

4
20j.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

**IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA
LA DETERMINACION DE ERITROMICINA
BASE Y SUS IMPUREZAS**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
MIGUEL ANGEL ALBERTO AYALA MENDEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
2.1 Generalidades de la Eritromicina	3
2.2 Cromatografía	5
2.2.1 Historia de la Cromatografía	5
2.2.2 Clasificación de la Cromatografía ..	7
2.2.3 Equipo	12
2.3 Validación de Métodos Analíticos	19
2.3.1 Especificidad	21
2.3.2 Exactitud	22
2.3.3 Precisión	22
2.3.3.1 Repetibilidad	22
2.3.3.2 Reproducibilidad	23
2.3.4 Linealidad	23
2.3.5 Sensitividad	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. OBJETIVO	30
5. HIPOTESIS	31

	Página
6. MATERIALES Y METODOS	32
6.1 Materiales	32
6.1.1 Equipo	32
6.1.2 Reactivos	33
6.2 Métodos	33
6.2.1 Preparación de Buffer de Fosfatos ...	33
6.2.2 Preparación de la fase móvil	34
6.2.3 Acondicionamiento de la columna	34
6.2.4 Preparación del Estándar de Eritromi- cina A	34
6.2.5 Preparación del Estándar de Impurezas.	35
6.2.6 Preparación de la Muestra	35
6.2.7 Determinación de la Especificidad ...	36
6.2.8 Determinación de la Exactitud	36
6.2.9 Determinación de la Precisión	37
6.2.10 Determinación de la Linealidad	37
6.2.11 Determinación de la Sensitividad	38
7. DESARROLLO	39
7.1 Consideración Previa	39
7.2 Desarrollo del Trabajo	39

	Página
8. RESULTADOS	44
8.1 Establecimiento de las Condiciones Cromato- gráficas	44
8.2 Especificidad	47
8.3 Exactitud	54
8.4 Precisión	56
8.5 Linealidad	56
8.6 Sensitividad	60
8.7 Repetibilidad y Reproducibilidad	61
9. CONCLUSIONES	65
10. RECOMENDACIONES	67
11. ANEXOS	69
12. BIBLIOGRAFIA	80

1. INTRODUCCION

El término macrólido designa a una serie de antibióticos que se caracterizan químicamente por poseer un anillo lactónico sumamente grande en su estructura. Este término involucra a una gran variedad de antibióticos, dentro de los cuales, la Eritromicina es considerada como la de mayor importancia.

Las preparaciones comerciales de Eritromicina Base, generalmente contienen una mezcla de antibióticos que son producidos por el Streptomyces Erythreus, siendo el componente de mayor actividad en dicha mezcla, la Eritromicina A.⁽¹⁾ Los demás elementos presentes en la mezcla conocida como Eritromicina Base y que inhiben, aunque en menor grado el crecimiento de un microorganismo de prueba (actividad biológica) son: La Eritromicina B, que representa el 75% de la potencia de A, y la Eritromicina C, con sólo el 39% de la misma actividad. la cuantificación de la Eritromicina, en función de su potencia, es usualmente realizada por ensayos microbiológicos.⁽²⁾ Sin embargo, existen ya algunos otros métodos para la determinación de Eritromicina, basados en la absorción por UV,⁽³⁾ por Cromatografía gas-líquido,⁽¹⁾ por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución,^(4,5) y varios más por Cromatografía en papel⁽⁶⁾ y en capa fina.^(7,8,9)

No obstante lo anterior, el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) seleccionado, permite separar a la Eritromicina A de los macrolidos B y C, así como de los precursores obtenidos en el caldo de fermentación durante el proceso de fabricación y que son conocidos como Eritronólido B (EB), 3-Micarosil Eritronólido B (MEB), Enol Eter de Eritromicina A (EEA); y los productos de degradación del mismo proceso, tales como el N-demetil de Eritromicina A y el Anhídrido de Eritromicina A (AA). Este último, obtenido después de someter a la Eritromicina bajo condiciones ácidas⁽¹⁰⁾ al momento de su extracción.

Así, el propósito de este trabajo, está encaminado a lograr la implementación y validación del método analítico por CLAR para la separación e identificación de la Eritromicina Base de sus impurezas, que permita cuantificar muestras del producto en proceso y terminado, con la ventaja de ser más rápido que los métodos desarrollados mediante el análisis microbiológico.

El análisis de la Eritromicina mediante este método, permite proporcionar resultados con mayor rapidez, dando así la oportunidad de orientar el proceso de fermentación, en el mismo momento de la producción, a diferencia de los métodos microbiológicos que necesitan aproximadamente de 36 hrs para proporcionar un resultado.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 Generalidades de la Eritromicina.

La Eritromicina, un antibiótico de amplio espectro, es el miembro más importante del grupo de los macrólidos llamados así por el gran anillo de lactona de su estructura (fig. 1), el cual es producido mediante síntesis microbiológica⁽¹¹⁾ bajo condiciones aeróbicas. Su máxima actividad antibacteriana, la presenta frente a los microorganismos denominados gram-positivos; dándose también, aunque en menor grado, cierta actividad frente a los llamados gram-negativos durante el tratamiento de infecciones en pacientes alérgicos a la penicilina.

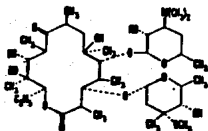


Fig. 1.- Estructura molecular de la Eritromicina A, componente que presenta la mayor actividad antimicrobiana.

La Eritromicina fue descubierta en 1952 por Mc Guire - et al en los productos metabólicos de una cepa de Streptomyces erythreus,⁽¹²⁾ hongo que se obtuvo de una muestra de sue-

lo en el Archipiélago de las Filipinas. Este macrólido en especial, ha sido ampliamente utilizado debido a su considerable Margen de Seguridad y Eficacia. Siendo la única forma biológicamente activa de la Eritromicina la comúnmente llamada base, que se absorbe bien por la parte alta del intestino delgado pero pierde su actividad en contacto con el jugo gástrico.⁽¹³⁾ Por tal motivo se han desarrollado diferentes formulaciones, incluyendo la cubierta entérica o la modificación de la estructura química por sales de Estearato, Lauril sulfato del Ester propionilo (Estolato), o Etil succinato. Estos derivados de la Eritromicina, están expresados como una equivalencia debido a la diferencia en la absorción que presentan en el organismo. Así, los esterés, son hidrolizados para producir la base libre, que es la equivalencia analítica de la Eritromicina.

La Eritromicina, una vez absorbida, se concentra en el hígado en donde se lleva a cabo su desmetilación a N-demetil-Eritromicina A.

La mayor parte, es eliminada por heces después de la excreción biliar. En orina se elimina solamente del 2 al 5% de una dosis oral, y del 12 al 15% de una dosis intravenosa. Su vida media varía de 1 a más de 3 horas en individuos normales; y en pacientes anúricos se prolonga a más de 5 hrs, sin que sea por esto necesario un ajuste en la dosis.

2.2 Cromatografía.

2.2.1 Historia de la Cromatografía: ^(14,15,16)

Al igual que en otros muchos casos, la Eritromicina es un compuesto que debido a sus propiedades tanto químicas como físicas, puede ser cuantificado por medio de la cromatografía: término aplicado de manera general a una amplia variedad de técnicas de separación basada en la partición de una muestra entre una fase en movimiento, la cual puede ser gas o líquido; y una fase estacionaria constituida por un líquido o un sólido.

La cromatografía como técnica de separación es atribuida a Tswett quien en 1903, describe su trabajo realizado sobre una columna de Carbonato de Calcio para separar los pigmentos de hojas verdes. La Cromatografía fue concebida como término, para describir las zonas de color que aparecían sobre la columna de tiza al exponer en ella, los extractos de las hojas verdes luego de ser lavada con un solvente puro. Dicho término describe fielmente lo que en ese momento observó Tswett, y que tiene como significado en raíces griegas "Escritura en color", técnica que en la actualidad no queda restringida a la separación de sustancias coloreadas.

Posterior a su descubrimiento, la cromatografía inicia un período relativamente largo durante el cual no tuvo desa

rollo alguno. Siendo hasta 1938 cuando Izmailov y Schraiber describen por primera vez a la Cromatografía en capa fina, técnica que posteriormente sería perfeccionada por Sthal en 1958.

El trabajo expuesto por Martín y Syngge en 1941 fue un ejemplo de innovación, al introducir la Cromatografía de reparto y sugerir la posibilidad de utilizar un gas como fase móvil, idea que sería consumada más adelante por el mismo Martín y James a principios de 1952.

Entre 1952 y finales de los 60's la Cromatografía de gases obtuvo una amplia sofisticación en sus técnicas analíticas, desarrollando así una gran ventaja sobre la Cromatografía de Líquidos, que era realizada en columnas de vidrio de amplios diámetros bajo condiciones esencialmente atmosféricas, lo que hacía de sus tiempos de análisis, largos y tediosos períodos de espera.

