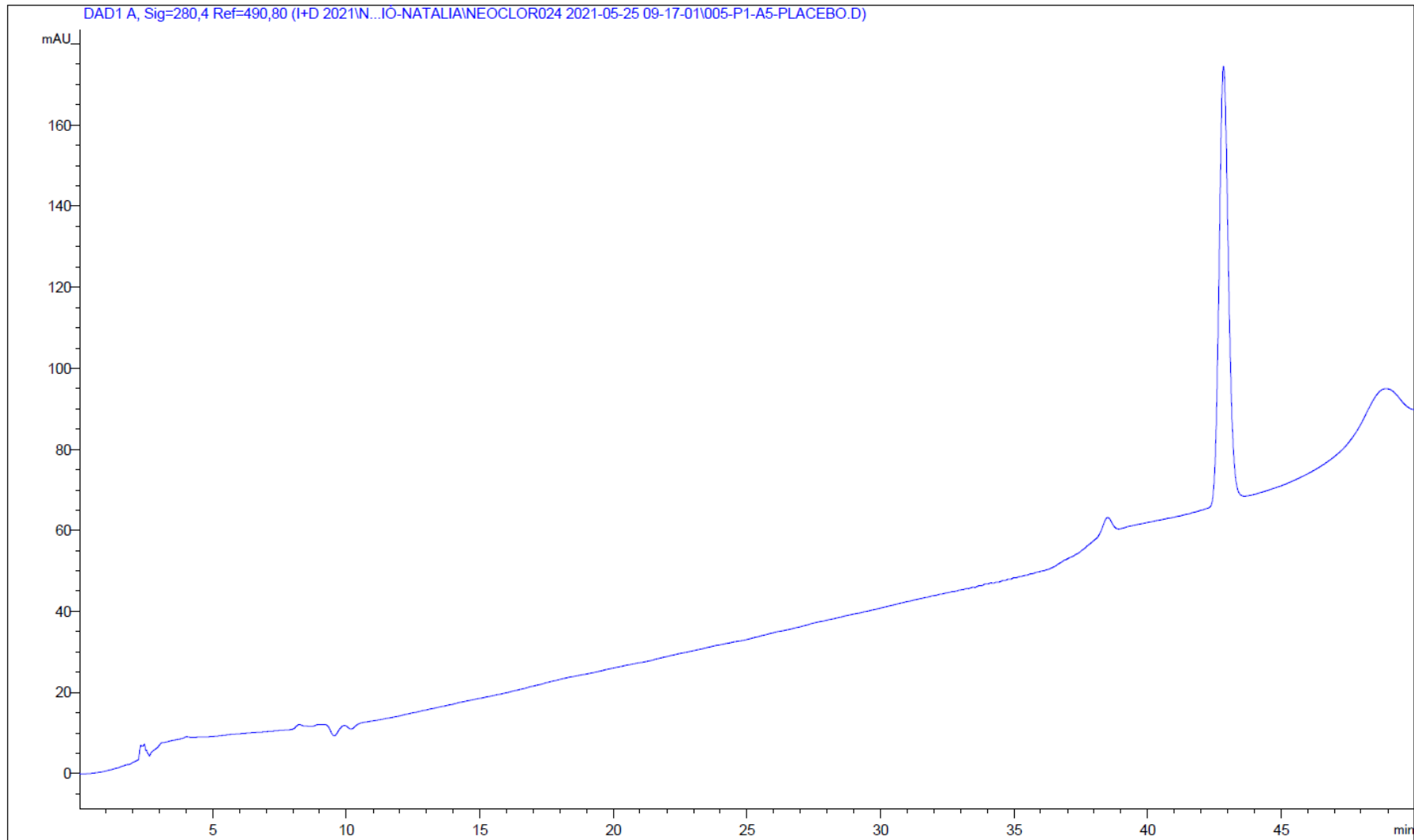
10.1. ANNEX I. CROMATOGRAMA DEL ESTÀNDARD DE CLORTETRACICLINA



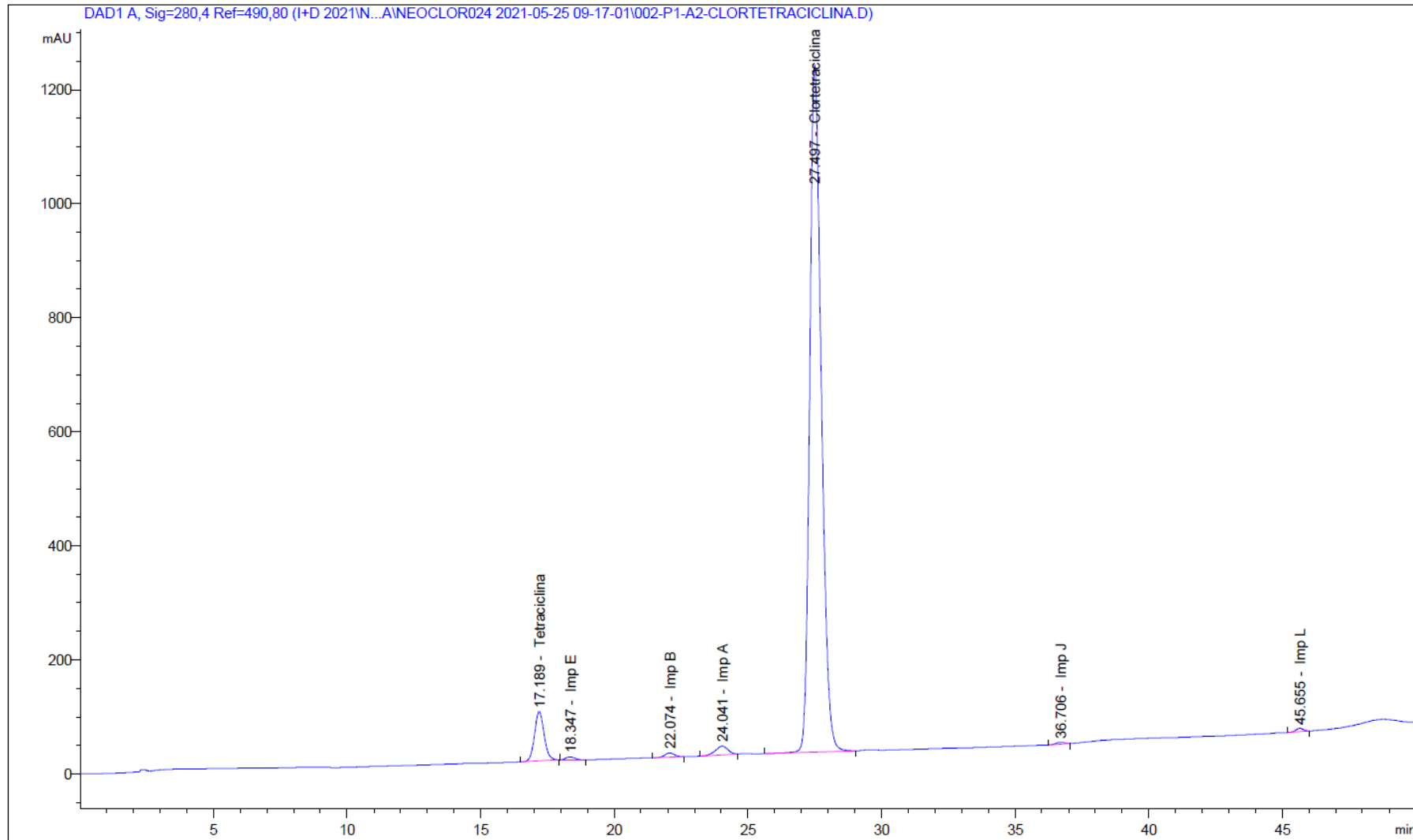
- | | | | | |
|-----------------|---------------|----------------------|----------------|----------------|
| 1. impurity C | 4. impurity E | 7. impurity A | 10. impurity H | 13. impurity K |
| 2. impurity D | 5. impurity F | 8. impurity G | 11. impurity I | 14. impurity L |
| 3. tetracycline | 6. impurity B | 9. chlortetracycline | 12. impurity J | |

