

# Validación de un método por HPLC para los ensayos de contenido y disolución de moxifloxacina tabletas

## Validation of a method HPLC method for content and dissolution assays of moxifloxacin tablets

KARLA LIMA<sup>A,\*</sup>, MIRIAN REGNAULT<sup>A</sup>

### Resumen

Los laboratorios farmacéuticos deben demostrar que los productos que fabrican contienen exactamente la cantidad específica de principio activo necesario para obtener un producto de calidad. La validación es el proceso científico que lo logra y es un requerimiento indispensable que toda empresa debe cumplir, según las Buenas Prácticas de Manufactura y la Farmacopea Americana. En el presente trabajo se validó el método de análisis desarrollado por un laboratorio nacional de control de calidad para la determinación de moxifloxacina de 400 mg en tabletas, empleando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. El método empleado utilizó una columna cromatográfica XTerra RP18, 5 µm, 3,9 x 150 mm, y una fase móvil que contiene buffer fosfato tribásico de sodio: acetonitrilo: metanol: ácido metanosulfónico (50:25:25:0,1). Para el ensayo de disolución se utilizó el aparato No. 2 (paleta) y ácido clorhídrico 0,1N como medio de disolución. En la especificidad del ensayo de contenido no se observó ninguna interferencia entre la señal de la muestra, fase móvil, solvente y placebo. La curva de linealidad obtenida fue  $y = 13.275.205,3347x - 15.248,60000$ ;  $R^2 = 0,9918$  para un intervalo de concentración del 80 al 120%. La precisión del sistema fue de 1,38% para las muestras preparadas al 100%. La precisión del método para las muestras fue de 1,46%; la precisión intermedia fue de 1,54%. La exactitud en términos de porcentajes de recuperación fue de 98,32%. Se obtuvo un valor de límite de detección de 0,000052 mg/mL y un límite de cuantificación de 0,00052 mg/mL. En la especificidad del ensayo de disolución no se observó ninguna interferencia entre la señal de la muestra, fase móvil, y medio de disolución. La curva de linealidad obtenida fue  $y = 12.678.306,3138x - 14.723,9845$ ;  $R^2 = 0,9927$ . La precisión obtenida fue de 4,35% para las muestras al 100%. La metodología validada fue aplicada a tres lotes diferentes del producto.

**Palabras clave:** moxifloxacina, HPLC, ensayo de contenido, ensayo de disolución

### Abstract

Pharmaceutical laboratories must demonstrate that the products they manufacture contain exactly the specific amount of active principle needed to obtain a quality product. Validation is the scientific process that accomplishes this and it is an indispensable requirement that every company must comply, according to Good Manufacturing Practices and the American Pharmacopoeia. In the present work, the method of analysis developed by a national quality control laboratory for the determination of moxifloxacin of 400 mg in tablets, using the technique of High Resolution Liquid Chromatography was validated. The method used a XTerra RP18 chromatographic column and a mobile phase containing tribasic sodium phosphate buffer: acetonitrile: methanol: methanesulfonic acid (50: 25: 25: 0.1). For the dissolution test, apparatus No. 2 (paddle), and 0.1N hydrochloric acid was used as the dissolution medium. In the specificity, for the content assay no interference was observed between the sample signal and mobile phase, solvent and placebo. The linearity curve obtained was  $y = 13,275,205.3347x - 15,248.60000$ ;  $R^2 = 0.9918$  for a concentration range of 80 to 120%. The system accuracy was 1.38% for samples prepared at 100%. The precision of the method for samples was 1.46%. The intermediate precision was 1.54%. The accuracy in terms of recovery percentages was 98.32%. A detection limit value of 0.000052 mg/mL was obtained and a quantification limit of 0.00052 mg/mL. For the dissolution test specificity no interference was observed between sample signal and mobile phase, and dissolution medium. The linearity curve obtained was  $y = 12,678,306.3138x - 14,723.9845$ ;  $R^2 = 0.9927$ . Precision obtained was 4.35% for samples prepared at 100%. The validated methodology was applied to three different batches of the product.

**Key words:** moxifloxacin, HPLC, content test, dissolution test

<sup>A</sup> Postgrado Aseguramiento de la Calidad. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

\* Correspondencia: karla.fenix493@gmail.com; miriamregnault@gmail.com.

## Introducción

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) requieren que los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de un producto farmacéutico, con especificaciones establecidas, cumplan normas adecuadas de exactitud y confiabilidad (OMS, 2010). La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos de un conjunto de parámetros de desempeño (USP 38 NF 33, 2015c) haciendo al método más confiable, disminuyendo el número de fallas y la repetición de los análisis, proporcionando un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados que se obtengan.

Los laboratorios de control de calidad realizan una serie de ensayos para analizar la composición de un producto farmacéutico, entre las cuales se encuentran el contenido y el ensayo de disolución. El contenido consiste en una determinación cuantitativa del producto, o bien el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si los valores obtenidos corresponden con las especificaciones del producto (Romero, 2001). La disolución es una prueba fisicoquímica que determina la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interfase líquida/sólida, temperatura y composición del solvente (USP38 NF33, 2015a).

El fármaco estudiado en el presente trabajo es la moxifloxacina, la cual se usa para tratar determinadas infecciones bacterianas como la neumonía, la bronquitis y las infecciones de los senos paranasales y la piel, pertenece a una clase

de antibióticos llamados fluoroquinolonas y actúa eliminando las bacterias que causan infecciones. La moxifloxacina se presenta en el mercado como tabletas para administración por vía oral y gotas oftálmicas (Medline Plus, c2011). Varios trabajos han sido realizados para validar y optimizar las condiciones adecuadas de obtención de moxifloxacina en diferentes muestras. Nguyen y col. (2004) determinaron simultáneamente levofloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina en suero empleando la técnica de HPLC. Trindade y col. (2005) desarrollaron una metodología por voltametría de onda cuadrada para la determinación de moxifloxacina en tabletas y en muestras de orina humana enriquecidas. Laban-Djurdjevic y col. (2006) optimizaron y validaron un método para la determinación de moxifloxacina por la técnica de HPLC en plasma sanguíneo. Motwani y col. (2007) validaron un método espectrofotométrico para la estimación de moxifloxacina en productos a granel y terminados. Djurdjevic y col. (2009) optimizaron, separaron y determinaron moxifloxacina y sus compuestos relacionados por RP-HPLC en tabletas e infusiones para la determinación de compuestos de degradación en estudios de estabilidad de moxifloxacina. Sultan (2009) desarrollo un método espectrofotométrico para la determinación de moxifloxacina en formulaciones farmacéuticas. Xu y col. (2010) validaron y aplicaron un método para la determinación de moxifloxacina utilizando HPLC con detección ultravioleta en muestras de sangre. Khan y col. (2012) desarrollaron y validaron un método por HPLC para la determinación simultánea de cuatro dímeros fluoroquinolones como agentes antibacteriales potenciales. Kalariya y col. (2017) aplicaron un diseño experimental y la técnica de la respuesta de superficie para seleccionar las condiciones de HPLC en fase reversa óptimas para

la determinación de moxifloxacin y ketorolac en gotas oftálmicas. Razzaq y col. (2012) determinaron simultáneamente dexametasona y moxifloxacin en formulaciones farmacéuticas utilizando un método de HPLC con indicador de estabilidad. Ashour y Bayram (2015) desarrollaron y validaron un método espectrofotométrico sensible a la cinética para la determinación de moxifloxacin en formulaciones farmacéuticas. Lee y col. (2016) desarrollaron y validaron un método de LC-ESI-MS/MS para el análisis de moxifloxacin y levofloxacin en suero de pacientes con tuberculosis resistente a múltiples fármacos con aplicación potencial como herramienta de monitoreo terapéutico de fármacos en el diagnóstico médico. Khan y col. (2016) reportaron el desarrollo de la determinación simultánea de moxifloxacin y ofloxacin en fluidos fisiológicos utilizando HPLC con detección ultravioleta.