A finales de los 60's y gracias a los avances desarrollados en el campo de la instrumentación y al entusiasmo mostrado por los científicos de la época, se logró la creación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC), técnica que en la actualidad se ha preferido llamar Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

2.2.2 Clasificación de la Cromatografía. ^(14,15,16,17)

La Cromatografía como técnica de separación, puede ser dividida dependiendo de la naturaleza de la fase móvil en:

Cromatografía de Gases, y
Cromatografía de Líquidos.

Que a su vez, al tomar en consideración la naturaleza de la fase estacionaria se subdividen en técnicas específicas que poseen diferencias en su mecanismo de separación para lograr aislar, con la misma eficiencia, los diversos componentes químicos que posea alguna muestra (fig. 2).

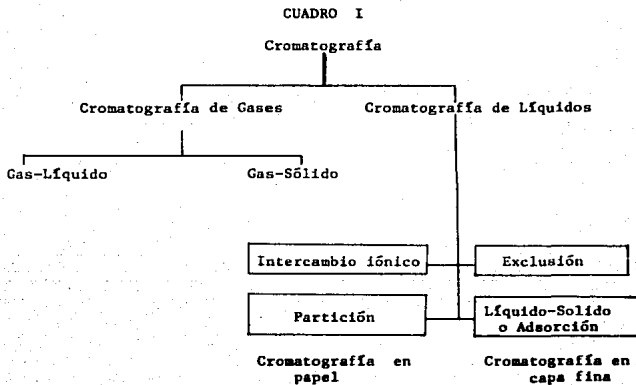


Fig. 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de Cromatografía utilizados en el análisis cuantitativo.

En este trabajo tan sólo se definen de manera breve - las técnicas por Cromatografía Líquida y los procesos de separación que cada una de ellas presenta.

2.2.2.1 Cromatografía Líquido-Sólido.

Esta técnica comúnmente llamada Cromatografía de Adsorción, depende de la interacción específica del soluto con - la superficie de la fase estacionaria compuesta de un adsorbente finamente dividido (silica gel, alumina o carbón vegetal), en la que tanto las moléculas del soluto, como las de la fase móvil compiten por los sitios activos del adsorbente.

Para esta técnica, se considera que el parámetro de mayor importancia y que gobierna la separación de las moléculas de un compuesto, es la interacción soluto-adsorbente que se genera en el interior de la columna. Dicha interacción, disminuye cuando la adsorción relativa de la fase móvil aumenta, provocando así una elución más rápida de la muestra a través de la columna.

La adsorción es una propiedad característica de ciertos grupos funcionales de los compuestos orgánicos, siendo muy útil en la separación de algunas sustancias de baja polaridad.

2.2.2.2 Cromatografía de Partición.

La distribución de un soluto entre dos disolventes inmiscibles, es en esencia el mecanismo utilizado por la Cromatografía de Partición para la separación de dos o más componentes químicos. Las múltiples extracciones que se desarrollan en el interior de la columna y, que proporcionan una mayor resolución en el momento de correr la muestra, ha permitido que esta técnica sea una de las más utilizadas en el campo analítico. Dicha técnica presenta dos mecanismos de interacción, los cuales se describen a continuación:

a. Cromatografía Líquido-Líquido: En su forma más sencilla la Cromatografía de Partición se lleva a cabo cuando un soporte inerte tiene impregnada su superficie con un disolvente de polaridad conocida (fase estacionaria), al que se le hace pasar un segundo disolvente inmiscible a él (fase móvil). Ambos se encuentran en contacto directo, lo que permite la extracción múltiple debido a la diferencia de -- afinidad y solubilidad de la muestra para cada una de las fases (Cromatografía de Reparto).

Desafortunadamente y debido al deterioro excesivo de la fase estacionaria que no se encuentra unida químicamente al soporte, así como a las dificultades de operación y a la imposibilidad de utilizar el análisis por gradiente, han disminuido considerablemente el uso de la Cromatografía Lí-

quido-Líquido (CLL) en el laboratorio.

b. Cromatografía de Fase Unida: Como alternativa a la CLL, surge una nueva técnica que posee características similares de separación además del mecanismo de adsorción.

Esta técnica se ha convertido rápidamente en la más popular de la CLAR, debido a que elimina muchos de los problemas de operación que se presentan en la CLL y esto, gracias a que la fase estacionaria se encuentra unida al soporte.

La capacidad de enlazar químicamente una amplia variedad de materiales a un soporte rígido (esencialmente aminor esteres o nitratos), permite un amplio rango de polaridades en la fase estacionaria para la separación de múltiples compuestos químicos.

Dentro de los soportes utilizados en esta técnica, se encuentran aquellos que poseen un lecho estacionario de mayor polaridad a la existente en la fase móvil. Propiedad que permite que las muestras polares queden retenidas en la fase estacionaria durante un período de tiempo mayor (Fase Normal).

Comparativamente, el proceso opuesto conocido como Cromatografía en Fase Inversa, se caracteriza por poseer un lecho estacionario de naturaleza apolar y una fase móvil - polar.

2.2.2.3 Cromatografía de Intercambio Iónico.

En la actualidad, la técnica conocida bajo este nombre es probablemente el más antiguo de los procesos de separación y purificación descubiertos por el hombre. El intercambio iónico, es un fenómeno usado para separar los componentes de una muestra que posean o que se logre hacer poseer carga iónica; tal y como lo son las sales, compuestos anfotéricos, aminoácidos y algunos otros más.

Esta técnica, presenta la ventaja de separar compuestos no iónicos, debido a que la adsorción es la interacción secundaria con la que la resina de la columna retiene a los componentes del soluto.

Hoy día el uso de la Cromatografía por intercambio iónico amplía la capacidad de la técnica, al permitir enlaces de Fase Inversa con la Cromatografía de intercambio iónico.

2.2.2.4 Cromatografía de Exclusión.

Fundamentalmente, la Cromatografía de Exclusión permite la separación de los componentes de una muestra, debido a la diferencia de tamaño y forma que presentan las moléculas del soluto. Esta técnica, que también es conocida como Cromatografía de permeación en gel, filtración en gel o exclusión estérica; relaciona a un amplio rango de materiales

de alto y bajo peso molecular con el fin de lograr, mediante la constante entrada y salida de las moléculas en el lecho poroso de la columna, la separación del soluto en sus componentes individuales, eluyendo en primera instancia aquellos cuyo diámetro efectivo sea mayor.

Esta técnica ha visto su mayor fuente de aplicación en el aislamiento de polímeros, aunque no se descarta la posibilidad de aumentar el desarrollo de métodos analíticos para moléculas de menor tamaño.

2.2.3 Equipo.

En la determinación analítica mediante la Cromatografía de Líquidos se han desarrollado una serie de instrumentos que se consideran como típicos para el uso de esta técnica (fig. 3-3a).

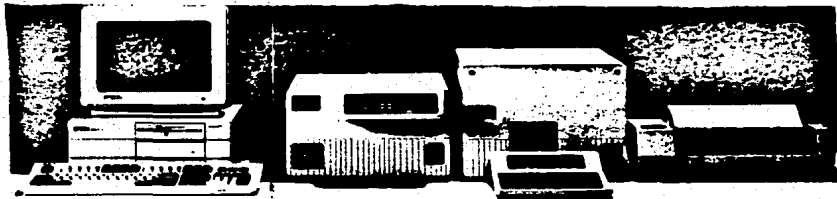


Fig. 3. Esquema del Equipo de Cromatografía de Líquidos utilizado en la validación del Método Analítico.

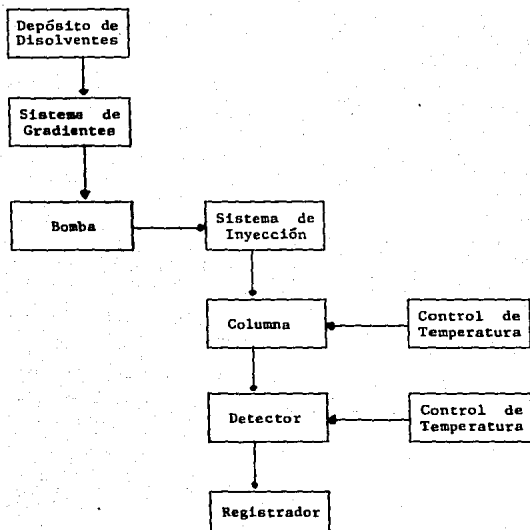


Fig. 3a. Representación esquemática de los componentes presentes en un equipo moderno de Cromatografía de Líquidos.

Equipo para Gradientes de Elución.

El sistema de elución por gradientes varía desde lo simple hasta lo complejo. El uso de dos o más solventes miscibles entre sí, y colocados en bombas distintas, es una de las herramientas que la cromatografía de líquidos utiliza -

para poder obtener una mayor eficiencia en la separación de aquellos compuestos de la muestra afines en sus propiedades y opuestos en polaridades.

Bombas para Cromatografía de Líquidos.

Una amplia variedad de sistemas de bombeo, han sido desarrollados para el uso exclusivo de la Cromatografía de Líquidos.

El sistema de bombeo se encuentra diseñado para forzar y mover al solvente, utilizado como fase móvil, a través del denso empaque que posee la columna, ya que la alta resistencia de la columna al paso del solvente obliga a ser introducido el líquido, mediante altas presiones que en algunas ocasiones sobrepasan los 1000 psi.

