

Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), fase inversa

Reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) determination of a monobrominated impurity in Dermofural. Method Validation

MSc. Yaidel A. Quiñones-García, MSc. Amalia M. Calvo-Alonso, Lic. Isabel M. Caraballoso-Noa, Lic. Heidy L. Alonso-Rodríguez

yaidelq@uclv.edu.cu, amaliac@uclv.edu.cu, isabelm@uclv.edu.cu, halonso@uclv.edu.cu

Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba

Recibido: 5 septiembre de 2014

Aprobado: 3 diciembre de 2014

Resumen

El Dermofural es un ungüento tópico cuyo ingrediente farmacéutico activo es la furvina (2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano), el cual exhibe acción antibacteriana y antifúngica, el mismo se encuentra acompañado de una impureza conocida como monobromado (2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano), cuyo contenido se incluye dentro de las especificaciones de calidad del medicamento. Este trabajo pretende validar una técnica por cromatografía líquida de alta eficacia, fase inversa, para cuantificar esta impureza en el Dermofural. El estudio de validación se desarrolló según lo establecido por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Se evaluaron los parámetros: adecuación del sistema, especificidad, linealidad, precisión, veracidad, intervalo, límites de detección y cuantificación. El método analítico estudiado resultó ser específico, lineal, preciso y exacto, con límites de detección y cuantificación de 0,1 mg/L y 0,09 mg/L, respectivamente, por tanto se puede utilizar en el control de la calidad del Dermofural y para sus estudios de estabilidad.

Palabras clave: dermofural, furvina, validación.

Abstract

Dermofural is a topical ointment based on the active pharmaceutical ingredient furvina (2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl) furan), which exhibit antibacterial and antifungal action. This product contains a known monobrominated impurity (2-bromo-5-(2-nitrovinyl) furan) which has to be determined among the quality specifications for the end product. This paper describes the validation of a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography method to quantify this impurity in Dermofural samples. The validation study was carried out as established by the "Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos". System suitability, specificity, linearity, precision, accuracy, range and detection and quantification limits were evaluated. The analytical method demonstrated to be specific, linear, accurate and

precise, with limits of detection and quantification of 0,1 mg/L and 0,09 mg/L, respectively, therefore it can be used in quality control and stability studies of Dermofural.

Keywords: dermofural, furvina, validation.

Introducción

El Dermofural es un ungüento tópico incluido en el cuadro básico de medicamentos de Cuba desde el año 2007; su ingrediente farmacéutico activo es la furvina, también conocido como G-1 (2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano), el cual se produce en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas y exhibe acción antibacteriana y antifúngica. Debido al proceso de obtención por síntesis química, la Furvina se encuentra acompañada de una impureza conocida como monobromado, MBr (2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano), es decir, es una impureza de origen sintético y por tanto, puede presentarse también en el producto terminado Dermofural, por lo que se incluye dentro de las especificaciones de calidad del medicamento el contenido de la misma, con un límite menor o igual al 1 %.

El objetivo de este trabajo es validar una técnica por cromatografía líquida de alta eficacia, CLAE (HPLC por sus siglas en inglés), fase inversa, para determinar el contenido de esta impureza en el Dermofural.

El estudio de validación se desarrolló siguiendo las pautas establecidas por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) en su Regulación No. 41 del año 2007 [1]; se estudiaron los siguientes parámetros: adecuación del sistema, especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad instrumental, repetibilidad del método y precisión intermedia a tres niveles de concentración), exactitud o veracidad a tres niveles de concentración, intervalo, límite de detección y límite de cuantificación a través de la relación señal ruido [2].

Materiales y métodos

Equipos, materiales y reactivos

El equipamiento utilizado para desarrollar la técnica, así como la cristalería empleada estaban debidamente calibrados y/o validados, por la Oficina Territorial de Normalización (OTN) e instituciones correspondientes. Los reactivos utilizados también poseían la calidad requerida.

Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta eficacia con detector de longitud de onda variable, HPLC Agilent 1100 series
- Balanza analítica DENVER Instrumens
- Baño ultrasónico SONOREX RK52

Materiales

- Matraces de 10 mL y de 50 mL
- Micropipeta de 20 µL-200 µL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Microjeringuilla de 100 µL
- Filtros Ministart RC 4 de 0,45 µm
- Embudo de cristal pequeño
- Beacker de 75 mL

Reactivos

- Acetonitrilo HPLC, gradient grade, Panreac
- Excipiente (petrolato líquido pesado: petrolato sólido blanco, 1:4), Quimefa
- Monobromado material de referencia (lote 12 MBr-2, 99,64 % de pureza)
- G-1 material de referencia (lote 12-3-2, 99,87 % de pureza)
- Dermofural, LOTE 13001

Método empleado

Este método para la cuantificación de monobromado en lotes de Dermofural se basa en la separación por HPLC del G-1 de su impureza, utilizando para ello una columna RP-18, mediante detector UV-VIS de longitud de onda variable. Se empleó el método del patrón externo. Para los cálculos y el análisis estadísticos se utilizaron los programas

Statgraphics Plus for Windows 4.1, Professional Version, 1999 y Microsoft® Office Excel 2010.