En la industria farmacéutica es necesario utilizar métodos confiables que permitan demostrar la calidad del producto fabricado. Diferentes farmacopeas establecen normas, procedimientos y métodos oficiales que ayudan a garantizar la calidad y seguridad de los medicamentos. Sin embargo, en algunos casos no existen métodos analíticos publicados para la determinación de un principio activo en diferentes presentaciones (tabletas, soluciones, etc.), por esta razón los laboratorios farmacéuticos se han visto en la necesidad de desarrollar sus propios métodos y validarlos, para garantizar que cumplen con las especificaciones establecidas. Al revisar tanto la Farmacopea Americana (USP 38 NF 33, 2015a, b, c) como las Farmacopeas Británica y Europea (BP, 2012; EP, 2012), se observó que sólo existen métodos para la determinación de moxifloxacin en materia prima o en solución oftálmica

y no en forma de tabletas, es por ello que la empresa en donde se realizó el trabajo se vio en la necesidad de desarrollar su propio método analítico que requiere de la validación para cumplir con los requerimientos establecidos por las autoridades regulatorias del país. El presente trabajo de investigación consistió en la validación de un método analítico, desarrollado por un laboratorio farmacéutico que fabrica productos genéricos, empleando la técnica de HPLC para los ensayos de contenido y disolución de tabletas de moxifloxacin de 400 mg.

## **Materiales y métodos**

### **EQUIPOS**

Los equipos utilizados en el siguiente trabajo fueron una balanza analítica modelo Sartorius MPower (máx 210 g y d: 0,1 mg) y ultrasonido marca Elmasonic E60H, Didacta, Caracas, Venezuela; pHmetro 827 pH Lab marca Metrohm, Cenatec, Caracas, Venezuela; plancha de calentamiento y agitación marca Cinarec Barnstead Thermolyne y bomba de extracción al vacío modelo GARTP101-EB, Corporación Científica Venezolana, Caracas, Venezuela; equipo de agua MilliQ marca Ultra PureWater System MiliQ Plus a 18,2  $\Omega$ /cm, Corporación Technipore, Caracas, Venezuela; disolutor marca Erweka DT6, Servifarma, Caracas, Venezuela y cromatógrafo de HPLC modelo modular 717 con detector UV dual  $\lambda$  serie 2487 marca Waters con software Empower System (Cienvar – Venezuela).

### **REACTIVOS Y SOLVENTES**

Metanol y acetonitrilo grado HPLC (Merck, Alemania). Ácido metanosulfónico (Merck, Alemania), fosfato tribásico de sodio dodecahidratado (J.T. Baker Analyzed, México), ácido fosfórico (J.T.

Baker, Estados Unidos) y ácido clorhídrico (Merck, Alemania), todos grado reactivo.

#### ESTÁNDAR Y MUESTRA

El estándar utilizado fue clorhidrato de moxifloxacin (USP, Rockville, Maryland-USA) lote FOH454. Las muestras de retención evaluadas de moxifloxacin 400 mg en tabletas correspondieron al lote 24027 con fecha de vencimiento de octubre 2016.

#### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se empleó una columna XTerra RP 18, 5 µm, 3,9 x 150 mm, marca Waters, lote 0220322301, una fase móvil tipo fase reversa conformada por una mezcla buffer: acetonitrilo: metanol: ácido metanosulfónico en proporciones de (50:25:25:0,1) a pH 5,5; longitud de onda 295 nm, velocidad de flujo de 0,8 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL.

#### PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

La fase móvil se preparó de la siguiente manera: se pesó 22,80 g de buffer de fosfato tribásico de sodio dodecahidratado en 3000 mL de agua destilada y se llevó a pH 5,50 con o-ácido fosfórico. Luego se mezcló con 1500 mL de acetonitrilo, 1500 mL de metanol y 6 mL de ácido metanosulfónico. Fue filtrada a través de una membrana de 0,45 µm x 47 mm marca HV Durapore, mediante el uso de una bomba de extracción y desgasificada mediante el uso de un equipo de ultrasonido.

#### DETERMINACIÓN DEL PESO PROMEDIO

Una de las variables que debe tomarse en cuenta para la determinación del contenido del analito en la muestra es el peso promedio. Según la técnica

desarrollada para la determinación de moxifloxacin, el peso promedio debe estar en un rango de (782,8 – 865,2) mg por tableta. Dicho intervalo fue obtenido a través de la fórmula maestra del producto. Para un total de 20 tabletas se obtuvo un peso promedio de 848,58 mg (DER: desviación estándar relativa la cual es una medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio (Miller y Miller, 2002) fue igual a 0,69%).

#### PREPARACIÓN DEL SOLVENTE

En un recipiente adecuado se mezcló 2000 mL de agua, 1000 mL de acetonitrilo y 1000 mL de metanol.

#### VALIDACIÓN

##### ENSAYO DE CONTENIDO

Según la USP 38 NF 33 (2015c), las especificaciones para el contenido de moxifloxacin en soluciones oftálmicas se encuentra entre 90 y 110%, en base a esto, se tomó dicha especificación para el análisis de tabletas.

#### PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Se pesó 25,0 mg de estándar de referencia de moxifloxacin en un balón de 100 mL y se disolvió con solvente, se llevó a volumen y se mezcló. Se tomó una alícuota de 2 mL y se llevó a un balón de 25 mL con solvente (Concentración final: 0,02 mg/mL; representa el 100%).

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesó una muestra equivalente a 25 mg de moxifloxacin en un balón de 100 mL, se disolvió con solvente, se llevó a volumen y se mezcló. Se tomó una alícuota de 2 mL y se transfirió a un balón de 25 mL, se llevó a volumen con solvente y se mezcló (Concentración

final: 0,02 mg/mL; representa el 100%). Para conocer la cantidad de muestra a pesar se utilizó una relación entre el peso promedio de las tabletas, el equivalente en peso y el contenido de principio activo declarado, obteniéndose que se debe pesar 53,0 mg de polvo de tableta (peso de muestra = peso promedio de tabletas x peso equivalente / cantidad de principio activo declarado en la tableta).

#### *PLACEBO*

Mezcla sintética de los excipientes que se encuentran en la tableta, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Control de Calidad donde fue realizado el estudio.