Existen dos tipos de sistemas de bombeo:

a) Bombas de Presión Constante: En este tipo de sistemas, se ha observado que al paso del tiempo la velocidad de flujo llega a disminuir hasta en dos tercios del valor original, sin que la presión aplicada se vea alterada.

Estos cambios en la velocidad de flujo del sistema, pueden atribuirse a la disminución en la permeabilidad de la columna, causado por dilatación o taponamiento de la misma o incluso, por cambios en la viscosidad del disolvente.

Los cambios de temperatura en el medio ambiente, así como la mezcla de solventes en el uso de un sistema por gradiente, suelen ser los factores que alteran la viscosidad de la fase móvil. Sin embargo este tipo de bombas, posee como ventajas el que no registran pulsaciones, proporcionando un flujo uniforme de solvente a través de la columna y detector a un costo generalmente menor.

b) Bombas de Desplazamiento Constante: El aumento de la presión del sistema como respuesta inmediata a la disminución en la permeabilidad de la columna, es característico en este tipo de bombas con el objeto de mantener la misma velocidad de flujo.

Si el total de la presión aplicada, no excede la capacidad máxima del instrumento, el análisis Cromatográfico no se verá afectado.

La programación de este tipo de sistemas de bombeo, es sumamente sencillo incluso para técnicas que necesiten el uso de gradientes. Sin embargo, la mayor desventaja que presenta el equipo, es su alto costo de adquisición.

Columnas para Cromatografía de Líquidos.

La columna, considerada como el corazón del sistema, consta de un tubo liso e inerte en su superficie, empacada en el interior con un material conocido como fase esta-

cionaria cuya porosidad puede ser completa o bien tan sólo superficial y de centro sólido, con un tamaño de partícula que va de 3 a 10 micras de diámetro.

Las columnas, pueden ser divididas en:

a) Analíticas: Este tipo de columnas, generalmente cuentan con medidas que van de los 2 a los 6 mm de diámetro interno, mientras que su longitud depende del tipo de empaque que contengan.

Las columnas que cuentan con empaque recubierto, poseen una longitud que oscila entre los 50 y los 100 cm, mientras que las empacadas con micropartículas porosas tienen entre 10 y 30 cm. de longitud.

b) Precolumnas: La mayoría de las veces, son columnas que poseen 6 mm de diámetro interno o más, y entre 25 y 100 cm. de longitud.

Las columnas, son invariablemente elaboradas de acero inoxidable y utilizadas a temperatura ambiente. No obstante lo anterior, el uso de estas mismas columnas en baños a temperaturas elevadas, han dado, magníficos resultados en el desarrollo de métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos,⁽²⁷⁾ Intercambio Iónico y Exclusión.

El material de empaque dependerá del tipo de muestra que desee ser analizada.

Inyectores:

La muestra debe ser introducida en la cabeza de la columna, procurando la mayor homogeneidad, tanto en la inserción de la muestra, como en el empaque de la columna.

Existen dos tipos de inyección:

a) Flujo Detenido: La inyección se realiza a presión atmosférica, el sistema se cierra y el flujo es detenido. - Así este método es utilizado sin que la resolución del análisis se vea afectado, ya que la difusión en líquidos es pe queña.

b) Flujo Continuo: La inyección de la muestra se realiza sin que se detenga el flujo de la fase móvil.

El uso de aditamentos denominados loops, permiten la inyección automática de volúmenes mayores a 10 microlitros. Cuando la válvula es colocada en la posición del loop, la muestra es introducida directamente a la columna.

Detectores:

Cada compuesto que eluye de la columna es cuantificado, ya sea mediante el uso de un detector universal o selectivo, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir.

Un buen detector proporciona una alta sensibilidad, bajo ruido, amplio rango de linealidad en la determinación -

y respuesta para todo tipo de compuestos. También, es deseable en este tipo de instrumentos una baja sensibilidad por efecto de variaciones en el flujo y temperatura del sistema, pero no siempre es posible.

La popularidad de los detectores de longitud de onda variable, se ha incrementado considerablemente, debido a que pueden ser utilizados en la detección, un amplio número de compuestos.

Los detectores de índice de refracción, son también ampliamente utilizados, principalmente en la Cromatografía de exclusión, pero es menos sensible que el UV. Algunos otros detectores, como los de ionización de flama y flouométricos son también utilizados pero en casos específicos.

2.3 Validación de Métodos Analíticos.

El perfil de calidad de un producto, definido por sus atributos de calidad o especificaciones, se establece durante la fase de desarrollo. A la consecución del perfil de calidad se contribuye con la validación de los métodos, sistemas y tecnologías que intervienen en el proceso de fabricación y control.

Cuando se habla de validación es frecuente emplear los términos validación y calificación de forma indistinta. Sin embargo, conceptualmente son diferentes puesto que calificar es dotar de características o cualidades, en tanto que validación es comprobar y certificar que un método, sistema o proceso cumple aquello para lo cual está calificado. Del propio concepto de validar se deduce que la calificación es un requisito incurso en la propia validación.

Todos los fabricantes han llegado a entender que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos, procesos y productos deben ser analizados y controlados para garantizar la calidad del mismo.

Lo mismo es válido para el aseguramiento de la calidad del laboratorio, en donde los métodos analíticos y procedimientos constituyen el proceso que debe ser controlado para garantizar la validez de los resultados. En otras palabras, los métodos analíticos deben ser validados para garan

tizar la aceptabilidad y utilidad de los resultados en el laboratorio.

La validación de un procedimiento analítico es el proceso de determinar la adaptabilidad del sistema a una cierta metodología que pueda proporcionar datos analíticos útiles.

El objetivo final de una metodología analítica, es el de producir suficiente información acerca de la composición específica de muestras, para resolver problemas particulares.

Son los requisitos del fabricante los que determinan el tipo particular de datos para los cuales se seleccionará uno o varios métodos analíticos que posteriormente deberán ser validados. Es por esto que el concepto validación debe ser definido como un proceso sistemático para obtener y analizar suficientes datos, que proporcionen una garantía razonable, basados en un juicio científico, de que un método de laboratorio proporcionará resultados aceptables cuando se realizan en la forma descrita, en términos de parámetros analíticos.

La validación de métodos,^(18,19) es una medida del comportamiento y efectividad de un sistema analítico total.

Las secciones 211.165(e) y 211.194(a) de las Buenas - Prácticas de Manufactura (BPM's) para la validación de mét

dos, especifican que los métodos adoptados durante el desarrollo de un producto, deben ser verificados bajo las actuales condiciones de uso y que cualquier variación posterior debe someterse a un proceso similar.

La validación generalmente incluye una evaluación de la Especificidad, Exactitud, Precisión y Linealidad, que proporcione una medida del comportamiento del método.

2.3.1 Especificidad.

Idealmente, significa que un compuesto analizado está libre de toda interferencia por cualquier material conocido. Los datos obtenidos deben poder demostrar la ausencia de interferencia de otros componentes en la muestra, tales como excipientes, activos, precursores, preservativos y colorantes.

Si se conoce que existe una potencial interferencia por algún componente:

- 1) Deben de establecerse límites a las condiciones más relevantes del análisis a fin de garantizar que la interferencia estará ausente.

- 2) Incluir una prueba de capacidad del sistema (SUITABILITY) en el método para uso rutinario.

2.3.2 Exactitud.

La exactitud de un método puede variar a lo largo de un amplio rango de concentraciones. Esto significa que la exactitud es determinada a lo largo de ese rango que puede variar desde el 80% del más bajo nivel esperado, hasta 120% del valor mayor. Siendo así la exactitud una medida de la dispersión de los datos con respecto a un valor real.

2.3.3 Precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea del producto. Generalmente la desviación estándar (σ) o el coeficiente de variación (C.V.), son los términos en los que se expresa dicho parámetro.

La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

2.3.3.1 Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando el mismo equipo y técnicas.

2.3.3.2 Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en distintos días, en el mismo o diferente laboratorio, utilizando el mismo o diferente equipo.

2.3.4 Linealidad.

Es definida como la variación en la cantidad recuperada de un principio activo por el análisis, como una función de la cantidad de principio activo en la muestra dentro de un rango* determinado.

2.3.5 Sensitividad.

En un análisis de impurezas o pruebas límite, la sensibilidad debe ser determinada adicionando cantidades pequeñas del estándar de la impureza a la muestra o al placebo, a fin de estimar la mínima cantidad o concentración del material que puede ser detectado o determinado cuantitativamente por el método. Es recomendable realizar las adiciones del estándar a tres o más niveles, a fin de poder extrapolar y distinguir entre los niveles actuales de detección y las impurezas inherentes en las muestras.

* Rango: Intervalo de concentración en el que el método es exacto, preciso y lineal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la constante evolución que los procedimientos analíticos han experimentado, y a la necesidad de obtener medicamentos de mayor calidad, actividad y seguridad terapéutica los profesionales de la industria farmacéutica, y - específicamente aquellos encargados de la calidad, se ven - en la necesidad de manejar instrumentos que proporcionen - una alta seguridad en el análisis cuantitativo y cualitativo de los medicamentos.

