

## Diseño y validación de un método espectrofotométrico para el control de la calidad del furvinol

### Design and validation of a spectrophotometric method for the quality control of Furvinol

MSc. Lázara Sulin González Ferrer,<sup>1</sup> Téc. Ana María Samé Pérez<sup>1</sup>

Empresa de Productos Inyectables LABIOFAM. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** el furvinol es un ungüento oftálmico veterinario cubano. Se emplea en el tratamiento externo de infecciones oculares en animales debido a su acción antibacteriana de amplio espectro. Su principio activo es un derivado de la caña de azúcar conocido como furvina o G-1.

**Objetivo:** desarrollar un nuevo método por espectrofotometría UV-Vis para su aplicación en el control de calidad del furvinol.

**Métodos:** se estableció un procedimiento rápido previo al análisis que consistió en una extracción del G-1 de la base del ungüento utilizando n-hexano y dimetilsulfóxido como solventes, con un alto porcentaje de recuperación. Posteriormente, se determinó la concentración a una solución de G-1 en dimetilsulfóxido (0,012 mg/mL) a una longitud de onda de máxima absorción de 386 nm. Se aplicó la validación prospectiva según exigencias regulatorias actuales.

**Resultados:** se demostró que el método es lineal, específico, preciso, exacto y robusto en el rango estudiado.

**Conclusiones:** los resultados garantizan la fiabilidad del método para la cuantificación de G-1 durante el control de la calidad.

**Palabras clave:** furvinol, validación, espectrofotometría.

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** Furvinol is a Cuban ophthalmic ointment for veterinary purposes. It is used in the external treatment of ocular infections in animals due to its wide spectrum

antibacterial action. Its active principle derived from the sugar cane known as Furvina or G-1.

**Objective:** to develop a method based on UV Vis spectrophotometry for application in quality control of Furvinol.

**Methods:** a quick procedure prior to analysis was established, which consisted of extraction of G-1 from the ointment base by using n-hexane and dimethylsulfoxide as solvents, with a high percentage of recovery. Subsequently, the concentration of G-1 solution in dimethylsulfoxide (0,012 mg/mL) at 386 nm highest absorption wavelength was determined. The prospective validation was applied according to the present regulatory demands.

**Results:** it was proved that the method was linear, precise, accurate and robust in the studied range.

**Conclusions:** the results assure the reliability of the method for quantification of G-1 during the quality control.

**Key words:** Furvinol, validation, spectrophotometry.

---

## INTRODUCCIÓN

El furvinol es un ungüento oftálmico veterinario cuyo principio activo es la furvina (G-1), derivado de la caña de azúcar. Es indicado en el tratamiento médico externo de infecciones oculares tales como blefaritis, conjuntivitis, queratitis y queratoconjuntivitis, especialmente en la queratoconjuntivitis infecciosa en equinos, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, perros, gatos y conejos, debido a su acción antibacteriana de amplio espectro.<sup>1,2</sup>

Este producto tiene desarrollado métodos analíticos cromatográficos para determinar la concentración de G-1 por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y cromatografía gaseosa. La estructura química del G-1 presenta grupos cromóforos lo que permite la aplicación de un método analítico espectrofotométrico para su cuantificación y por ende su empleo en el control de calidad. Los métodos espectrofotométricos en comparación con los cromatográficos son rápidos y sencillos, por lo que son de gran utilidad para estos fines.

Este trabajo tiene el objetivo de desarrollar un nuevo método por espectrofotometría UV-Vis para su aplicación en el control de calidad del furvinol. Para ello, se realizó la validación del método analítico evaluándose como parámetros la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango y robustez.<sup>3-7</sup>

## MÉTODOS

El material de referencia químico (MR) de G-1 se suministró por el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de las Villas con una pureza de 99,87 %. El producto terminado se elaboró por la Empresa de Productos Inyectables LABIOFAM. Los reactivos empleados fueron n-hexano grado HPLC, Panreac y el dimetilsulfóxido (DMS), puro para análisis, Riedel de Haen.