#### *APTITUD DEL SISTEMA*

Se inyectó una solución de estándar al 100% de la concentración (0,02 mg/mL) para determinar el número de platos teóricos (N), el factor de capacidad ( $k'$ ) y el factor de cola (T) para comprobar que las condiciones a las que se va a trabajar son las adecuadas.

#### *ESPECIFICIDAD*

Se preparó el estándar y la muestra a una concentración de 0,02 mg/mL de moxifloxacin y adicionalmente se preparó una solución de placebo a la misma concentración de la muestra y estándar. Bajo las condiciones cromatográficas establecidas, se inyectó por triplicado muestra, placebo, fase móvil y solvente. El estándar se inyectó seis veces.

#### *LINEALIDAD E INTERVALO*

Se prepararon soluciones estándar a 5 niveles de concentración (80%, 90%, 100%, 110% y 120%), partiendo de una solución madre (SM), luego se

realizaron las diluciones correspondientes para cada nivel de concentración. Se determinaron las áreas de cada solución estándar empleando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. Se registraron mediante una gráfica los resultados obtenidos, la cual incluyó la intersección con el eje de las ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales. SM: se pesaron 25,4 mg estándar de clorhidrato de moxifloxacin USP y se llevaron a un balón de 100 mL con solvente. Para las diluciones, desde una bureta de 10 mL se tomaron los siguientes volúmenes: 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; y 2,4 mL de la SM y cada uno se trasvasó a un balón aforado de 25 ml y se llevó a volumen con solvente para obtener las siguientes concentraciones: 0,016; 0,018; 0,020; 0,022 y 0,024 mg/mL que representan soluciones al 80%, 90%, 100%, 110% y 120% respectivamente.

#### *PRECISIÓN DEL SISTEMA*

Se prepararon seis muestras al 100% de concentración, según la metodología planteada, cuyos pesos fueron 53,1 mg, 53,2 mg, 53,5 mg, 53,0 mg, 53,0 mg y 53,0 mg y se inyectó cada una por triplicado. También se preparó una solución de estándar al 100% como se indica en la linealidad e intervalo pesando 25,4 mg de estándar.

#### *PRECISIÓN DEL MÉTODO*

Se prepararon tres soluciones de muestras de diferentes concentraciones con tres réplicas cada una, las cuales fueron de 80% (42,5 mg, 42,8 mg y 42,4 mg), 100% (53,0 mg, 53,0 mg y 53,0 mg) y 120% (63,6 mg, 63,7 mg y 63,6 mg). Se inyectaron cada una por triplicado junto con el mismo estándar preparado en el apartado anterior (el cual se inyectó seis veces).

**REPRODUCIBILIDAD DE LAS MUESTRAS**

Las muestras preparadas para estudiar la precisión del método fueron almacenadas en la nevera por dos días y se midieron en el equipo de HPLC al día siguiente para evaluar la reproducibilidad.

**EXACTITUD**

Se prepararon tres niveles de concentración (50%, 100% y 150%) con tres réplicas cada una de placebo más principio activo, los cuales fueron pesados por separado. Se utilizó una materia prima de clorhidrato de moxifloxacina, lote 31856, potencia 99,96% BH, vencimiento: mayo 2016 y fabricado por Europharma. Las cantidades de materia prima pesadas fueron corregidas de acuerdo con la potencia y se reportó como peso real de moxifloxacina. Solución de 50%: se pesó 5,7 mg, 5,2 mg y 5,9 mg de placebo y 6,3 mg, 6,2 mg y 6,5 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes. Solución de 100%: se pesó 11,8 mg, 11,8 mg y 11,8 mg de placebo y 13,2 mg, 13,2 mg y 12,7 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes. Solución de 150%: se pesó 17,6 mg, 17,2 mg y 17,7 mg de placebo y 19,7 mg, 23,6 mg y 19,7 mg de principio activo en tres balones de 100 mL diferentes. Se determinó el porcentaje de recuperación de las nueve determinaciones y se graficó la cantidad de muestra pesada en función de la cantidad de muestra recuperada para observar una tendencia lineal.

**LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Se utilizaron los métodos propuestos por la ICH, 1996 para estimar la mínima cantidad de muestra que puede ser detectable y la que puede ser cuantificable empleando el método basado en la

construcción de una curva de calibración a bajas concentraciones del analito y empleando la determinación experimental inyectando soluciones de muestras de moxifloxacina diluidas y evaluando la calidad cromatográfica en términos del valor de la relación señal/ruido utilizando el placebo como referencia.

**ROBUSTEZ**

Se procedió a realizar un cambio en las condiciones cromatográficas, en este caso un cambio de columna. Se compararon los resultados de la adecuación del sistema para la columna cromatográfica XTerra RP 18, 5  $\mu$ m, 3,9 x 150 mm y la columna NovaPak C18 4  $\mu$ m 3,9 x 150 mm, ambas marca Waters (CienVar, Caracas, Venezuela).

**ENSAYO DE DISOLUCIÓN****CONDICIONES**

Medio de disolución: Ácido Clorhídrico 0,1 N; volumen por vaso: 900 mL; aparato: 2 (paletas); velocidad de disolución: 45 rpm; tiempo de disolución: 45 min.

**PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR**

Se colocaron 10 mg de estándar de referencia de moxifloxacina en un balón de 50 mL, se disolvieron con medio de disolución, se mezcló y llevó a volumen. Se tomó una alícuota de 4 mL y se transfirió a un balón de 10 mL, se llevó a volumen con solvente.

**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Se colocó una tableta de moxifloxacina en cada vaso de disolución conteniendo 900 mL del medio de disolución, después de transcurrido el tiempo, se tomó una porción, se filtró y se tomó una alícuota

de 2 mL en un balón de 10 mL, se agregó 2 mL de medio de disolución y se llevó a volumen con solvente. Se utilizó el criterio de aceptación para el ensayo de disolución descrito en la USP 38 NF 33 (2015a), con una tolerancia: Q mínimo de 80% (FDA, 2010) siendo Q: cantidad de principio activo que se disuelve.

#### **ESPECIFICIDAD**

Bajo las condiciones cromatográficas ya mencionadas, se inyectó por triplicado la muestra, placebo, fase móvil, solvente y medio de disolución. El estándar se inyectó seis veces para evaluar las posibles interferencias en la determinación analítica.

#### **LINEALIDAD E INTERVALO**

Se prepararon diferentes niveles de concentración del estándar a partir de una *solución madre* (SM): Q-25; Q-15; Q+5; Q+15 y Q+25 (que equivalen a 55%, 65%, 85%, 95% y 105%). SM: se pesaron 10,5 mg estándar de clorhidrato de moxifloxacina USP y se llevaron a un balón de 50 mL con medio de disolución. Para las diluciones se midieron desde una bureta de 10 mL los siguientes volúmenes: 2,2; 2,6; 3,4; 3,8; y 4,2 mL de SM y cada uno se trasvasó a un balón aforado de 10 mL y se llevó a volumen con solvente, para obtener las siguientes concentraciones: 0,044; 0,052; 0,068; 0,076 y 0,084 mg/mL que representan el 55%, 65%, 85%, 95% y 105% respectivamente.