En el caso concreto de los productos elaborados mediante procesos de fermentación (generalmente con duración de - dos a quince días), es de vital importancia conocer la calidad de aquello que se está produciendo, de ser posible, el mismo día en que se muestrea. Tales exigencias, son difíciles de lograr con los métodos analíticos tradicionales hasta ahora empleados; ya que dependen del desarrollo e inhibición del crecimiento de microorganismos específicos para la determinación de la potencia biológica del antibiótico, por tal motivo, se necesitan por lo menos de dieciocho horas para obtener resultados en el análisis.

Por tal motivo, la validación e implementación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, que distinga y cuantifique a la Eritromicina A de sus impurezas, no sólo reducirá el tiempo de análisis para

su cuantificación, si no también dicho método: permitirá conocer las condiciones de proceso óptimas para lograr mayores rendimientos en el proceso de fabricación.

En el caso específico para la cuantificación de la Eritromicina Base y sus impurezas durante la fermentación, la ayuda proporcionada por el método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, redunda en:

- El conocimiento oportuno de alguna posible desviación en el metabolismo celular.

- Actuación de manera efectiva para solucionar la falta de potencialidad metabólica que el microorganismo posea.

- Retroalimentación del conocimiento general del proceso fermentativo.

- Y por último, relacionar subproductos no deseados con los parámetros de la fermentación.

Los parámetros físico-químicos que pueden ser manipulados para lograr mayores rendimientos, en la producción de Eritromicina Base durante el proceso, son:

- Relación volumen de aire - volumen de medio.

- Velocidad superficial y flujo del aire.

- Fuerza de aereación en el caldo de fermentación.

- Tiempo de residencia del aire en el caldo de fermentación.

- pH.
- Temperatura y presión en el fermentador.
- Impulsores y su distribución en el tanque de fermentación (patrón de flujo).
- Oxígeno disuelto.
- Cantidad de Nitrógeno, Carbohidratos y demás fuentes de nutrientes.
- Reología del medio de fermentación.

Cada uno de los factores físico-químicos antes mencionados, pueden contribuir de manera proporcional y directa en el rendimiento productivo de la Eritromicina Base, ya que a diferentes niveles y desde la unión de las primeras cadenas de la estructura química, influyen en la formación de la Eritromicina A bajo la secuencia de enlace representada en la figura 4.

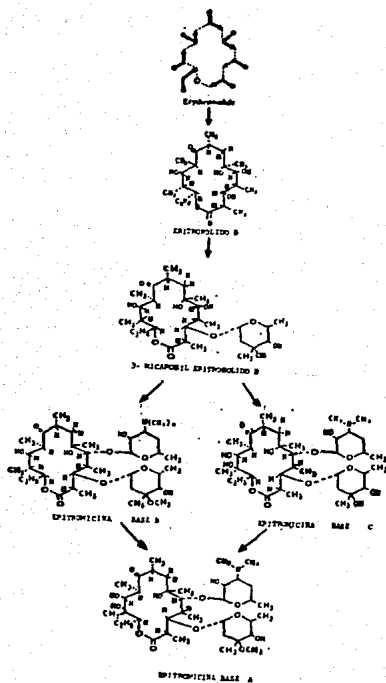


Fig. 4. Secuencia de la Biosíntesis de la Eritromicina, a partir de la unión de los grupos propilo proporcionados por el aceite de soya, hasta la formación completa del compuesto activo llamado Eritromicina Base A.

De esta forma, la identificación y cuantificación de la Eritromicina Base de sus impurezas, mediante un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el problema fundamental que se presenta en este trabajo. Ya que de el desarrollo de un método que cuente con las características de ser específico, lineal, preciso, exacto y por añadidura rápido, dependerán los beneficios que de sus análisis se puedan obtener, tal y como es el hecho de lograr un mayor rendimiento en la producción de Eritromicina Base, a partir de la adecuada orientación del proceso fermentativo (fig. 5). así como por la manipulación de los parámetros físico-químicos que afectan el proceso en sus diferentes etapas.

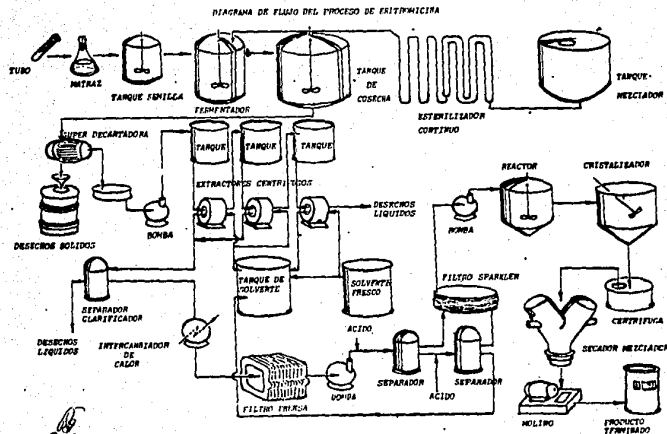


Fig. 5. Diagrama de Flujo del proceso de Producción de la Eritromicina Base, desarrollado en la Planta de Fermentación y Extracción de Abbott-Tlaxcala.

4. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo, es el de desarrollar un método analítico con las características de ser específico, lineal, exacto, preciso y reproducible, para asegurar que es un método válido en la cuantificación de la Eritromicina Base y sus impurezas.

5. HIPOTESIS

Al término de este trabajo, existirá un método analítico con las características de ser específico, lineal, preciso y exacto que será capaz de determinar cuantitativa y cualitativamente a la Eritromicina Base y sus impurezas.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales.

6.1.1 Equipo.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Perkin Elmer. Modelo Serie 10.
- Detector Espectofotométrico LC-95 UV/visible, modelo Perkin-Elmer.
- Estación de Datos Perkin-Elmer 3700.
- Terminal de Inteligencia Cromatográfica Perkin-Elmer.
- Impresora de Datos Perkin-Elmer 660.
- Bomba para Cromatografía de Líquidos Serie 10.
- Columna Microbondapack C-18 (Watters Cat. No. 2734).
- Muestreador automático Perkin-Elmer LC-600.
- Membranas de Policarbonato de 0.45 micras de diámetro Milipore o equivalente.
- Material de Vidrio.
- Magnestir.
- Equipo de Ultrasonido.
- Equipo de Filtración Milipore.
- Potenciómetro.

6.1.2 Reactivos.

Acido Fosfórico 0.1N	Merck
Acetonitrilo grado HPLC	Merck
Buffer Estándar pH=7 y 4	Merck
Estándar de Eritromicina A	Abbott Tlaxcala
Estándares de Impurezas	Abbott North Chicago
Fosfato de Potasio Monobásico	Merck
Hidróxido de Potasio 0.1N	Merck
Trietilamina	Merck

6.2 Métodos.

6.2.1 Preparación de Buffer de Fosfatos.

Pesar 3.4 g \pm 5% de Fosfato de Potasio (monobásico) y disolverlo en un matraz aforado de 1 litro que contenga aproximadamente 800 ml de agua destilada. Pipetear en la campana 2.0 ml de Trietilamina (ALTAMENTE TOXICO) y disolver en la misma mezcla. Ajustar a pH 7 con ácido Fosfórico 0.1N o con Hidróxido de Potasio 0.1N y aforar al volumen.*

* Para la preparación de la fase móvil utilizada en el acondicionamiento de la columna, se añade un exceso de 4 ml de Trietilamina posterior al aforo.

6.2.2 Preparación de la fase móvil.

Mezclar volúmenes de 55%-45% de Acetonitrilo y Buffer de fosfatos pH7 en una probeta de 2 litros de capacidad, transferir a un matraz kitazato, a través de un sistema de filtración, provisto de una membrana de policarbonato de 0.45 mcs, degasificar y permitir que la mezcla llegue a temperatura ambiente. La proporción de Acetonitrilo y Buffer de fosfatos puede variar de acuerdo a los requerimientos que el sistema y el método exija en el momento de la elución.

6.2.3. Acondicionamiento de la columna.

Hacer pasar a través de la columna, la fase de acondicionado a un flujo de 1.5 ml/min. durante 18 horas.

6.2.4. Preparación del Estándar de Eritromicina A.

Pesar con exactitud aproximadamente 250 mg del Estándar de referencia de Eritromicina Base anhidra, en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver en Acetonitrilo con la ayuda de un baño de ultrasonido, llevar al aforo con Acetonitrilo y mezclar. Este estándar debe ser preparado por duplicado y guardado en refrigeración por un tiempo no mayor a un mes.

6.2.5 Preparación del Estándar de Impurezas.

Pesar con exactitud aproximadamente 10.0 mg de cada uno de los estándares de referencia de Eritronólido B, 3-Micarosil-Eritronólido B, Eritromicina C, Anhidro de Eritromicina A, Eritromicina B, Enol-Eter de Eritromicina A, y 250 mg de Eritromicina Base anhidra en un matraz aforado de 50 ml. Di solver en Acetonitrilo con la ayuda de un baño de ultrasonido, diluir con Acetonitrilo hasta el aforo y mezclar. Esta solución puede ser guardada en refrigeración por un mes, si es dividida en pequeñas alicuotas para su uso.