Se emplearon los equipos siguientes: espectrofotómetro UV-Vis Libra Biochrom con cubeta de cuarzo (1 cm de paso óptico) y la balanza analítica digital Shimadzu de capacidad 220 g con una sensibilidad de 0,1 mg.

#### DESARROLLO DEL MÉTODO PARA CONTROL DE CALIDAD DEL FURVINOL UNGÜENTO OFTÁLMICO

Se desarrolló un nuevo método por espectrofotometría UV-VIS para el control de la calidad del furvinol ungüento oftálmico por ser un método rápido y sencillo, además de que se contara con el equipamiento para este fin. Se determinó que la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda$ ) de la furvina (MR) en DMS a una concentración de 0,012 mg/mL en el rango de 250 a 450 nm del espectro UV-VIS es 386 nm.

Se realizó una extracción del principio activo de la base del ungüento considerando la solubilidad de sus componentes en los solventes n-hexano y DMS, teniendo en cuenta que la base oleaginosa del ungüento (compuesta por petrolatos) es soluble en n-hexano y prácticamente insoluble en DMS; la furvina es fácilmente soluble en DMS y poco soluble en n-hexano. Ambos solventes son inmiscibles, de modo tal que quedan dos fases claramente definidas, una de color blanco que contiene la base oleaginosa y el n-hexano, y otra fase de color amarillo que contiene DMS y el principio activo.

A continuación se describe el método propuesto para determinar la concentración del principio activo:

#### Solución de referencia

Pesar 0,0375 g de G-1 (MR) y disolver en 10 mL de DMS; transferir a un embudo separador. Adicionar 30 mL de n-hexano; agitar vigorosamente durante 1 min, dejar reposar hasta que se separen las dos fases. Extraer la fase del DMS de color amarillo en un volumétrico de 25 mL. Continuar haciendo la extracción con 10 mL de DMS, enrasar con el mismo solvente y homogeneizar. Pipetear 1 mL de la solución anterior y trasvasar a un volumétrico de 25 mL, enrasar con DMS y homogeneizar. Pipetear 5 mL de solución y transferir a un volumétrico de 25 mL, enrasar con DMS y homogeneizar.

#### Solución de ensayo

Pesar 1 g del ungüento y disolver en 30 mL de n-hexano; transferir a un embudo separador. Adicionar 10 mL de DMS; agitar manual y vigorosamente durante 1 min, dejar reposar hasta que se separen las dos fases. Extraer la fase del DMS de color amarillo en un volumétrico de 25 mL. Continuar haciendo la extracción con 10 mL de DMS, enrasar con el mismo solvente y homogeneizar. Pipetear 5 mL de la solución anterior y trasvasar a un volumétrico de 25 mL, enrasar con DMS y homogeneizar.

Leer en el espectrofotómetro la solución de referencia y la solución de ensayo a una  $\lambda = 386$  nm empleando como blanco DMS.

La validación del método de análisis se realizó según la categoría I de la USP 33 y la Regulación No.41/2007 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), para lo cual evaluaron los parámetros que a continuación se describen:<sup>4,6</sup>

### **Especificidad**

Se evaluaron por triplicado placebos del producto, solución del material de referencia y producto terminado.

Criterio de aceptación: no deben aparecer señales analíticas para el placebo en el rango de interés analítico.

### **Linealidad del método**

Se analizaron cinco concentraciones de G-1 (MR) por triplicado, en un rango de 50 a 150 % (50, 80, 100, 120, 150 %) de la cantidad teórica declarada como 100 %. Se prepararon placebos del producto, los cuales se cargaron con el MR.

Se construyó una curva de calibración de respuesta analítica absorbancia (y) vs. concentración teórica (x). Los resultados se procesaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Plus versión 5.1 (opción regresión lineal múltiple). Se determinó la ecuación de la recta  $y = bx + a$ , el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la prueba de significación estadística de la varianza de la pendiente  $S_b$  rel (%), los coeficientes de variación de los factores de respuesta ( $CV_F$ ) y el ensayo de proporcionalidad.