#### **PRECISIÓN**

Una vez concluido el tiempo de disolución se filtró una cierta cantidad de muestra de cada vaso, se prepararon las seis soluciones de muestra preparadas a una concentración de 0,089 mg/mL correspondiendo al 100% como se

indica en la preparación de la muestra y se inyectaron por triplicado junto con el estándar inyectado seis veces.

#### **ROBUSTEZ**

Se procedió a realizar un cambio en las condiciones cromatográficas, en este caso un cambio de columna. Una columna X Terra RP 18, 5 $\mu$ m, 3,9 x 150 mm, a una columna NovaPak C18, 4  $\mu$ m, 3,9 x 150 mm, ambas marca Waters (CienVar, Caracas, Venezuela).

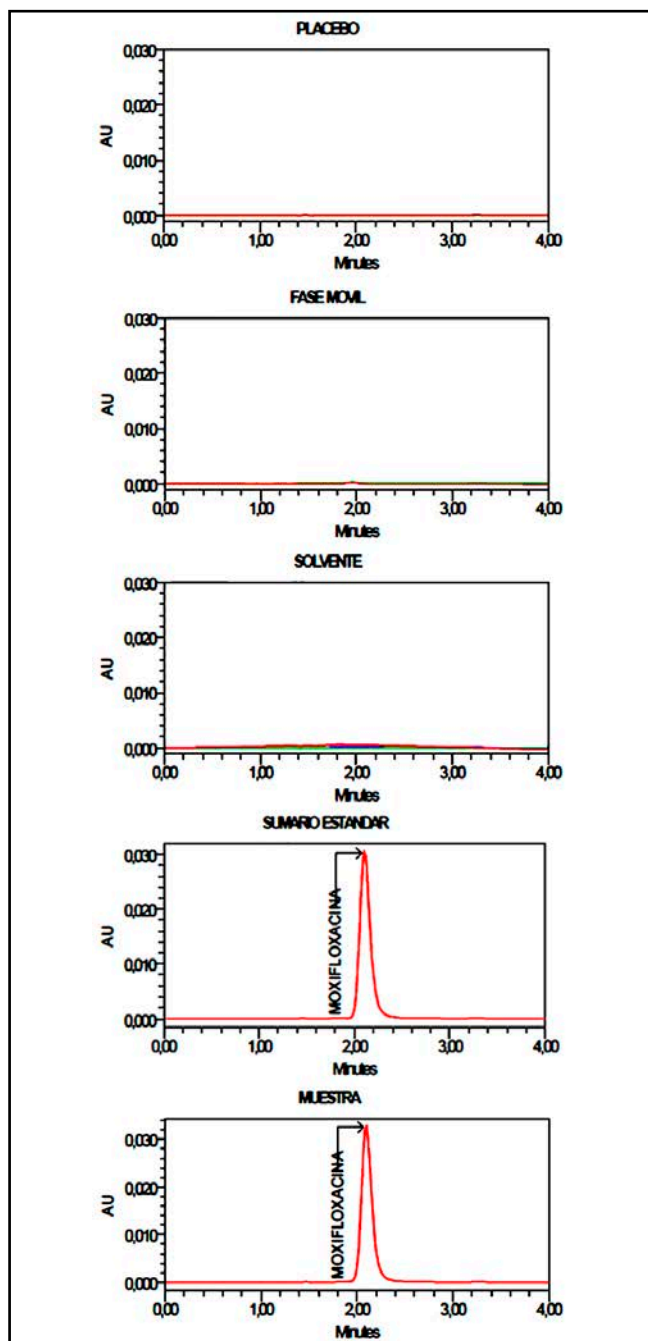
### **Resultados y discusión**

Para realizar la validación del método de moxifloxacina en tabletas primero se redactó el protocolo de validación, en donde se especificaron cada uno de los pasos a seguir para la evaluación de los ensayos de contenido y disolución. El primer parámetro a evaluar en la validación del método de moxifloxacina en tabletas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue la aptitud del sistema, el cual mediante un total de seis corridas del estándar certificado USP se verificó que el sistema cromatográfico fue adecuado para el análisis. Se obtuvo un valor de  $k'$  de 1,11, un valor de T de 1,26 y un valor de N de 2045; estos valores estuvieron dentro de los límites aceptables para un sistema idóneo (Regnault, 2005).

#### **ENSAYO DE CONTENIDO**

##### **ESPECIFICIDAD**

Se comparó el tiempo de retención de una muestra de moxifloxacina con el tiempo de retención del estándar certificado de clorhidrato de moxifloxacina USP. En la **Figura 1**, se observa que tanto la muestra como el estándar eluyen al mismo tiempo de retención. Por otro lado, se inyectó fase móvil, solvente y placebo, y

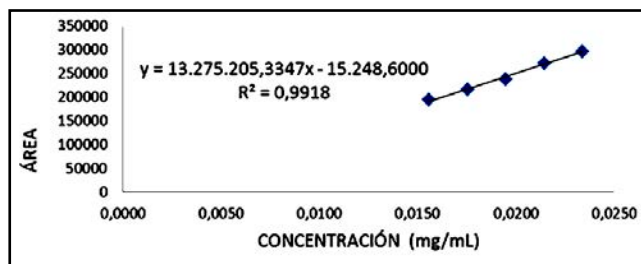


**Figura 1.** Cromatogramas de placebo, fase móvil, solvente, estándar y muestra, para la evaluación de la especificidad en el ensayo de contenido.

no se observó la interferencia de ninguno en la señal de la muestra, lo cual llenó el criterio de aceptación de la ICH (1996).

#### LINEALIDAD E INTERVALO

Se construyó una curva de calibración con cinco niveles de concentración (**Figura**



**Figura 2.** Curva de linealidad del ensayo de contenido

2) para comprobar el comportamiento lineal del método. Según la USP 38 NF 33 (2015c), para la valoración de un fármaco o de un producto terminado, el intervalo de linealidad debe estar entre 80% a 120% de la concentración de prueba.

**Tabla I**  
**Porcentaje de moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 100% para evaluar la precisión del sistema en el ensayo de contenido\***

MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	PROMEDIO ÁREAS	CONTENIDO (%)
M1 (100%)	53,1	251635	251680	102,93
		253598		
		249807		
M2 (100%)	53,2	250659	252206	102,95
		253962		
		251997		
M3 (100%)	53,5	252149	254640	103,36
		255709		
		256062		
M4 (100%)	53,0	253264	253921	104,04
		254064		
		254436		
M5 (100%)	53,0	251113	251123	102,89
		251541		
		250715		
M6 (100%)	53,0	244493	243914	99,94
		244685		
		242565		
CONTENIDO PROMEDIO (%)				102,68
DER (%)				1,38

\*DER para el estándar fue de 0,18%



Tabla II  
**Porcentaje de moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la precisión del método en el ensayo de contenido**

MUESTRA	ÁREA	PROMEDIO ÁREAS	CONTENIDO (%)
M1 (80%)	202631	202400	103,42
	201817		
	202752		
M2 (80%)	206629	207500	105,28
	207574		
	208297		
M3 (80%)	203740	204048	104,51
	203102		
	205303		
M1 (100%)	254269	254134	104,13
	254350		
	253783		
M2 (100%)	251309	251132	102,90
	250923		
	251163		
M3 (100%)	244916	244605	100,22
	244373		
	244526		
M1 (120%)	306683	306972	104,81
	307582		
	306651		
M2 (120%)	301129	302043	102,97
	302429		
	302572		
M3 (120%)	301030	300817	102,71
	300783		
	300637		
CONTENIDO PROMEDIO (%)			103,44
DER (%)			1,46

El coeficiente de correlación se encontró dentro del criterio de aceptación establecido de 0,99 (Miller y Miller, 2002) indicando que la curva fue lineal y demostró que el método permite obtener resultados o absorbancias que son directamente proporcionales a la concentración de la muestra, dentro de un intervalo de concentración de 80–120%.