6.2.6 Preparación de la Muestra.

Pesar 250 mg de Eritromicina Base en un matraz volumétrico de 50 ml de capacidad, disolver en Acetonitrilo con la ayuda de un baño de ultrasonido, diluir al volumen con Acetonitrilo y mezclar.

Condiciones de Operación Cromatográficas.

Tiempo de Análisis	27 min.
Flujo	1.5 ml/min.
Detector U.V.	195 nm.
Rango de detección	0.02 AUF's
Velocidad de respuesta del detector	2000 mc seg.

Volumen de Inyección

20 mcl.

6.2.7 Determinación de la Especificidad.

Inyectar, de manera independiente, bajo las mismas condiciones de Operación y análisis, una muestra de Acetonitrilo puro y Estándar de Impurezas.

Criterio: No debe existir interferencias entre solvente y estándares.

6.2.8 Determinación de la Exactitud.

Hacer seis diferentes pesadas, del equivalente al 100% de la concentración de Eritromicina Base en el mismo número de matraces volumétricos de 50 ml de capacidad, disolver en Acetonitrilo con la ayuda de un baño de ultrasonido, diluir al volumen con Acetonitrilo y mezclar. Inyectar de manera independiente cada una de las muestras, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, mediante la ayuda del automuestreador LC-600 Perkin-Elmer.

Criterio: $t_{calc.} < t_{tabl.}$

6.2.9 Determinación de la Precisión.

Preparar en dos diferentes días y por dos analistas - distintos. (Reproducibilidad, Repetibilidad) una muestra homogénea de Eritromicina Base. Inyectar por triplicado cada una de las muestras, bajo las mismas condiciones de operación.

Criterio: χ^2 calc. \leq χ^2 tabl.

6.2.10 Determinación de Linealidad.

Pesar el equivalente al 20%, 50%, 90%, 100%, 110% y 120% de Eritromicina Base en un matraz volumétrico de 50 ml de capacidad, para cada concentración. Disolver en Acetonitrilo con la ayuda de un baño de ultrasonido, diluir al volumen con el mismo solvente y mezclar.

Hacer el análisis por triplicado para cada concentración bajo las mismas condiciones de operación.

Criterios: La relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de la muestra, se encuentra representada por los siguientes parámetros:

$$m = 1; b = 0$$

$$r^2 = 0.98$$

$$\% \text{ Recuperado} = 100\%$$

6.2.11 Determinación de la Sensitividad.

Se determinará mediante la ayuda del análisis estadístico.

Para la realización del análisis, se deben colocar, en diferentes viales de vidrio con capacidad aproximada de 1.5 ml y con la ayuda de una pipeta Pasteur, las soluciones estándares y muestras en el carrusel del automuestreador en el siguiente orden.

Estándar de Eritromicina A₁, Estándar de Eritromicina A₂ (preparados por separado), Estándar de Impurezas y de una a cinco muestras con el objeto de calcular la Confiabilidad y Resolución del sistema en el momento del análisis (Ver anexo 1). El cálculo de estos parámetros nos indicarán si las condiciones del Cromatógrafo son adecuados para la realización del análisis.

7. DESARROLLO

7.1 Consideración Previa.

7.1.1 Elección de la Columna.

Cuando se trata de seleccionar el material de empaque que debe contener una columna para intentar realizar la separación de los compuestos en una muestra, es de mucha ayuda el conocer la estructura química de los solutos. De tal forma que si moléculas parecidas o de la misma clase han si do ya separadas, este sistema puede ser tomado como punto de partida.

En caso de no tener información alguna, el conocer la fórmula molecular, grupos funcionales (ácidos o básicos), la solubilidad en agua o en solventes orgánicos, así como la presencia de impurezas e información de separaciones en capa fina, permiten elegir el tipo de material de empaques que la columna debe poseer.

Para el caso de la Eritromicina Base, el uso de una co lumna Microbondapak C-18, es considerada como la más adecua da, debido a estudios preeliminares realizados por Abbott Laboratories de North Chicago,⁽²⁰⁾ basados en las caracterís ticas físico-químicas que el macrólido presenta.

La selección de este tipo de columnas, que tiene la pro

piedad de ser de fase inversa, inicia al considerar la solubilidad de la muestra en diferentes tipos de fase móvil, - además de la obtención de una adecuada eficiencia, selectividad y capacidad al inicio de la separación.

La mayoría de los componentes separados por fase inversa, al igual que la Eritromicina, son solubles en mezclas acuosas/orgánicas constituidas en la fase móvil, siendo una función de la polaridad, de la solubilidad y de la carga del compuesto, la selección particular de la fase Estacionaria.

7.1.2 Acondicionado de la Columna.

Para la separación de la Eritromicina, será necesario someter a un proceso de acondicionado a la columna; dicho proceso consiste en dejar pasar a través de la columna durante 18 hrs y a bajo flujo la fase móvil de acondicionamiento - (exceso de Trietilamina).

El objeto de esta actividad, es debida a que se ha encontrado una mayor retención hacia el soluto, por parte del grupo silanol de la fase estacionaria (fig. 6), al ser activada por la Trietilamina durante el proceso de acondicionamiento y siendo reconstituida continuamente al colocar Trietilamina como componente del Buffer de la fase móvil (Ver preparación Buffer de Fosfatos).

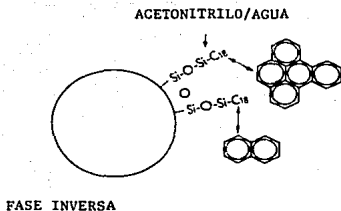


Fig. 6. Empaques no polares son utilizados para la separación de componente que contiene grupos funcionales de tipo polar.

7.2 Desarrollo del Trabajo.

En primera instancia y dentro de la secuencia a seguir para la implementación y validación del método analítico en la determinación de Eritromicina Base y sus impurezas, se realizó una investigación bibliográfica exhaustiva, así como el estudio de los proyectos de la División CAPD de Abbott Laboratories de North Chicago, números 63-758-62; 40-294-62 y 36-223-62.

Posteriormente se procedió a preparar una fase de acondicionado cuya concentración fue de 50%-50% Buffer de Fosfatos pH 7-Acetonitrilo, con el fin de activar a la columna.

Una vez acondicionado la columna, se prepararon los estándares de Eritromicina A e Impurezas (Ver preparación de Estándares), para detectar los picos en el Cromatograma.

Después de una serie de inyecciones del estándar de impurezas y con el uso de una fase móvil normal (50%-50% Buffer de Fosfatos-Acetonitrilo), se logró identificar cada uno de los picos registrados, mediante la comparación de los tiempos de retención relativos que fueron proporcionados por Abbott Laboratories, y que son considerados como parámetros de identificación basados en el registro de Ery A, que es el componente de mayor concentración en la muestra y el de mayor altura en el Cromatograma.

El siguiente paso, fue el intentar separar adecuadamente cada uno de los ocho picos presentes en el estándar de impurezas, modificando la concentración y la velocidad de flujo de la fase móvil.

La determinación de la duplicidad en el sistema, fue el siguiente parámetro a controlar, obteniéndose mediante la inyección consecutiva de los estándares uno y dos de la Eritromicina A, preparados de manera independiente.

Por último y después de lograr la implementación del método analítico y la de los parámetros de elución, se procedió a realizar la validación, al someter el método a la determinación de la especificidad, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad y sensibilidad mediante la inyección de los estándares y muestras desti-

nadas a este fin.

Fue necesario repetir el estudio de validación al encontrar que el rango de concentración para tener un método lineal, es menor al considerado al principio del estudio.

8. RESULTADOS

A pesar de que el número de investigaciones cromatográficas sobre la Eritromicina son abundantes en la literatura, el trabajo aquí desarrollado nos permite concretar principalmente la implementación y validación de un método analítico que es capaz de detectar impurezas de la Eritromicina A (Precusores y Productos de degradación), en una muestra de producto en proceso y terminado.

8.1 Establecimiento de las condiciones cromatográficas.

La concentración de Acetonitrilo y del Buffer de Fosfato a pH neutro contenida en la fase móvil, afecta la resolución y el volumen de elución de los picos que presenta la muestra de Eritromicina Base.

Como se observa en las figs. 7 y 8, el incremento de la concentración de Acetonitrilo, disminuye el volumen de elución y la resolución de los picos de la Eritromicina A y de C, considerados ambos picos, como críticos en el desarrollo de este método.