Criterios de aceptación: ecuación de la recta de regresión:  $y = bx + a$ ;  $r \geq 0,99$  y  $r^2 \geq 0,98$ .

Prueba de proporcionalidad del método analítico:  $a \pm t S_a$  debe incluir el cero para una p (probabilidad) = 0,05. Los  $CV_F < 5$  % y la desviación estándar relativa  $S_b$  rel (%)  $\leq 2$  %.

### **Exactitud**

Se realizó el modelo de tres réplicas para tres concentraciones diferentes (80, 100 y 120 %) de placebos cargados con MR. Se calculó el % de recobro (R), el recobrado medio y el coeficiente de variación total (CV). Se construyó la curva de recuperación de mg recuperados (y) vs. mg añadidos (x).

Criterios de aceptación: R: 97-103 % y  $CV < 3,0$  %.

Además, se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados. El valor de  $G_{exp}$  se comparó con el de  $G_{tab}$  ( $p = 0,05$ ;  $k = 3$ ;  $n = 3$ ), donde  $k =$  grupos experimentales,  $n =$  número de determinaciones por grupo.

Se realizó el ensayo t de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % para una probabilidad de 0,05 y  $n-1$  grados de libertad (gl).

### **Precisión**

*Repetibilidad:* se evaluaron por sextuplicado muestras equivalentes al 100 % de G-1. Se calculó la media, la desviación estándar así como el CV, el cual se comparó con el criterio establecido. Las determinaciones las realizó el mismo analista con las mismas condiciones de trabajo.

Criterio de aceptación:  $CV < 1,5 \%$ .

*Precisión intermedia:* participaron dos analistas, en tres días diferentes, en el mismo laboratorio. Se analizaron por triplicado en cada caso muestras equivalentes al 80, 100 y 120 % de G-1. Se calculó el CV total.

Criterio de aceptación:  $CV < 3,0 \%$ .

Se aplicaron adicionalmente otras pruebas:

- Prueba F de Fisher: se utilizó para determinar si no existe diferencia significativa entre la precisión alcanzada por los analistas, en 3 días de trabajo (para una  $p = 0,05$ ).

- Prueba t de Student: se utilizó para comprobar si los valores obtenidos por los analistas y los días en que se realizaron los análisis eran homogéneos para el nivel de significación y los grados de libertad seleccionados ( $p = 0,05$ ;  $gl = N_1 + N_2 - 2$ ).

Rango: se estableció el intervalo en que se cumplieron satisfactoriamente los criterios de linealidad, exactitud y precisión.

### **Robustez**

Se recurrió al esquema clásico de Youden y Steiner, el cual considera siete factores o variables diferentes en dos niveles: mayúsculas (corresponde al método en estudio) y minúsculas (representan las condiciones alternativas). Se efectuaron 8 análisis por muestra y cada uno fue una combinación diferente de los factores analizados (mililitro de n-hexano para diluir la muestra, protección o no de la luz, valoración inmediata o 10 min después, temperatura de trabajo  $T^0$ , tipo de agitación, longitud de onda). Se calcularon las diferencias y se compararon con la expresión  $S\sqrt{2}$ , siendo el valor de S la desviación estándar del estudio de repetibilidad. Las diferencias superiores en valor absoluto a  $S\sqrt{2}$  se consideraron significativas y determinan si un factor tiene influencia importante.

## **RESULTADOS**

*Especificidad:* no se registró respuesta del placebo en el rango de interés analítico. Mientras que los valores de absorbancia obtenidos para la solución de referencia y la muestra del producto fueron similares.

*Linealidad:* los resultados demostraron que el método es lineal al cumplir con los parámetros establecidos (tabla 1).

*Exactitud:* se cumplieron todos los criterios de aceptación exigidos, por lo que comprueban que el método es exacto (tabla 2).

*Precisión:* Para la repetibilidad se estimó la media (0,149), la desviación estándar (0,00074) y el CV (0,497) menor que 1,5 % establecido como límite.