## PRECISIÓN

La precisión del sistema, del método y la reproducibilidad son tres formas diferentes y necesarias para evaluar la precisión de un método analítico. En el caso de la precisión del sistema, seis muestras preparadas al 100% fueron inyectadas por triplicado en el equipo cromatográfico (**Tabla I**), con el fin de verificar si el sistema no presentaba variaciones al momento de inyectar y registrar la señal, para determinar la concentración de moxifloxacina en cada una de las muestras, es decir, si el sistema presentaba repetibilidad.

Por otro lado, tres niveles de concentración (80%, 100% y 120%), de tres réplicas cada una, fueron preparadas para evaluar la precisión del método (**Tabla II**). Estas tres concentraciones fueron seleccionadas para abarcar todo el intervalo de linealidad.

Mediante la precisión intermedia se pudo evaluar la reproducibilidad del método. Las mismas muestras preparadas para estudiar la precisión del método el primer día, fueron almacenadas en la nevera e inyectadas nuevamente dos días después (**Tabla III**), observándose poca variación en los resultados cuando se compararon con los de las muestras recién preparadas (**Tabla II**).

Por medio de las tres formas en que se estudió la precisión se pudo concluir que el método presentó repetibilidad y reproducibilidad ya que los valores de DER obtenidos fueron menores al 2%, cumpliendo con criterio de aceptación establecido para estos parámetros (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2014). Además, también se observó que no hubo variaciones en los resultados cuando se dejó las muestras de un día para otro,

Tabla III  
**Porcentaje de moxifloxacin en tabletas de 400 mg en muestras preparadas al 80%, 100% y 120% para evaluar la reproducibilidad del método en el ensayo de contenido\***

MUESTRA	ÁREA	PROMEDIO ÁREAS	CONTENIDO (%)
M1 (80%)	202334	202354	103,19
	202010		
	202719		
M2 (80%)	207997	207539	105,09
	207335		
	207285		
M3 (80%)	203164	202996	103,76
	202766		
	203057		
M1 (100%)	254053	253549	103,68
	253678		
	252917		
M2 (100%)	250303	250719	102,52
	251117		
	250738		
M3 (100%)	243312	243215	99,45
	243590		
	242743		
M1 (120%)	305657	306182	104,33
	305941		
	306947		
M2 (120%)	301650	302409	102,88
	302170		
	303407		
M3 (120%)	301343	301369	102,69
	301817		
	300946		
CONTENIDO PROMEDIO (%)			103,06
DER (%)			1,54

\*DER para el estándar fue de 0,37%

ya que al realizar un análisis estadístico aplicando la prueba F y la prueba *t-student* (Tabla IV) a los resultados obtenidos en las Tablas II y III, se demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo que las muestras presentaron cierta estabilidad entre días.

## EXACTITUD

Para el estudio de la exactitud fue necesario utilizar la mezcla sintética de todos aquellos compuestos añadidos a la tableta (sin el principio activo) conocido como placebo, el cual fue suministrado por el Laboratorio de Control de Calidad donde fue realizado el estudio. Se prepararon muestras a tres concentraciones diferentes (50%, 100% y 150%), con tres réplicas cada una, las cuales consistieron en una mezcla de principio activo más placebo, y fueron pesadas por separado para cada balón. De esta forma se realizó una pequeña simulación al mezclar los ingredientes para preparar una tableta. La escogencia de estos de niveles de concentración fue para diferenciarlo de los niveles de concentración seleccionados para el ensayo de precisión, los mismos fueron establecidos por el Departamento de Control de Calidad en donde se realizó el estudio y que se encuentran debidamente documentado en el Procedimiento Operativo Estándar (POE, 2013) para la Validación de Métodos. Una de las formas de reportar la exactitud es a través del porcentaje de recuperación, el cual nos indica las diferencias entre la cantidad

Tabla IV  
**Aplicación de la prueba F y la prueba *t-student* a 95% de confianza a los resultados obtenidos en las Tablas II y III para el ensayo de contenido**

F crítico	4,43
F calculado	1,09
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	F crítico $\geq$ F calculado ( $s_A^2 = s_B^2$ )
t crítico	2,1199
t calculado	0,52
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	t crítico $\geq$ t calculado ( $x_A = x_B$ )

Tabla V  
**Porcentaje de Recuperación obtenido al evaluar el parámetro de exactitud para ensayo de contenido**

MUESTRA	PESO REAL DE MOXIFLOXACINA (mg)	ÁREA	PROMEDIO DE ÁREAS	PESO DE MOXIFLOXACINA RECUPERADO (mg)	% RECUPERADO
M1 (50%)	6,30	60591	61466	6,22	98,75
		61421			
		62386			
M2 (50%)	6,20	60120	59736	6,04	97,52
		59388			
		59699			
M3 (50%)	6,50	62984	62739	6,35	97,69
		62129			
		63104			
M1 (100%)	13,19	128623	128618	13,01	98,62
		129516			
		127714			
M2 (100%)	13,19	130135	129122	13,06	99,01
		128718			
		128514			
M3 (100%)	12,69	123903	123214	12,47	98,20
		123565			
		122174			
M1 (150%)	19,69	191622	190839	19,31	98,05
		190220			
		190674			
M2 (150%)	23,59	231202	229439	23,21	98,40
		227762			
		229353			
M3 (150%)	19,69	190787	191908	19,42	98,60
		192381			
		192557			
CONTENIDO PROMEDIO (%)					98,32
DER (%)					0,50

añadida y la cantidad recuperada de muestra. Los resultados obtenidos se observan en la **Tabla V**.

El porcentaje de recuperación obtenido se encontró dentro del criterio de aceptación establecido 98-102% (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2014). Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los miligramos pesados inicialmente y los recuperados se procedió a realizar un

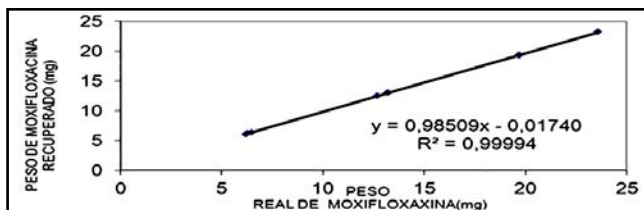
análisis estadístico aplicando la prueba de *t-student*. En la **Tabla VI** se muestran los resultados obtenidos en el análisis estadístico y se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, se construyó una curva lineal para comprobar que la cantidad de analito añadido en las muestras fue directamente proporcional a la cantidad de analito recuperado, y que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se encontró dentro del intervalo especificado (**Figura 3**).