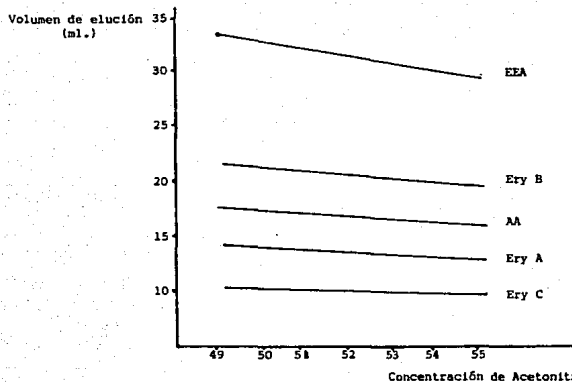


Fig. 7. Efecto de la concentración de Acetonitrilo en la fase móvil, sobre el volumen de elución de algunos componentes de la muestra.

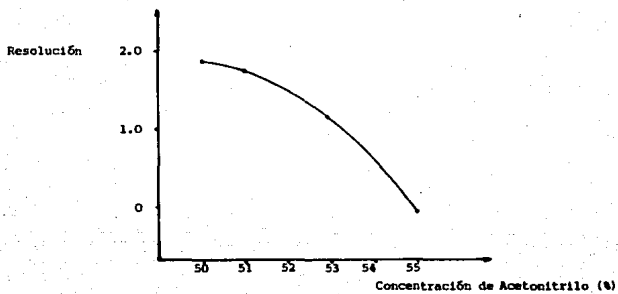


Fig. 8. Efecto de la concentración de Acetonitrilo en la resolución de Eritromicina C y A.

La concentración 45% Acetonitrilo, 55% Buffer de Fosfatos en la fase móvil, fue considerada como óptima para la separación de los picos (Resolución 1.2), así como la más adecuada para lograr un tiempo de elución total razonable.

De la misma manera y como se indica en el anexo 1, la confiabilidad del sistema se mantuvo entre 0.98 y 1.02. Valores óptimos para considerar una buena confiabilidad en el sistema.

No obstante lo anterior, es indispensable hacer notar que en cada serie de cinco muestras, la inyección y registro del estándar de impurezas permitirá discernir si se ajusta o no la fase móvil.

El uso de una fase móvil con características de neutralidad, proporciona ventajas en cuanto a la estabilidad de la muestra, debido a que la Eritromicina se ve afectada por este parámetro degradándose principalmente a Enol Eter cuando se encuentra en solución de bajo pH y en Anhídrido Eritromicina a pH alto.⁽⁴⁾

8.2 Especificidad.

Cada uno de los compuestos utilizados en la preparación del estándar de impurezas (con excepción del Estándar de Ery A), fue proporcionado en forma pura por Abbott Laboratories de North Chicago.

De esta manera, la identificación de los picos separados, se logró al relacionar los tiempos de retención obtenidos en el análisis cromatográfico de dicho estándar de impurezas fig. 9, contra la retención relativa indica en orden de elución en la tabla 1, para los mismos compuestos.

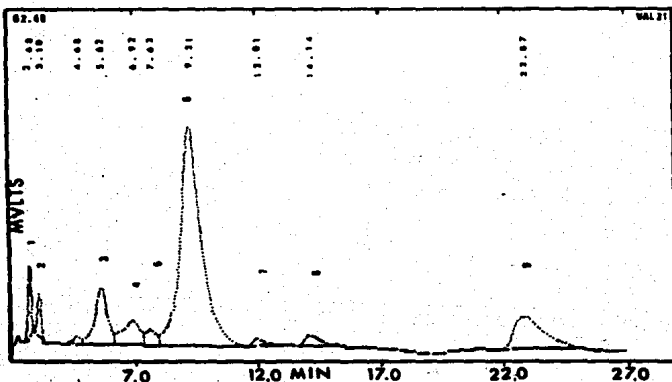


Fig. 9. Cromatograma por CLAR en fase inversa, del estándar de Ery A (6) e impurezas, - mostrando la separación del Eritronólido B (1), 3-Micarosil Eritronólido B (2), Trietilamina (3) Ery C (4), N-dimetil Ery A (5); Anhídrido de Ery A (7); Ery B (8); Enol-Eter de Ery A (9).

TABLA I COMPARATIVA DE TIEMPOS DE RETENCION Y RETENCION RELATIVA DE LA ERITROMICINA Y SUS IMPUREZAS.

Compuesto		Retención Relativa	Tiempos de Retención (min.)
1.- Eritronólido B	(EB)	0.3	2.68
2.- 3-Micarosil Eritronólido B	(MEB)	0.4	3.10
3.- Trietilamina	(TEA)	0.5	5.62
4.- Eritromicina C	(Ery C)	0.7	6.92
5.- N-Demetil Eritromicina A	(DEA)	0.8	7.63
6.- Eritromicina A	(Ery A)	1.0	9.21
7.- Anhidro Eritromicina A	(AA)	1.4	12.01
8.- Eritromicina B	(Ery B)	1.6	14.14
9.- Enol Eter de Eritromicina A (EEA)		2.9	22.87

Comparativamente y con la ayuda en la proporción guardada de los tiempos de retención, el análisis de la muestra de Eritromicina Base fig. 10, nos permite observar que existe una pequeña porción de Eritromicina C. B y N-demetil de Eritromicina A, que no pueden ser aislados selectivamente en el proceso de extracción al que la muestra es sometida en el proceso de fabricación.

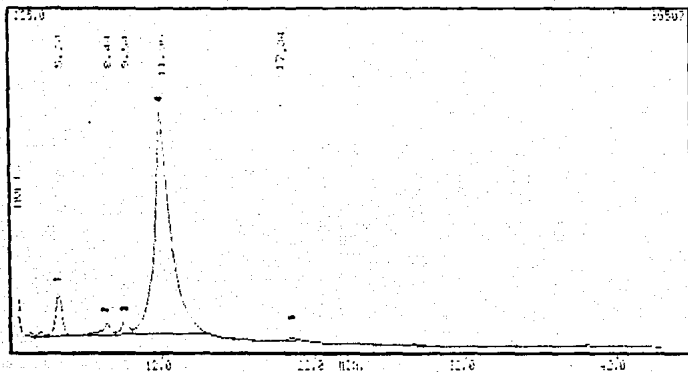


Fig. 10. Cromatograma por CLAR en fase inversa, de la muestra de Eritromicina Base que muestra la separación de Trietilamina (1); Eritrosicina C (2); N-demetil; Eritrosicina A (3); Eritrosicina A (4); Eritrosicina B (5).

Sin embargo, la inyección y análisis del placebo (Acetonitrilo puro) fig. 11, nos permite deducir en base a los tiempos de retención, que no existe interferencia por el pico detectado de Trietilamina, elemento que se encuentra pre presente en la fase móvil para mantener a la columna en condiciones óptimas de análisis, ni tampoco existe interferencia por algún otro compuesto presente en el sistema de elución, o incluso en la muestra misma.

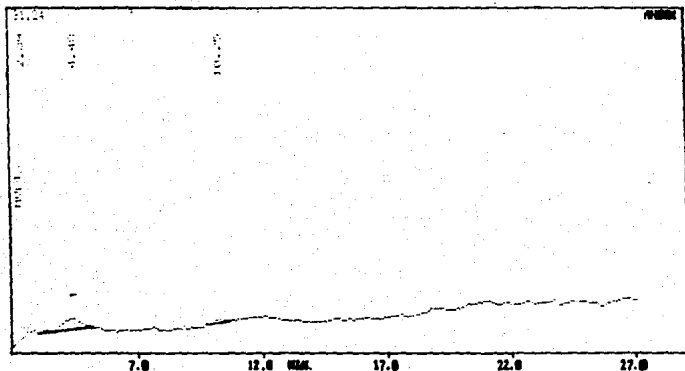


Fig. 11. Cromatograma por CLAR en fase inversa, de la inyección de Acetonitrilo puro (placebo) para la determinación de posibles compuestos que interfieren con el análisis de la muestra. Trietilamina (1).

Algunas de las ventajas que presenta una terminal de Inteligencia Cromatográfica utilizada, para facilidad en el trabajo del analista, es el de permitir comparar en una misma pantalla los cromatogramas realizados, tal y como se muestra en las figs. 12 y 13.

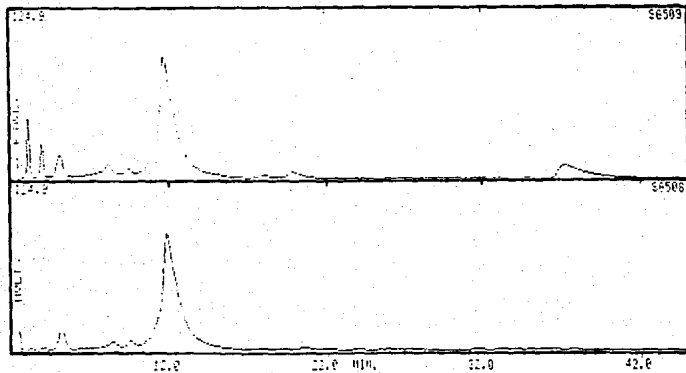


Fig. 12. Cromatogramas por CLAR en fase inversa, Estándar de Impurezas (SG 509), Estándar de Eritromicina A2 (SG 508).