Parámetros operacionales del HPLC

- Fase móvil: acetonitrilo HPLC
- Flujo de la fase móvil: 0,7 mL/min
- Longitud de onda: 360 nm
- Columna Daisogel C-18 de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro

Preparación de la disolución de muestra de referencia

Se pesó con exactitud alrededor de 0,01 g de MBr, material de referencia, en un matraz de 50 mL con ayuda de un embudo de cristal; se disolvió el sólido y se enrasó en acetonitrilo (200 mg/L). De esta disolución se tomó una alícuota de 75 µL y se enrasó con acetonitrilo en un matraz de 10 mL (1,5 mg/L).

Preparación de la disolución de ensayo

Se pesó con exactitud en un beaker, alrededor de 1 g de Dermofural, se añadieron 4 mL de acetonitrilo y se colocó en baño ultrasónico por espacio de 15 min, luego se trasvasó el sobrenadante a un matraz de 10 mL; se añadieron nuevamente 4 mL de acetonitrilo y se repitió el procedimiento. Finalmente se enrasó con acetonitrilo (150 mg/L de G-1 y 1,5 mg/L de MBr, teóricamente, de acuerdo con el límite de la especificación, menor o igual a 1,00 %).

Cálculos

Se empleó la fórmula dada por la ecuación (1) para calcular del porcentaje del MBr:

$$\% \text{ MBr} = \frac{A_m \cdot M_p}{A_p \cdot M_m} \cdot \% P_p \quad (1)$$

donde

% MBr: porcentaje del contenido de monobromado en el Dermofural

A_m : área de la señal de la muestra

A_p : área de la señal del material de referencia de MBr

M_m : masa de la muestra

Mp: masa del material de referencia de MBr

% Pp: porcentaje de pureza del material de referencia de MBr

Parámetros de validación [3-6]

a) Pruebas de adecuación del sistema:

- Repetibilidad de los tiempos de retención (< 1 %): Se preparó una disolución de MBr de 1,5 mg/L, y se hicieron 6 inyecciones. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).
- Eficacia de la columna o número de platos teóricos (> 5 000): Se preparó una disolución de MBr de 1,5 mg/L; se hicieron 6 inyecciones. Se calculó el número de platos teóricos a través de la fórmula expresada mediante la ecuación (2):

$$N = 5,54 \times \left[\frac{T_R}{W_{1/2}} \right]^2 \quad (2)$$

donde

N: número de platos teóricos

T_R: tiempo de retención del pico en min (dato brindado por el software utilizado)

W_{1/2}: anchura del pico a media altura en min (dato brindado por el software utilizado)

- Resolución entre el pico de G-1 y el de MBr (≥ 1,5): Se preparó una disolución de MBr y G-1 de 1,5 mg/L de cada analito; se hicieron 5 inyecciones. Se calculó la resolución entre los picos correspondientes a ambos analitos a través de la fórmula expresada en la ecuación (3):

$$R_S = \frac{2[(T_R)_B - (T_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (3)$$

donde

R_S: resolución de la columna cromatográfica

(T_R)_A: tiempo de retención del pico A, en min

(T_R)_B: tiempo de retención del pico B, en min

W_A: anchura del pico A en su base, en min. W_A = 1,698 W_{A/2}

W_B: anchura del pico B en su base, en min. W_B = 1,698 W_{B/2}

- Simetría del pico de monobromado (entre 0,8 y 1,5): Se preparó una disolución de MBr de 1,5 mg/L, se hicieron 3 inyecciones. El dato del factor de simetría es brindado por el software utilizado.

b) Especificidad

Se registraron los siguientes cromatogramas en las condiciones especificadas

- Fase móvil
- Disolución del excipiente
- Disolución de material de referencia MBr 1,5 mg/L recién preparada
- Disolución de material de referencia G-1 1,5 mg/L recién preparada
- Disolución de G-1 material de referencia y disolución de MBr material de referencia, en proporción 1:1
- Disolución de la muestra de ensayo
- Disolución de la muestra de ensayo enriquecida con MBr al 1 % según nivel de especificación (1,5 mg/L)
- Disolución de la muestra de ensayo, después de 2 h expuesta a la luz del laboratorio

En todos los casos se observó si existía algún pico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al MBr.

c) Linealidad

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,7 mg/L y 2,3 mg/L, con valores intermedios de 1,1 mg/L, 1,5 mg/L y 1,9 mg/L. El análisis se realizó por triplicado.

Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ($\geq 0,990$), el coeficiente de determinación ($> 0,98$) y el CV de los factores de respuesta ($\leq 5\%$). Se evaluó la varianza de la pendiente de la línea de regresión, desviación estándar,

desviación estándar relativa, límites de confianza de la pendiente y grado de significación; además, se verificó la proporcionalidad.

d) Precisión

Repetibilidad instrumental: Se pesó con exactitud aproximadamente 1 g de excipiente, se le añadió 1,5 mg/L de MBr, se homogeneizó y se procedió según la muestra de ensayo. Se hicieron 6 inyecciones de manera consecutiva. Se calculó la media de la respuesta (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación ($CV \leq 1 \%$).

Repetibilidad del método: Se pesó con exactitud aproximadamente 1 g de excipiente, se le añadió 1,5 mg/L de MBr, se homogeneizó y se procedió según la muestra de ensayo. Se hicieron 6 réplicas. Se calculó la media de las respuestas (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación ($CV \leq 2 \%$).

- Precisión intermedia: Se pesó con exactitud aproximadamente 1 g de excipiente, se le añadió MBr, se homogeneizó y se procedió según la muestra de ensayo. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de MBr (inferior, media y superior del intervalo especificado), por duplicado en tres días diferentes. Se calculó la media de las respuestas (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación ($CV \leq 2 \%$) para cada grupo de análisis. El CV de la precisión intermedia debe ser inferior al doble del CV de la repetibilidad del método.
- Se realizó un análisis de varianza multifactorial para analizar la influencia de los factores concentración y día en la variabilidad de los resultados, para ello se utilizó un estimador que es el $\ln R^2$ (donde R son los residuales), con un nivel de confianza de 95 %.

e) Exactitud (veracidad)

Se pesó con exactitud aproximadamente 1 g de excipiente, se le añadió MBr, se homogeneizó y se procedió según la muestra de ensayo. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de MBr (inferior, media y superior del intervalo especificado). El análisis se realizó por triplicado. Se realizó una prueba t-student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un $\alpha = 0,05$. También se calculó el porcentaje de recobrado y con ello se obtuvo un análisis de varianza unifactorial para analizar la influencia de la concentración.

f) Intervalo

Se realizaron tres réplicas de excipiente con 0,7 mg/L, 1,5 mg/L y 2,3 mg/L de MBr, siguiendo el mismo diseño del estudio de la exactitud y se comprobó en ellas los criterios de exactitud, precisión y linealidad, como se ha descrito en cada acápite.

g) Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación, respectivamente, se determinaron mediante el diseño de relación señal-ruido, para lo cual se procedió al análisis repetido del excipiente. Una vez obtenido el cromatograma, se delimitó dentro de la línea base un periodo de tiempo veinte veces la anchura en la base del pico de MBr. Para el cálculo se procedió según la ecuación (4):

$$DL/QL = \frac{Y_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b} \quad (4)$$

donde

DL = límite de detección

QL = límite de cuantificación

K = constante ≥ 3 (K = 3 para límite de detección, y K = 10 para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos

b = pendiente de la recta de calibración

Y_{bl} = media de la respuesta de los n blancos

Resultados y discusión

Pruebas de adecuación del sistema

La repetibilidad de los tiempos de retención presenta un coeficiente de variación de 0,31 %, menor que el 1 %. El número de platos teóricos de la columna utilizada es de 14 527, mucho mayor que 5 000. El factor de resolución entre el pico de G-1 y MBr es 6,6, mucho mayor que 1,5. La simetría del pico de MBr es de 1,05, se encuentra en el intervalo entre 0,8 y 1,5; por tanto, el sistema cromatográfico a emplear es adecuado para su utilización en este método de ensayo.

Especificidad

A continuación se exponen los cromatogramas registrados durante el estudio de la especificidad (figuras 1-8).