Tabla VI  
**Aplicación de la prueba *t-student* 95% de confianza para la evaluación de la exactitud en el ensayo de contenido**

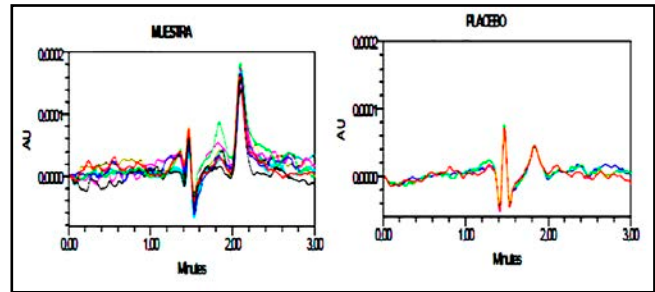
t crítico	2,306
t calculado	1,40
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	t crítico $\geq$ t calculado

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Según la ICH (1996) los límites de detección y cuantificación pueden ser determinados de varias formas, en base a la relación señal/ruido y utilizando la pendiente y la desviación estándar del punto de corte de una curva de calibración a bajas concentraciones. Diez muestras de placebo fueron preparadas e inyectadas en el equipo cromatográfico, estas no mostraron una señal diferente a la del ruido de fondo que pudiera ser detectable o cuantificable. Para estimar la mínima cantidad de muestra que puede ser detectable y la que puede ser cuantificable se empleó el método basado en la construcción de una curva de calibración a bajas concentraciones, obteniéndose una ecuación igual a:  $y = 12.430.668,2639x - 360,1650$  con un  $R^2 = 0,9996$ . Mediante el uso de la pendiente de la curva, la desviación estándar del punto de corte y las ecuaciones correspondientes a los límites de detección y cuantificación utilizando estas variables, se determinaron las señales de



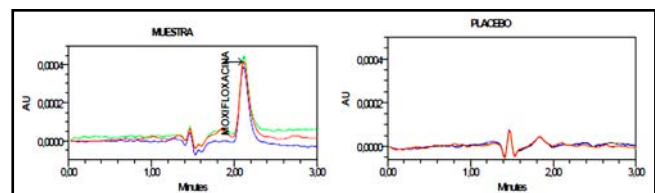
**Figura 3.** Curva de calibración de cantidad de moxifloxacina pesada inicialmente y cantidad de moxifloxacina recuperada para el ensayo de contenido



**Figura 4.** Mínima concentración a ser detectada en el equipo de HPLC (0,000052 mg/mL)

dichos parámetros. Luego mediante el uso de la ecuación de la recta se convirtieron esas señales en concentraciones. Para ambos parámetros se obtuvo la misma concentración (0,000028974mg/mL), por lo que se procedió a preparar una solución de muestra a dicha concentración, se inyectó en el equipo de HPLC y se comparó la señal de la muestra con la del placebo y se observó que no fue posible diferenciar la señal de moxifloxacina del ruido de fondo del equipo. Debido a los resultados obtenidos, tanto para el límite de detección como para el límite de cuantificación, se procedió a preparar soluciones más concentradas, que permitieran obtener aquella menor concentración que pudiera ser detectada y aquella mínima concentración que pudiera ser cuantificada. En las **Figuras 4 y 5**, se observan los cromatogramas obtenidos para las soluciones de 0,000052 mg/mL para el límite de detección y 0,00052 mg/mL para el límite de cuantificación.

En la **Figura 4** es posible diferenciar la señal de moxifloxacina del ruido de fondo



**Figura 5.** Mínima concentración a ser cuantificada en el equipo de HPLC (0,00052 mg/mL)

Tabla VII  
Resultados obtenidos en el estudio de robustez para el ensayo de contenido

RÉPLICA	Columna XTerra RP 18			Columna NovaPak C 18		
	PESO DE MUESTRA (mg)	ÁREA	POTENCIA (%)	PESO DE MUESTRA (mg)	ÁREA	POTENCIA (%)
M1	53	254269	104,18	53	223913	101,23
		254350	104,21		222527	100,60
		253783	103,98		222386	100,54
M2	53	251309	102,97	53	226555	102,42
		250923	102,81		228016	103,08
		251163	102,91		229019	103,54
M3	53	244916	100,35	53	227762	102,97
		244373	100,13		230384	104,15
		244526	100,19		227602	102,90
PROMEDIO (%):			102,41	PROMEDIO (%):		102,38
DER (%):			1,69	DER (%):		1,27

del equipo, al compararla con la señal del placebo. A partir de dicho cromatograma, se pudo determinar la relación señal/ruido, trazando una línea paralela al eje X a 1 cm de distancia y luego midiendo altura del pico de moxifloxacin, obteniéndose una relación señal ruido de 3,2 a 1. Con toda esta información obtenida se aceptó la concentración de 0,000052 mg/mL como el límite de detección.

Como se observa en la **Figura 5**, a la concentración de 0,00052 mg/mL, la señal del analito en la muestra pudo ser

Tabla VIII

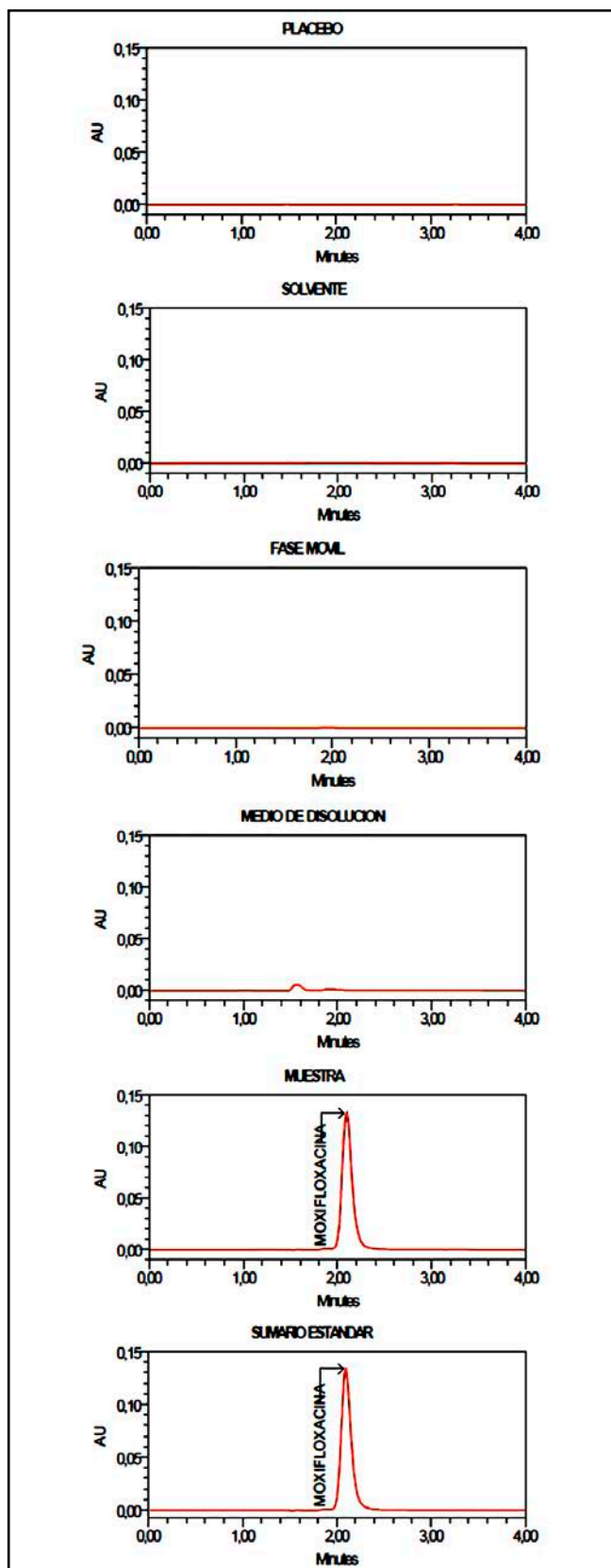
**Aplicación de la prueba F y la prueba t-student a 95% de confianza para en estudio de la Robustez en el ensayo de contenido**