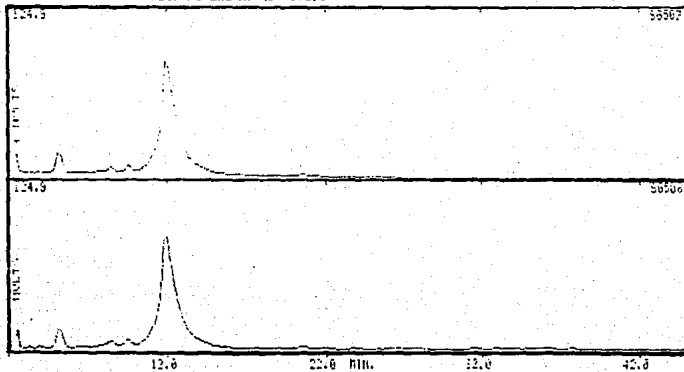


Fig. 13. Cromatogramas por CLAR en fase inversa, Estándar de Ery A1 (SG 507) y Estándar de Ery A2 (SG 508).

Aunado a cada uno de estos cromatogramas, se obtiene un reporte analítico de los parámetros más importantes por identificar. A continuación se presenta uno de los reportes cromatográficos obtenido durante la validación del método analítico. Fig. 14.

***** PARAMETROS DEL METODO *****

METODO BASES: ANALISIS ERY. BASE
GRAFICA: SG507

MUESTRA: ANALISIS DE ERITROMICINA BASE
INYECCION NUMERO: 07

CORRIDA A: 19:43 ON: 87-08-33 INTERFACE NO: 1A

TIEMPO DE INICIO : 2.3
TIEMPO FINAL : 45.0
UMBRAL DE DETECCION : 10.00
ANCHURA MINIMA DE DETECCION : 11.0
UMBRAL DE AREA RECHAZADA : 500.0

***** PORCENTAJE AREA/ALTURA *****

PICO NO.	TIEMPO DE RETENCION		AREA DEL PICO	AREA %	ALTURA DEL PICO	ALTURA %
1	2.60	1	5018	0.711	873	7.279
2	3.33	1	2694	0.381	163	1.358
3	4.13	2	4931	0.698	149	1.247
4	5.23	3	44284	6.272	1484	12.378
7	8.43	2	15050	2.131	410	3.419
8	9.53	2	16912	2.395	509	4.247
9	11.90	5	607202	85.993	8080	67.410
11	17.30	1	770	0.109	15	0.122
13	20.43	1	3560	0.504	107	0.895
17	25.83	1	1182	0.167	33	0.277
19	28.17	2	568	0.080	36	0.300
20	28.40	2	1781	0.252	46	0.384
25	33.77	1	510	0.072	23	0.190
26	34.90	2	724	0.103	24	0.199
27	35.50	5	921	0.130	35	0.295

15 PICOS: AREA TOTAL: 706107
ALTURA TOTAL: 11987

Fig. 14. Reporte de los parámetros identificados, en el análisis de una muestra de Eritromicina Base.

En el análisis de una muestra, es necesario alimentar a la terminal de inteligencia con las variables necesarias que permitan cuantificar los picos presentes en el cromatograma. A este proceso se le conoce como elaboración del Método en la interfase de la computadora. El método utilizado en la validación es el que a continuación se presenta en la fig. 15.

```

***** METODO BASES *****
ANALISIS ERY. BASE

DATO ADQUISICION DE PARAMETROS
INTERFACE NUMERO -----1
DATO CANAL -----A
DATO TIEMPO DE INICIO MINS. -----2.3
DATO TIEMPO FINAL MINS. -----27.0
UMBRAL DE DETECCION DE PICOS -----10.00
ANCHURA DE PICO EN SEGUNDOS -----11.0
DESPLIEGUE Y ALMACENAJE DE DATOS DURANTE LA CORRIDA ---Y
CRONOMETRAJE TABLA DE EVENTOS REQUERIDOS -----Y
MAS PAGINAS PARA EL PROCESO DE DATOS -----N
CALCULO DE PARAMETROS
CALIBRACION POR AREA/ALTURA
FACTOR DE SUPERFICIE -----A
UNIDADES DE CONCENTRACION -----5
GENERACION DEL REPORTE
POR CIENTO AREA/ALTURA -----Y
POR CIENTO NORMALIZADO -----N
ESTANDAR EXTERNO -----N
ESTANDAR INTERNO -----N
REPORTE AGRUPADO -----N

VENTANA DE TIEMPOS DE RETENCION
PORCENTAJE -----5
SERALADOS -----5

EVENTO NO.      TIEMPO      CODIGO DEL EVENTO
-----
1              0.10       2
2              0.20       10
3              17.00      17
4              22.00      19
5              27.00      17

```

Fig. 15. Método Bases: Método utilizado para la interfase de la terminal de inteligencia (Perkin-Elmer) en la cuantificación cromatográfica de Eritromicina Base.

DATOS SALVADOS

ARCHIVO DE GRAFICAS -----	Y
ARCHIVO DE REPORTES -----	N
IMPRESION DE GRAFICAS -----	Y
NUMERO DE CORRIDAS	2
CANAL A	
PROTECCION COMPLETA DE LA ESCALA mv -----	1000
RECHAZO DE AREA -----	500
PREFIJO DEL REPORTE -----	AS101
IMPRESION DE LA GRAFICA MIN/PAGINA -----	40
FACTOR DE LA ESCALA VERTICAL -----	16

8.3 Exactitud.

La altura de los picos de la Eritromicina A, B y C, fueron utilizados para calcular la potencia bioequivalente, de las muestras (Ver anexo 1).

El objeto del cálculo de dicha potencia, se debe a la necesidad de conocer en la muestra, el valor de la actividad microbiológica y la proporción con la que participa cada uno de los componentes. De esta manera y relacionando la potencia bioequivalente adicionada con la potencia bioequivalente recuperada, se generan los datos reportados en la tabla II y, que permiten evaluar la exactitud del método, al plantear la siguiente hipótesis (fórmulas de cálculo anexo 2).

$$H_0 \mu = 100\%$$

$$H_a \mu \neq 100\%$$

Utilizando como estadígrafo de contraste la prueba "t" de student, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ y 17 - grados de libertad, se obtuvo que: t tablas = 2.1098

$$t \text{ calc} = 0.73$$

$$\therefore t \text{ calc} < t \text{ tabs}$$

Debido a que t de tablas fue mayor a la de cálculo: Se considera al método, exacto dentro de un límite de confianza para un conjunto de muestras de un estudio similar, que va del 101.56 al 99.24%.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos de la relación de potencia bioequivalente adicionada, entre la potencia bioequivalente recuperada por 100, para el cálculo de la Exactitud, Precisión y Linealidad del método analítico.

TABLA II RESULTADOS DEL % DE RECUBRO DE UN ANALISTA EN UN MISMO DIA.

% ANADIDO	% ENCONTRADO	% RECUPERACION
20.0%	20.6%	103.2%
20.0%	20.4%	101.8%
20.0%	20.9%	104.5%
50.0%	51.9%	103.8%
50.0%	49.8%	99.6%
50.0%	50.4%	100.8%
90.0%	89.1%	99.0%
90.0%	91.0%	101.1%
90.0%	87.1%	96.8%
100.0%	100.0%	100.0%
100.0%	96.7%	96.7%
100.0%	98.8%	98.8%
110.0%	111.85	101.6%
110.0%	108.1%	98.3%
110.0%	106.7%	97.0%
120.0%	122.6%	102.2%
120.0%	121.6%	101.3%
120.0%	119.8%	99.8%

8.4 Precisión.

La precisión del método se evaluó a través de χ^2 : planteando la siguiente hipótesis de trabajo:

$$H_0 \leq 3\%$$

$$H_a > 3\%$$

Considerando a χ^2 : como estadígrafo de contraste con un $\alpha = 0.05$ como nivel de significancia y 17 g.l., se obtuvo que:

$$\chi^2; \text{ tabs} = 27.59$$

$$\chi^2; \text{ calc} = 10.25$$

$$\therefore \chi^2 \text{ calc} < \chi^2 \text{ tabs.}$$

Por lo anterior, se considera al método preciso dentro de un rango de variación que va desde 1.75 a 3.49, como promedio máximo de la desviación estándar (σ).

8.5 Linealidad.

Al inicio del estudio, se manejó un rango de concentración de principio activo, del 20% al 200% para el cálculo de la linealidad, fig. 16. Sin embargo, los resultados permitieron dilucidar que el método es lineal en un rango de concentración menor al inicialmente propuesto.

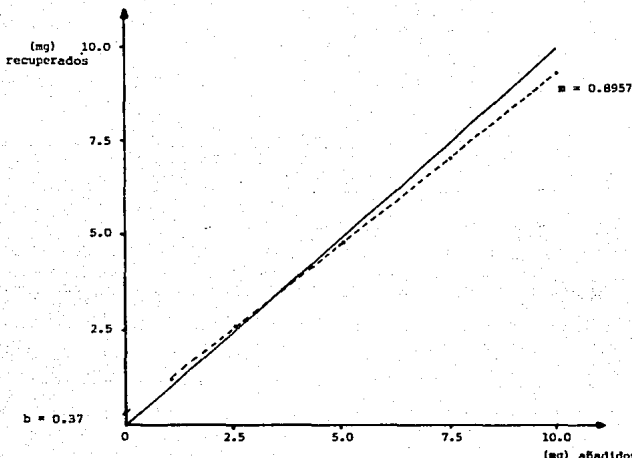


Fig. 16. Gráfica de Linealidad del método analítico, en el rango de concentración que va del 20 al 200% de concentración del principio activo (rango de concentración no lineal).