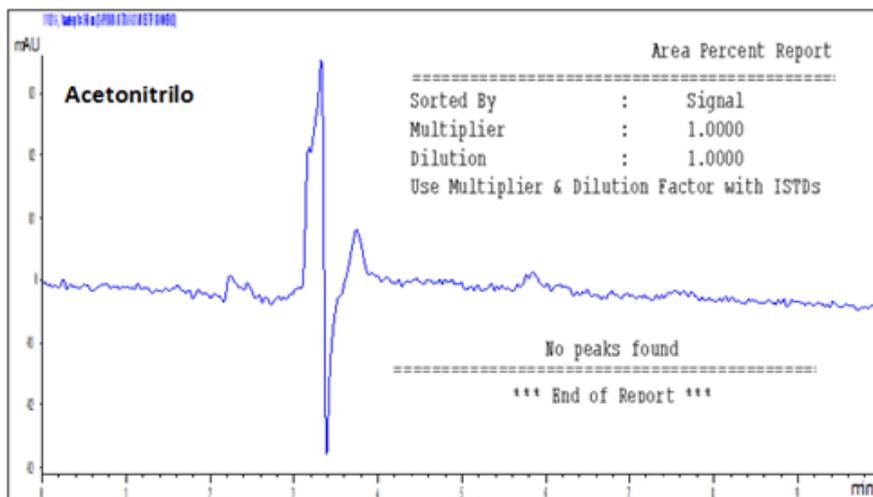


Figura 1. Cromatograma de la fase móvil (acetonitrilo)

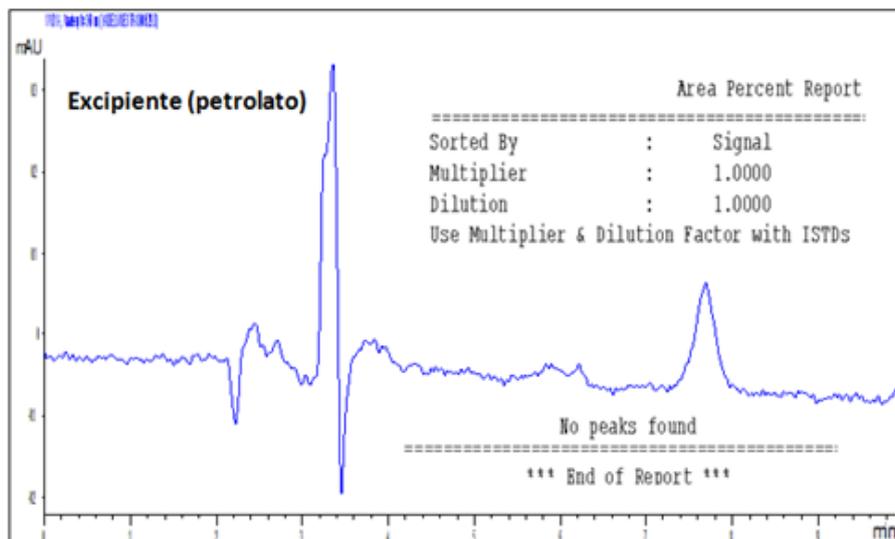


Figura 2. Cromatograma del excipiente del Dermofural

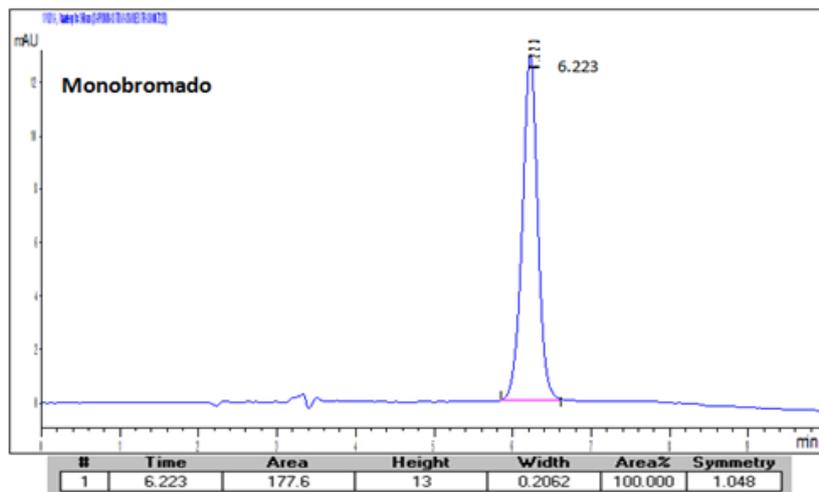


Figura 3. Cromatograma de una disolución de material de referencia MBr 1,5 mg/L recién preparada