F crítico	39,00
F calculado	1,77
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	F crítico $\geq$ F calculado ( $S_A^2 = S_B^2$ )
t crítico	2,306
t calculado	1,40
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	t crítico $\geq$ t calculado ( $X_A = X_B$ )

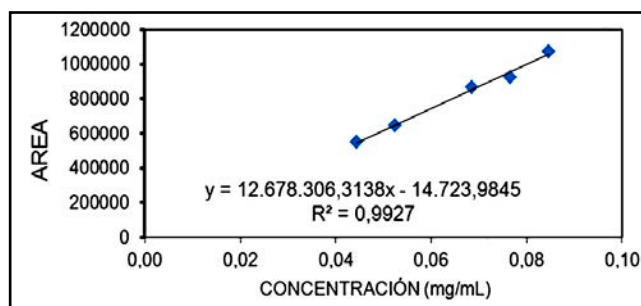
detectada y cuantificada, por los que se consideró esta concentración como el límite de cuantificación.

#### ROBUSTEZ

Para la evaluación de este parámetro se decidió realizar un cambio de columna, se pasó de una columna XTerra RP 18 a una Novapak C18. Para realizar dicho cambio se evaluó el comportamiento de la nueva columna bajo las condiciones de trabajo, mediante la aptitud del sistema, obteniéndose los valores de factor de capacidad  $k'$  de 1,29, N de 2020 y T de 2,20. En la **Tabla VII** se compararon los resultados obtenidos con ambas columnas al inyectar las mismas muestras preparadas el mismo día. En los cromatogramas obtenidos se pudo observar que al utilizar la columna Novapak C18 se produjo un ensanchamiento del pico. Al evaluar su factor de cola este fue mayor a 2, lo que indicó una mayor interacción del analito con la columna, por lo que la corrida fue más larga y el pico cromatográfico fue menos simétrico. Por otro lado, al utilizar la columna XTerra RP 18 se obtuvo un pico bien definido y delgado,



**Figura 6.** Cromatogramas de placebo, solvente, fase móvil, medio de disolución, muestra y estándar para la evaluación de la especificidad en el ensayo de disolución



**Figura 7** Curva de linealidad para el ensayo de disolución

que es el resultado que se espera en la técnica de cromatografía. Otras alternativas no fueron analizadas ya que el laboratorio donde fue realizado el estudio cuenta solamente con éstas dos clases de columnas.

Tabla IX  
**Porcentaje de moxifloxacina en tabletas de 400 mg en muestras preparadas a una concentración de 0,089 mg/mL correspondiente al 100% en el ensayo de disolución\***

MUESTRA	ÁREA	DISOLUCIÓN (%)
1	984220	90,72
	983284	90,63
	985401	90,83
2	969907	89,40
	968383	89,26
	972147	89,61
3	923940	85,16
	933089	86,01
	931967	85,90
4	1007656	92,88
	1003602	92,51
	1005824	92,71
5	1052266	96,99
	1046008	96,42
	1049262	96,72
6	935792	86,26
	935266	86,21
	929289	85,66
	PROMEDIO (%)	90,22
	DER (%)	4,35

\*DER para el estándar fue de 0,20%

Se aplicaron la prueba F y la prueba *t-student* (**Tabla VIII**) a los resultados obtenidos con ambas columnas y se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados al cambiar de columnas, a pesar de los valores superiores del factor de cola obtenidos con la columna Novapak.

#### ENSAYO DE DISOLUCIÓN

##### ESPECIFICIDAD

Se inyectó el solvente, placebo, fase móvil, muestra, estándar y el medio de disolución para demostrar que no se presentaba interferencia en la señal, obteniéndose la **Figura 6**.

##### LINEALIDAD

Una curva de calibración de cinco puntos de concentración fue construida para determinar el comportamiento lineal del método (**Figura 7**).

Dichos niveles de concentración fueron escogidos para abarcar todo el intervalo de disolución que se considera aceptable hasta S3 (USP 38 NF 33, 2015a). El coeficiente de correlación encontrado indicó linealidad.

##### PRECISIÓN

Una vez transcurrido el tiempo de disolución, se tomó una cierta cantidad de muestra, se preparó de acuerdo a la metodología y se inyectó en el equipo,

Tabla X

**Comparación de resultados obtenidos en el estudio de robustez para el análisis para el ensayo de disolución de las muestras de moxifloxacina**

RÉPLICA	CONCENTRACIÓN	Columna XTerra RP 18		Columna NovaPak C 18	
		ÁREA	DISOLUCIÓN (%)	ÁREA	DISOLUCIÓN (%)
M1	0,089	984220	90,72	925546	90,49
		983284	90,63	927765	90,70
		985401	90,83	929295	90,85
M2	0,089	969907	89,40	928617	90,79
		968383	89,26	926133	90,54
		972147	89,61	933212	91,23
M3	0,089	923940	85,16	909689	88,93
		933089	86,01	909834	88,95
		931967	85,90	903822	88,36
M4	0,089	1007656	92,88	957367	93,60
		1003602	92,51	950779	92,95
		1005824	92,71	954489	93,31
M5	0,089	1052266	96,99	1009515	98,69
		1046008	96,42	1008143	98,56
		1049262	96,72	1006172	98,37
M6	0,089	935792	86,26	907411	88,71
		935266	86,21	903661	88,35
		929289	85,66	901989	88,18
		Promedio (%)	90,22	Promedio (%)	91,75
		DER (%)	4,35	DER (%)	3,85

obteniéndose los resultados de la **Tabla IX**. Dichos resultados demostraron que el método es reproducible y confiable.