10.2. ANNEX II. CROMATOGRAMA DEL DISSOLVENT DE LA PREPARATIVA DE MOSTRES

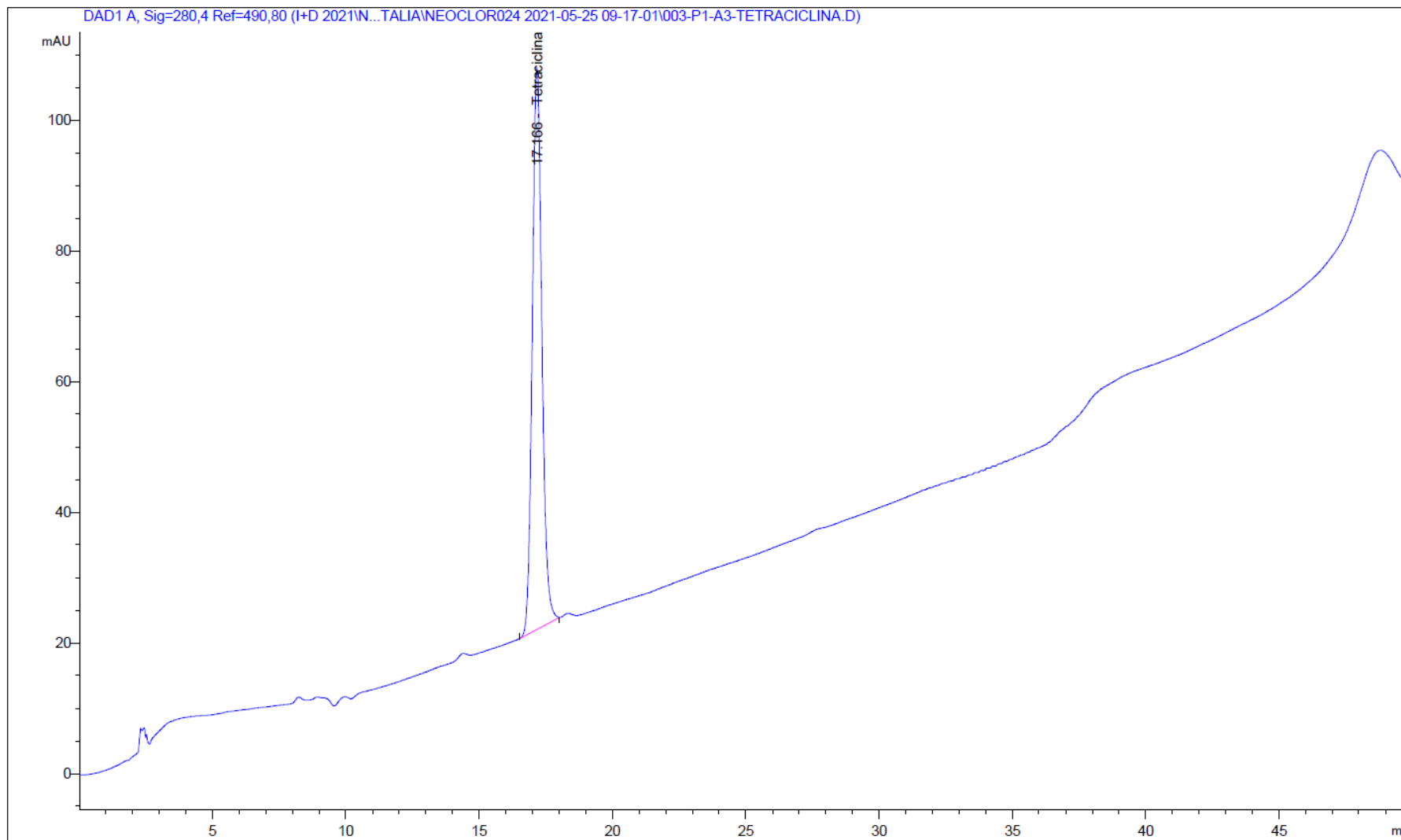
10.3. ANNEX III. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO DE LA PREPARATIVA DE LES MOSTRES