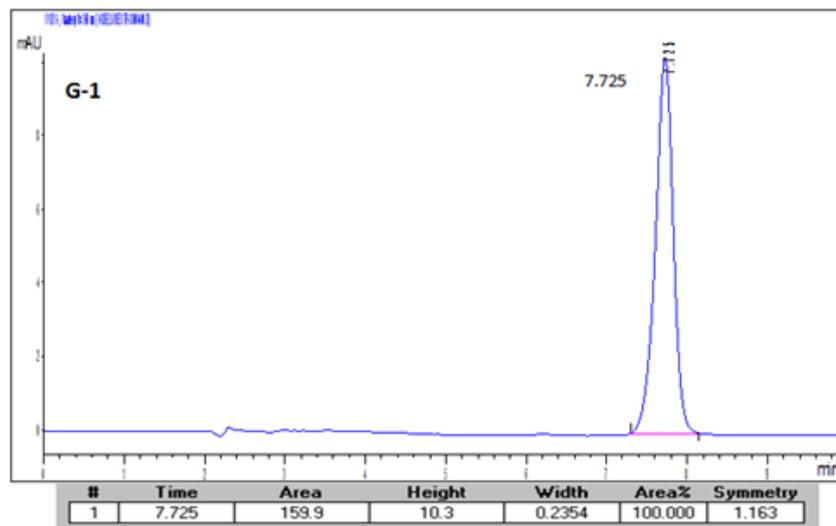


Figura 4. Cromatograma de una disolución de material de referencia G-1 1,5 mg/L recién preparada

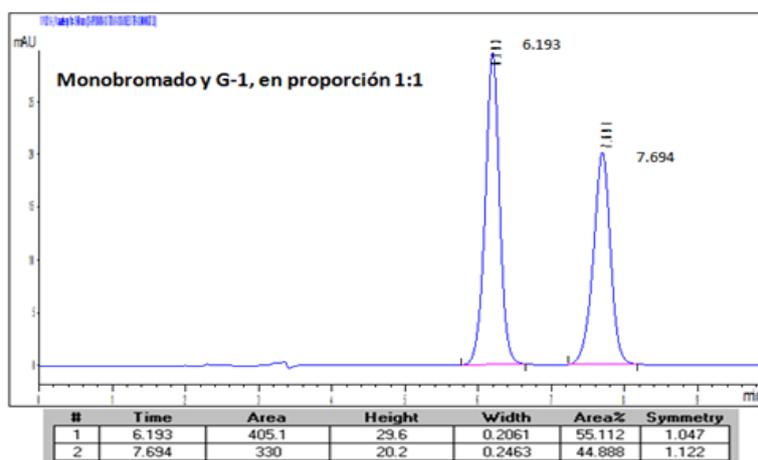


Figura 5. Cromatograma de una disolución de G-1 material de referencia y disolución de MBr material de referencia, en proporción 1:1



Figura 6. Cromatograma de una disolución de muestra de ensayo (Dermofural)

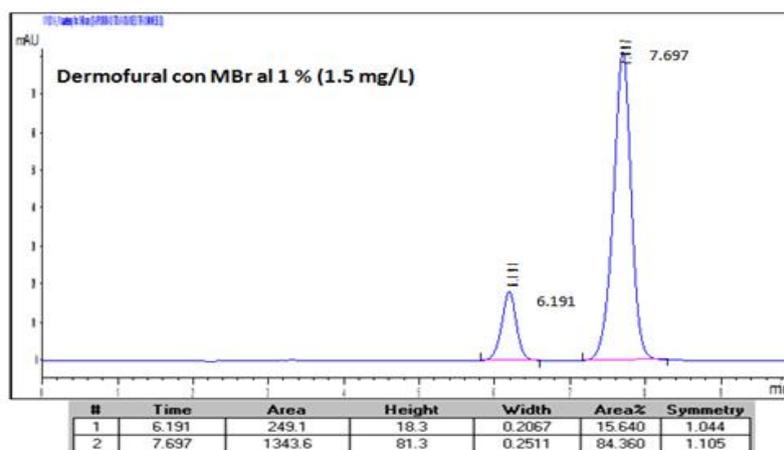


Figura 7. Cromatograma de una disolución de muestra de ensayo (Dermofural) enriquecida con MBr al 1 %



Figura 8. Cromatograma de una disolución de muestra de ensayo (Dermofural), después de 2 h expuesta a la luz del laboratorio

En todos los casos se observa que no hay ningún pico cromatográfico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al MBr, por lo que se concluye que el método en las condiciones estudiadas es específico.

Linealidad

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración, así como los parámetros para evaluar la calidad de la regresión se muestran en la tabla 1 y en la figura 9.