#### ROBUSTEZ

Para la evaluación de este parámetro se decidió efectuar el mismo cambio de columna realizado en el ensayo de contenido, se pasó de una columna XTerra RP 18 a una Novapak C18. Los resultados de la aptitud del sistema para la columna Novapak C18 fueron  $k'$  de 1,14;  $T$  de 2,72 y  $N$  de 2020. En la **Tabla X** se comparan los resultados obtenidos con ambas columnas al inyectar las mismas muestras preparadas el mismo día. En los cromatogramas obtenidos se pudo observar el mismo caso presentado en el ensayo de contenido al utilizar la columna Novapak C18, en donde se produjo un ensanchamiento de pico, indicando una mayor interacción del analito con la columna, por lo que la corrida fue más larga. Al utilizar la columna XTerra RP 18 se obtuvo un pico bien definido y delgado, adecuado en la técnica de cromatografía. Otras alternativas no fueron analizadas ya que en el laboratorio donde fue realizado el estudio se cuenta solamente con éstas dos clases de columnas.

Se aplicaron la prueba  $F$  y la prueba  $t$ -student (**Tabla XI**) a los resultados obtenidos con ambas columnas y se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados al cambiar de columnas, a pesar de los valores superiores del factor de cola obtenidos con la columna Novapak C18.

La validación del método permitió comprobar que el método desarrollado para la determinación de moxifloxacina en tabletas de 400 mg permite obtener resultados confiables, exactos y precisos,

Tabla XI  
**Aplicación de la prueba  $F$  y la prueba  $t$ -student a 95% de confianza para el estudio de la Robustez en el ensayo de disolución**

F crítico	7,15
F calculado	0,81
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	$F \text{ crítico} \geq F \text{ calculado}$ ( $s_A^2 = s_B^2$ )
t crítico	2,2281
t calculado	1,23
Se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ )	$t \text{ crítico} \geq t \text{ calculado}$ ( $x_A = x_B$ )

además de que las muestras pueden mantenerse estables. Para demostrar esta afirmación, se decidió aplicar el método a tres lotes diferentes de productos para los ensayos de contenido y disolución mostrando resultados consistentes y reproducibles.

#### Referencias bibliográficas

- Ashour S, Bayram R. 2015. Development and validation of sensitive kinetic spectrophotometric method for the determination of moxifloxacin antibiotic in pure and commercial tablets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomol Spectroscopy* 140: 216–222).
- BP: British Pharmacopoeia. 2012 version 16 (en línea). Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, Great Britain.
- Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ. 2009. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 50: 117–126.
- EP: European Pharmacopoeia. 2012. 7,5 séptima edición (digital) European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare Council of Europe.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación



- oral sólidas de liberación inmediata. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos Administración de Alimentos y Drogas Centro de Evaluación e Investigación de Drogas (CDER). Agosto de 1997. Actualizado 24 de febrero de 2010. Disponible en: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
- ICH: International Conference Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2B Validation of Analytical Procedure: Methodology. ICH: Ginebra. 1996.
- Kalariya P D, Namdev D, Srinivas R, Gananadhamu S. 2017. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum Rp-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and Ketorolac tromethamine in eye drops. *J Saudi Chem Society* 21(1): S373–S382.
- Khan FU, Nasir F, Iqbal Z, Khan I, Shahbaz N, Hassan M, Ullah F. 2016. Simultaneous determination of moxifloxacin and ofloxacin in physiological fluids using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 1017–1018: 120–128.
- Khan M, Reddy C, Ravindra G, Reddy K, Dubey P. 2012. Development and validation of a stability indicating HPLC method for simultaneous determination of four novel fluoroquinolone dimmers as potential antibacterial agents. *J Pharm Biomed Anal* 59: 162–166.
- Laban-Djurdjevic A, Jelikié-Stankov M, Djurdjevic P. 2006. Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. *J Chromatogr B* 844(1): 104–111.
- Lee SJ, Desta KT, Eum SY, Dartois V, Cho SN, Bae D-W, Shin SC. 2016. Development and validation of LC-ESI-MS/MS method for analysis of moxifloxacin and levofloxacin in serum of multidrug-resistant tuberculosis patients: Potential application as therapeutic drug monitoring tool in medical diagnosis. *J Chromatogr B* 1009–1010: 138–143.
- Medline Plus. 2011 (en línea). Moxifloxacin. Biblioteca Nacional de Medicina: EEUU. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a600002-es.html> (26 de mayo de 2013).
- Miller J, Miller J. Método de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En: Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice Hall: España. 2002.
- Ministerio de Salud de Costa Rica. Guía de validación de métodos analíticos. Costa Rica. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/GuiaValidaciondeMetodosanaliticos-delMSdeCostaRica\\_2066.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/GuiaValidaciondeMetodosanaliticos-delMSdeCostaRica_2066.pdf)
- Motwani S, Chopra S, Ahmad F, Khar R. 2007. Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A* 68(2): 250–256.
- Nguyen HA, Grellet J, Ba BB, Quentin C, Saux MC. 2004. Simultaneous determination of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in serum by liquid chromatography with column switching. *J. Chromatogr B* 810(1): 77–83.
- OMS: World Health Organization (WHO). Buenas prácticas de la OMS para laboratorio de Control de Calidad de productos farmacéuticos. Reporte 44. WHO: Ginebra. 2010. Serie de Informes Técnicos: 957. Anexo 1. p. 32–34.
- POE: Procedimiento Operativo Estándar. Validación de Métodos Analíticos. N° C-SOP-05054. Última revisión Marzo 2013.
- Razzaq SN, Khan IU, Mariam I, Razzaq SS. 2012. Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of moxifloxacin and prednisolone in pharmaceutical formulations. *Chemistry Central J* 6: 94.

- Regnault M. Desarrollo de un método analítico por HPLC. Universidad Central de Venezuela: Caracas. 2005. Depósito legal: IF 2522003615374. ISBN No.980-12-0052-9
- Romero MA. Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de industrias farmacéuticas (Tesis doctoral. Monografía en Internet). Universidad Autónoma de Barcelona. Unidad de Química Analítica, Barcelona. 2001. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/3127> (05 de junio de 2013).
- Sultan M. 2009. New, simple and validated kinetics spectrophotometric method for determination of moxifloxacin in its pharmaceutical formulations. *Arabian J Chem* 2: 79–85.
- Trindade MA, Da Silva GM, Souza Ferreira V. 2005. Determination of moxifloxacin in tablets and human urine by square-wave adsorptive voltammetry. *Microchemical J* 81: 209–216.
- USP 38. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. NF 33. United States Pharmacopoeia. Ed. 38 Rockville: Mack Printing; 2015a. <711> Disolución. pp 520–530.
- USP 38. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. NF 33. United States Pharmacopoeia. Ed. 38 Rockville: Mack Printing; 2015b. Moxifloxacin Solución Oftálmica. pp. 4878–4880.
- USP 38. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. NF 33. United States Pharmacopoeia. Ed. 38 Rockville: Mack Printing; 2015c. <1225> Validación de Procedimientos Analíticos. pp. 1581–1587.
- Xu YH, Li D, Liu X, Li Y, Lu J. 2010. High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese. *J Chromatogr B* 878 (32): 3437–3441