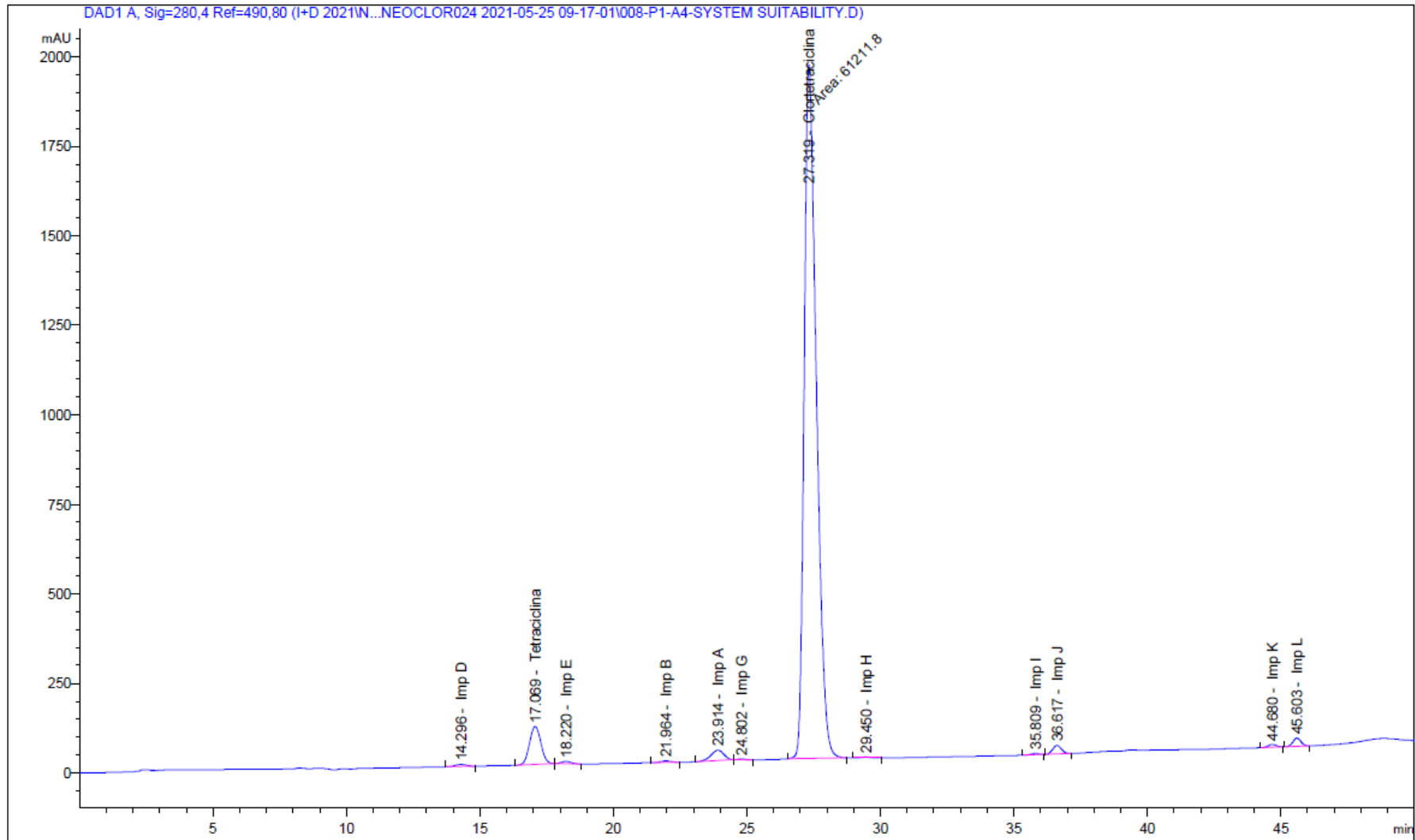
10.4. ANNEX VI. CROMATOGRAMA DE LA CLORTETRACICLINA DE LA PREPARATIVA DE LES MOSTRES



10.5. ANNEX V. CROMATOGRAMA DE LA TETRACICLINA DE LA PREPARATIVA DE LES MOSTRES



10.6. ANNEX VI. CROMATOGRAMA DEL SYSTEM SUITABILITY DE LA PREPARATIVA DE LES MOSTRES



10.7. ANNEX VII. CROMATOGRAMA DEL PRODUCTE FARMACÈUTIC DE LA PREPARATIVA DE LES MOSTRES