TABLA 1. VALORES EXPERIMENTALES OBTENIDOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE MBR

Conc. (mg/L)	Área ₁	Área ₂	Área ₃
0,7	115,00	114,75	114,85
1,1	178,95	178,50	178,20
1,5	246,85	249,25	245,65
1,9	305,13	304,65	307,30
2,3	373,10	375,10	372,75

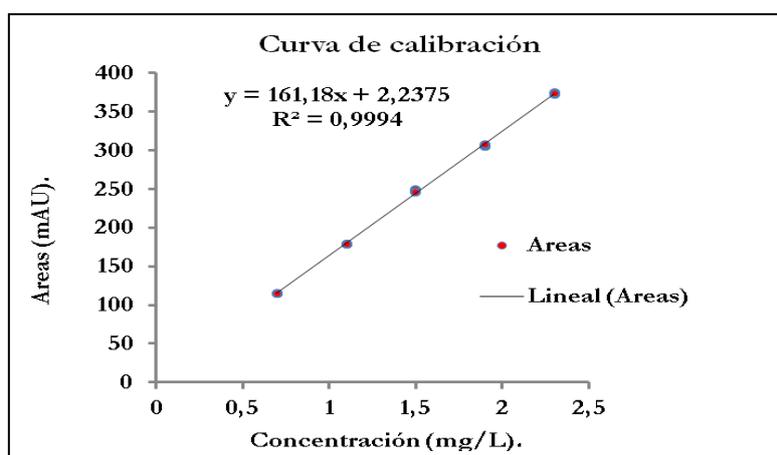


Figura 9. Curva de calibración y ecuación de la recta del MBr por HPLC

Del análisis de la regresión y la linealidad se obtiene que:

- El coeficiente de correlación es de 0,999 7 con un coeficiente de determinación igual a 0,999 4, por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y el área determinada superior al 99,9 %.
- El $CV_f = 0,96 \%$, por tanto, se cumple que $CV_f \leq 5 \%$, lo que significa que existe linealidad en los datos obtenidos.
- La pendiente (b) es de 161,18 y la varianza de la pendiente (S_b^2) es de 1,199 7, por lo que el método posee una buena sensibilidad.
- La desviación estándar de la pendiente (S_b) es de 1,1 y la desviación estándar relativa (S_b rel. %) es igual a 0,68 %.
- Los límites de confianza para $t_{tab} = 2,16$, con n-2 grados de libertad y $\alpha = 0,05$ se encuentran entre 158,81 y 163,55.
- Para determinar el grado de significación, la $t_{exp} = 147,16$, de esta manera se acepta $H_1: b \neq 0$, por lo que existe regresión, la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 95 %.

Del análisis de la proporcionalidad se obtiene que:

- Los límites de confianza de **a** para $t_{tab} = 2,16$ (n-2; $\alpha = 0,05$), se encuentran entre -1,56 y 6,03, por tanto, incluyen al 0 y cumplen la condición de proporcionalidad.
- Para determinar el grado de significación, la $t_{exp} = 1,27$, de esta manera se acepta H_0 , la recta pasa por el eje de coordenadas y se puede obviar el valor de **a** en la ecuación de regresión.

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

Precisión

La variabilidad de la respuesta, expresada como coeficiente de variación, es menor del 1 %, con una adecuada correspondencia entre las respuestas obtenidas para las inyecciones repetidas (tabla 2).

TABLA 2. RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD INSTRUMENTAL

Inyecciones	Áreas	Parámetros estadísticos
1	252,8	$X_m = 253,97$ $S = 1,04$ $CV = 0,41 \%$
2	254,0	
3	254,3	
4	254,4	
5	252,8	
6	255,5	

Dicho resultado demostró que con este procedimiento es posible minimizar los errores potenciales asociados a la inyección manual de las muestras, y con ello conseguir la precisión instrumental requerida. En consecuencia, para todas las determinaciones realizadas en este trabajo, se sigue el procedimiento de inyectar cada muestra por duplicado y utilizar para los cálculos el valor medio de la respuesta para ambas inyecciones.

El valor del coeficiente de variación es menor que 2 %, lo cual evidencia que el método de ensayo es repetible (tabla 3).

TABLA 3. RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Réplicas	Áreas	Parámetros estadísticos
1	251,2	$X_m = 250,30$ $S = 2,30$ $CV \% = 0,92 \%$
2	249,1	
3	249,4	
4	246,8	
5	252,8	
6	252,5	

En todos los casos, tanto en los diferentes días, como a las diferentes concentraciones, se obtienen valores de coeficiente de variación menores de 2 % y el CV total de la precisión intermedia es para cada concentración inferior al doble del CV de la repetibilidad del método (tabla 4).