Los resultados del estudio de la precisión intermedia se presentan en la tabla 3; se observan que se cumplieron satisfactoriamente todos los criterios establecidos, lo que demuestra que el método es preciso.

Rango: se estableció el intervalo en que se cumplieron satisfactoriamente los criterios de linealidad, exactitud y precisión (80 al 120 %).

*Robustez:* los cambios evaluados no afectaron los resultados analíticos, al ser los valores de las diferencias menores que  $S\sqrt{2}$  (0,0010) para todos los factores estudiados, excepto la agitación. Este factor dio un valor de 0,0155 superior a  $S\sqrt{2}$ , por lo que la diferencia es significativa y la mejor variante la representada con la letra mayúscula E, es decir, agitación vigorosa (tabla 4).

**Tabla 1.** Resultados del procesamiento estadístico del parámetro linealidad del método

Parámetros	Resultados	Criterios de aceptación
Ecuación de la recta	$Y = 0,007x - 0,031$	$Y = bx + a$
r	0,9988	$r \geq 0,99$
r <sup>2</sup>	0,9976	$r^2 \geq 0,98$
Sb rel (%)	1,73	Sb rel (%) $\leq 2$ %
CV <sub>F</sub>	1,68	CV <sub>F</sub> < 5 %
Prueba de proporcionalidad	-0,718-0,009	$A \pm t$ Sa incluye el cero (p= 0,05)

**Tabla 2.** Resultados del procesamiento estadístico del parámetro exactitud del método

Parámetros	Resultados	Criterios de aceptación
Ecuación de la recta	$Y = 0,001x - 0,991$	$Y = bx + a$
r <sup>2</sup>	0,9976	$r^2 \geq 0,98$
Recobrado medio	99,82 %	97-103 %
CV	0,25	CV < 3 %
Prueba G de Cochran	G exp 0,67 G tab 0,79	G exp < G tab p= 0,05; k= 3; n= 3
Prueba t de Student	t exp 2,11 t tab 2,30	t exp < t tab p= 0,05; gl= n - 1

**Tabla 3.** Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico

Niveles (%)	Prueba de significación de Fisher				Límites
	Por analistas $F_{tab(8/8; 0,05)} = 3,44$	Por día $F_{tab(5/5; 0,05)} = 5,05$			
		Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	1,04	0,70	2,58	1,81	F exp < F tab
100	1,80	0,38	1,38	0,52	
120	1,21	0,83	2,73	2,27	
Niveles (%)	Prueba de significación t de Student				Límites
	Por analistas $t_{tab(16; 0,05)} = 2,12$	Por día $t_{tab(10; 0,05)} = 2,22$			
		Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	
80	0,30	0,16	0,09	0,10	t exp < t tab
100	0,55	0,54	0,48	0,14	
120	0,02	0,26	0,60	1,04	
Coeficientes de variación					
Niveles (%)	Analista 1		Analista 2		Límites
80	0,71		0,64		C < 3,0 %
100	0,45		0,44		
120	0,38		0,28		

Niveles: porcentaje de la concentración de G-1 declarado en la formulación.

**Tabla 4.** Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico

Factores						
Condiciones normales	A: 30 mL n-hexano	B: proteger de la luz	C: Valoración inmediata	D: T° trabajo 30 °C	E: agitación vigorosa	F: $\lambda = 386$ nm
Condiciones alternativas	a: 20 mL n-hexano	b: no proteger de la luz	c: valoración pasados 10 min	d: T° trabajo 20 °C	e: agitación normal	f: $\lambda = 389$ nm
Diferencias del factor	$V_A = 0$	$V_B = 0,0001$	$V_C = 0,0007$	$V_D = 0,0002$	$V_E = 0,0155$	$V_F = 0,0006$

Criterio de comparación:  $S/\sqrt{2} = 0,0010$ .