TABLA 4. RESULTADOS DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA

Día 1	Conc. (mg/L)	0,7	1,5	2,3
	Áreas	113,6	246,8	373,3
		116,4	246,9	372,9
Parámetros estadísticos	$X_m = 115,00$ $S = 1,98$ $CV = 1,72 \%$	$X_m = 246,85$ $S = 0,07$ $CV = 0,03 \%$	$X_m = 373,10$ $S = 0,28$ $CV = 0,08 \%$	
Día 2	Áreas	115,7	249,4	372,4
		113,8	249,1	377,8
	Parámetros estadísticos	$X_m = 114,75$ $S = 1,34$ $CV = 1,17 \%$	$X_m = 249,25$ $S = 0,21$ $CV = 0,09 \%$	$X_m = 375,1$ $S = 3,28$ $CV = 1,02 \%$
Día 3	Áreas	113,7	244,7	377,1
		116	246,6	368,4
	Parámetros estadísticos	$X_m = 114,85$ $S = 1,63$ $CV = 1,42 \%$	$X_m = 245,65$ $S = 1,34$ $CV = 0,55 \%$	$X_m = 372,75$ $S = 6,15$ $CV = 1,65 \%$
Total por concentración		$X_m = 114,87$ $S = 1,30$ $CV = 1,13 \%$	$X_m = 247,25$ $S = 1,75$ $CV = 0,71 \%$	$X_m = 373,65$ $S = 3,43$ $CV = 0,92 \%$

Los resultados del análisis de varianza multifactorial para examinar la influencia de los factores concentración y día en la variabilidad de los resultados se presentan en la tabla 5.

TABLA 5. PRECISIÓN INTERMEDIA. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DEL LNR²

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F	Significación de F
Efectos principales					
A: Día	36,464 5	2	18,232 3	3,41	0,079 1
B: Conc	19,970 2	2	9,985 1	1,87	0,209 9
Interacciones					
AB	29,907 7	4	7,476 92	1,40	0,309 8
Errores o residuales	48,154 9	9	5,350 54		
Suma total de errores	134,497	17			

Como los valores de p son mayores que 0,05, no existe influencia de los factores día y concentración en la variabilidad de la respuesta (área) en el método de ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la repetibilidad y precisión intermedia se concluye que este método de ensayo es preciso en las condiciones estudiadas.

Exactitud

En los tres niveles de concentración se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 98 % y 102 % (criterio aceptado para métodos cromatográficos) y en los tres casos la t_{exp} es menor que la t_{tab} para $n-1$ grados de libertad y $p = 0,05$, lo cual significa que los valores obtenidos a las tres concentraciones no son estadísticamente diferentes de los valores teóricos (tabla 6).

TABLA 6. RESULTADOS DE LA EXACTITUD A TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN

Concentraciones	0,7 mg/L	1,5 mg/L	2,3 mg/L
Áreas obtenidas	115,5	246,0	375,9
	116,4	247,5	374,7
	115,7	245,0	374,0

Conc. calculada (mg/L)	0,703	1,512	2,318
	0,708	1,522	2,311
	0,704	1,506	2,307
Conc. media calculada (mg/L)	0,704 98	1,513 40	2,311 88
S	0,002 93	0,007 81	0,005 96
CV %	0,415 90	0,515 85	0,257 87
t_{tab}	4,303		
t_{exp}	2,94	2,97	3,45

% recuperación	100,39	100,82	100,80
	101,18	101,44	100,47
	100,56	100,41	100,28

Los resultados del análisis de varianza realizado se muestran en la tabla 7 y en la figura 10.

TABLA 7. EXACTITUD. ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F	Significación de F
Entre grupos	0,209 156	2	0,104 578	0,61	0,572 0
Dentro de grupos	1,022 07	6	0,170 344		
Suma total de errores	1,231 22	8			

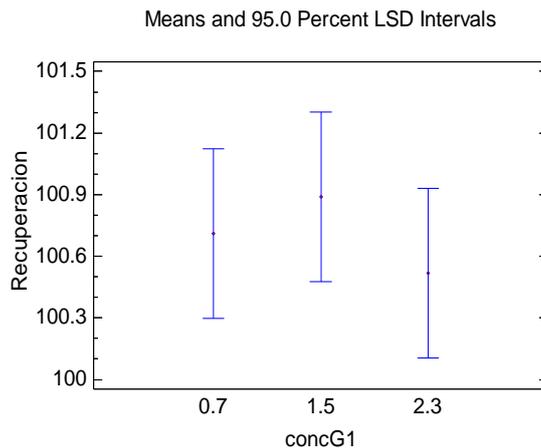


Figura 10. Exactitud. Ploteo de las concentraciones contra los porcentajes de recuperación

Como el valor de p es mayor que 0,05, no existe influencia del factor concentración en los valores de porcentajes de recuperación.

Todos los ensayos y análisis estadísticos realizados indican que el método de ensayo tiene la exactitud requerida.

Intervalo

Se escogió el intervalo de 0,7 mg/L a 2,3 mg/L, ya que para determinaciones de impurezas se debe incluir el 120 % de la especificación (1 % en el caso del MBr en el Dermofural). Se realizaron tres réplicas de excipiente con 0,7 mg/L, 1,5 mg/L y 2,3 mg/L de MBr y se comprobaron los criterios de exactitud, precisión y linealidad como se ha descrito en cada acápite correspondiente. En la figura 11 y en la tabla 8 se muestran la curva de calibración y el análisis estadístico realizado para precisión y exactitud, respectivamente.

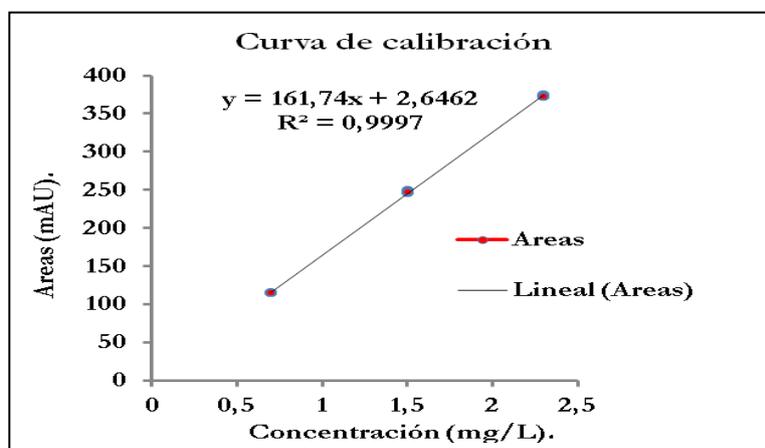


Figura 11. Curva de calibración para el intervalo

**TABLA 8. INTERVALO. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA
PRECISIÓN Y EXACTITUD**

Conc. (mg/L)	0,7	1,5	2,3
Áreas	115,0	245,65	375,1
	114,75	249,25	372,75
	115,85	246,85	373,1

Conc. calculada (mg/L)	0,695	1,502	2,303
	0,693	1,525	2,288
	0,700	1,510	2,290
Conc. media calculada	0,695 89	1,512 33	2,293 83
S	0,003 57	0,011 33	0,007 84
CV %	0,512 31	0,749 39	0,341 74
t _{tab}	4,303		
t _{exp}	2,00	1,88	1,36

% recuperación	99,24	100,16	100,12
	99,02	101,65	99,49
	99,10	100,66	99,58

Como se observa, existe un coeficiente de determinación igual a 0,999, lo cual indica que se establece una correlación positiva entre la concentración y el área determinada superior al 99,9 %. Para las tres concentraciones, los CV son menores de 1 %, indicativo de la precisión de los resultados. Los porcentajes de recuperación se encuentran cercanos al 100 % y en los tres casos la t_{exp} es menor que la t_{tab} para n-1 grados de libertad y p = 0,05, lo cual significa que los valores obtenidos a las tres concentraciones no son estadísticamente diferentes de los valores teóricos. Por lo que se cumple en cada uno de los niveles seleccionados con los criterios de linealidad, precisión y exactitud.

Determinación del límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación para la determinación de MBr por HPLC se determinaron mediante análisis repetidos del excipiente, y son expresados por las ecuaciones (5) y (6), respectivamente:

$$\text{Límite de detección: } 0,01 \text{ mg/L} \quad LD = \frac{\bar{X} + 3S}{b} \quad (5)$$

$$\text{Límite de cuantificación: } 0,04 \text{ mg/L} \quad LC = \frac{\bar{X} + 10S}{b} \quad (6)$$

Por lo que se puede cuantificar la impureza MBr en el Dermofural cuando se encuentre por encima de un 0,03 %.

Conclusiones

El método de ensayo para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por cromatografía líquida de alta eficacia, fase inversa, utilizado para el control de la calidad del Dermofural y para su estudio de estabilidad, resultó ser específico, lineal en el intervalo de concentraciones de 0,7 mg/L a 2,3 mg/L, preciso y exacto, con un límite de detección de 0,1 mg/L y de cuantificación de 0,09 mg/L.

Referencias bibliográficas

1. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS, *Validación de Métodos analíticos*, Regulación No. 41-2007, La Habana, MINSAP, 2007.
2. AGUIRRE ORTEGA, L., *et al.*, *Validación de métodos analíticos*, España, Ed. A. E. F. Industria, 2001.
3. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH), *Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability*, ICH Harmonised Tripartite Guideline, VIII, Federal Register, FDA, USA, 1995, 60(40), 11260.
4. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*, Q2(R1), Geneva, ICH, 2005.
5. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, *Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos*, NC TS 368, La Habana, 2010.
6. ZUNICA-RAMAJO, L. R.; ROMER, R., “Un modelo para el estudio de efectos sobre la dispersión en ausencia de replicaciones”, *Estadística española*, 1987, 116, 55-74.