## DISCUSIÓN

La especificidad para el control de la calidad se comprobó al no presentarse interferencias de los placebos en el rango de interés analítico, debido a que las sustancias que lo componen (petrolatos) durante el tratamiento previo a la muestra son extraídos en la fase del n-hexano y no en la fase del DMS que es la de nuestro interés.

El método fue lineal, demostrado a partir de los valores de coeficiente de regresión y determinación superiores a los exigidos (0,99 y 0,98 respectivamente), muy próximos a la unidad para un 99 % de nivel de confianza, por lo que existe una elevada

correlación lineal entre la respuesta analítica y la concentración. Los estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad (CVf y Sb rel (%)) fueron inferiores a los valores normados como máximo para estos indicadores (5 y 2 % respectivamente). El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero; lo que permite excluir la significación del error del intercepto.<sup>4,7</sup>

Los coeficientes de recobrado medio estuvieron dentro de los límites establecidos (97-103 %) y el valor de CV resultó ser menor que 3 %. Se evaluó la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados mediante una prueba de Cochran; los valores Gexp fueron menores que las Gtab para una  $p= 0,05$ ;  $k= 3$ ,  $n= 3$ ; por lo tanto las varianzas de las concentraciones estudiadas fueron equivalentes, lo cual indica que la concentración no influye en la exactitud del método. Por su parte, la prueba t de Student corroboró el parámetro exactitud, pues no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recobrado medio y el 100 %.<sup>4,7</sup>

En el estudio de repetibilidad realizado por el mismo analista, el mismo día a una misma muestra se obtuvo un CV (0,497) menor que 1,5%. Los valores obtenidos de la precisión intermedia de las pruebas de Fisher y t de Student para cada uno de los niveles estudiados demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días así como la homogeneidad de los resultados para una probabilidad de 0,05 al ser los valores de Fexp y texp menores que sus respectivos valores tabulados, lo que ratifica la precisión del método en estudio. Los CV fueron menores del 3 %.<sup>4,7</sup>

En los intervalos utilizados se demostró la linealidad, exactitud y precisión, pues los puntos 80 y 120 % fueron los seleccionados como niveles bajo y alto para las determinaciones realizadas.

El método fue robusto para todos los factores ensayados al ser los valores menores que  $S\sqrt{2}$  excepto para la agitación en que la diferencia fue mayor. Se verificó que los mejores resultados se presentan para las letras mayúsculas, pues las diferencias fueron menores que cero. Por tanto, queda definido como factor de mayor impacto en la calidad de los resultados analíticos la agitación que debe ser vigorosa.<sup>7</sup>

El método analítico espectrofotométrico es específico, lineal, exacto y preciso en el rango de interés (0,145-0,155 %). Es robusto para todos los factores estudiados excepto la agitación que debe ser vigorosa, por lo que puede ser establecido como método de control de calidad tanto en proceso como al producto terminado del furvinol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fabbretti A, Brandi L, Petrelli D, Pon CL, Castañedo NR, Medina R, et al. The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias. *Nucleic Acids Research*, 2012;40(20), 10366-74.
2. Vademecum LABIOFAM. La Habana:Grupo Empresarial Labiofam; 2010. p. 28.
3. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline.



Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). Washington: Food and Drug Administration; 2005. p. 1-2.

4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007.

5. British Pharmacopoeia. Validation of analytical procedures. London: The Stationery Office; 2011.

6. United States Pharmacopoeial Convention XXXIII and National Formulary 28<sup>st</sup>. USP XXXIII. United States Pharmacopoeia Convention. 33 ed. Rockville: Mack Printing; 2010.

7. Fernández A. Validación de técnicas analíticas. La Habana: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos; 1995. p. 1- 27, 33 -35.

Recibido: 8 de julio de 2013.

Aprobado: 22 de agosto de 2013.

*Lázara Sulín González Ferrer*. Empresa de Productos Inyectables LABIOFAM. La Habana. Cuba. La Habana, Cuba. Correo electrónico: [sulin@infomed.sld.cu](mailto:sulin@infomed.sld.cu)