— recta ideal
 - - - - recta real

Dicho rango que va del 20 al 120% de concentración del principio activo (ver tabla II), dio una serie de resultados, que inician con una ordenada al origen de:

$$A = 0.0299 \approx 0.03$$

De la cual al hacer su cálculo inferencial se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0 : A_0 = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

Utilizando como estadígrafo de contraste a la "t" de student con el nivel de significancia característico $\alpha = 0.05$

y 17 grados de libertad, obteniéndose:

$$t_{\text{tabs}} = 2.1199$$

$$t_{\text{calc}} = 0.1873$$

$$\therefore t_{\text{calc}} < t_{\text{tabs}}$$

Con la aceptación de la prueba de hipótesis, se considera a la ordenada al origen prácticamente igual con cero.

El valor de la pendiente, fue el siguiente resultado - que se sometió al cálculo inferencial.

$$B = 0.9908$$

De este valor, parte la prueba de hipótesis que se representa de la siguiente manera:

$$H_0 : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

Nuevamente y basados en la prueba de "t" de student, - con un $\alpha = 0.05$ y 17 grados de libertad, se obtuvo:

$$t_{\text{tabs}} = 2.1199$$

$$t_{\text{calc}} = -0.9962$$

$$\therefore t_{\text{calc}} < t_{\text{tabs}}$$

Resultados que acreditan a la pendiente, con un valor igual a uno, y que permiten catalogar el método como lineal, fig. 17.

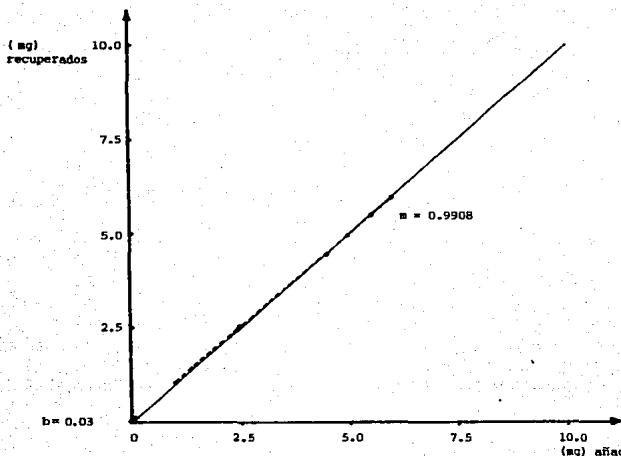


Fig. 17. Gráfica de linealidad del método analítico en el rango de concentración, que va del 20 al 120% de concentración de principio activo (rango de concentración lineal).

La linealidad del método analítico, es posible de evaluar con un parámetro denominado coeficiente de correlación, el cual mide el grado de asociación entre las dos variables.

El resultado del coeficiente de correlación es:

$$r = 0.9983$$

Resultado que nos indica una asociación directa de ambas variables como función de la concentración.

En la tabla III, se determina la ecuación corregida y los mg reales recuperados para el método por Cromatografía de Líquidos de la Eritromicina Base activa.

TABLA III ECUACION CORREGIDA PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION REAL DE ERITROMICINA BASE ACTIVA RECUPERADA.

mg. añadidos (X ₁)	$\hat{y} = 0.9908 + 0.03 \text{ mg. recuperados}$
1.0	1.02
2.5	2.51
4.5	4.49
5.0	4.98
5.5	5.48
6.0	5.97

Los cálculos y rangos de aceptación para la determinación de la ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación, se encuentran en el Anexo 3.

8.6 Sensitividad.

El valor de 14.3 obtenido en el cálculo de este parámetro (ver anexo 3), indica que el método es capaz de detectar variaciones de por lo menos 1 mg. de Eritromicina Base activa en la muestra.

8.7 Repetibilidad y Reproducibilidad.

El cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad, criterios utilizados como complemento en la determinación de la precisión del sistema, se desarrolla a partir de los datos de la tabla IV, generados por dos analistas, en dos diferentes días.

TABLA IV RESULTADO DEL % DE RECUBRO DE UN MISMO LOTE DE ERITROMICINA, POR DOS QUÍMICOS ANALISTAS EN DOS DÍAS DISTINTOS.

	Analista 1	Analista 2	
Día 1	103.2	100.0	
	101.8	96.7	
	104.5	98.8	
	103.8	101.6	
	99.6 = 910.6	98.3 = 904.2	
	100.8	97.0	
	99.0	102.2	
	101.6	101.3	
	96.8	99.8	
Día 2	97.7	98.9	i = 2
	99.0	101.2	i = 2
	103.7	99.9	k = 9
	105.7 = 895.7	98.3 = 894.1	
	101.8	99.4	
	101.3	100.2	
	100.8	98.8	
	97.0	98.5	
	97.2	98.9	Y... = 3604.6
Y _{1..} = 1806.3		Y _{2..} = 1798.3	

El uso del Análisis de Varianza como herramienta estadística (ver tabla de cálculo Anexo 4) permite establecer, en base al cálculo del estadígrafo de contraste F, si existe o no efecto en los resultados de un análisis. Que puedan ser causados por el día, o bien por el analista que ejecuta el estudio.

A continuación, se muestran los resultados numéricos - obtenidos en la tabla de ANADEVA generada a partir de los - datos recopilados en la Tabla V.

TABLA V TABLA DE ANADEVA.

	G.l.	S.C.	M.C.	F calc.	F tabl.
Analista	1	1.78	1.78	0.2	18.5
Día	2	18.0	9.0	1.8	3.3
Error	32	160.13	5.0	-	-

Como resultados, se obtuvo para el efecto por analista:

$$F \text{ calc} = 0.2$$

$$F \text{ tab} = 18.5$$

$$\therefore F \text{ calc} < F \text{ tabs.}$$

para el día, se obtuvo:

$$F \text{ calc} = 1.8$$

$$F \text{ tabs} = 3.3$$

$$\therefore F \text{ calc} < F \text{ tabs.}$$

Por tales motivos, se considera que no existe efecto - sobre los resultados, atribuido a algunos de estos parámetros. Considerando, que si existe diferencia entre los resultados, son debidos al error experimental inherente al método.

El cálculo de la esperanza de la media cuadrática (Ver anexo 5), afina los resultados obtenidos por el análisis de varianza, al determinar los siguientes postulados cuantitativos, acerca del analista, del día y de los errores sistemáticos del método.

- El rango de variación máxima permisible entre los promedios de dos o más grupos de determinaciones realizadas por un analista en el mismo día, y bajo las mismas condiciones de operación, no deberá ser mayor al 2.6%. (Repetibilidad).

- Este mismo valor de 2.6%, no deberá ser excedido en el promedio de las determinaciones realizadas por diferentes analistas, en días distintos. (Reproducibilidad).

- Para las determinaciones individuales, realizadas por un mismo analista el mismo día, no deberán ser mayores al 9%, entre una muestra y su duplicado. (Repetibilidad).

De los postulados antes mencionados, se puede concluir que los límites de recobro para repetibilidad y reproducibilidad, se definen de la siguiente manera:

- Intervalo de confianza para el promedio de recobros de un analista en un mismo día (Repetibilidad) LS = 105%
LI = 95%

- Intervalo de confianza para el promedio de recobros de cualquier analista (Reproducibilidad inter día-analista) LS = 103%
LI = 97%

- Intervalo de confianza para el promedio de recobros de un analista en cualquier día (Reproducibilidad inter-analista) LS = 108%
LI = 92%

9. CONCLUSIONES

En consideración al objetivo planteado al inicio de este trabajo, resulta evidente que el propósito de estudio de seado se cumplió satisfactoriamente. Ya que gracias a los resultados obtenidos, se considera al método analítico implementado para la determinación de la Eritromicina Base y sus impurezas como un método exacto, preciso, lineal, sensible y capaz de diferenciar a la Eritromicina A (componente de mayor actividad microbiológica) de las impurezas encontradas en la muestra.

A pesar de que se encontró que el método analítico es lineal en un rango de concentración menor al considerado al inicio del estudio, no representa dificultad alguna, debido a que las determinaciones para la Eritromicina Base en muestras de rutina, se encuentran en una concentración cercana a los 5 mg/ml, que equivale al 100% del principio activo.

Por todo lo anterior se considera al método analítico, apropiado para ser usado en forma rutinaria en el laboratorio con el fin de obtener datos, que permitan aumentar los rendimientos de la Eritromicina A durante la producción, e información que indique la calidad, potencia y seguridad

del producto, mediante la manipulación, orientación y control de los parámetros físico-químicos del proceso fermentativo para disminuir a futuro las determinaciones microbiológicas realizadas al producto.

10. RECOMENDACIONES

Considerando las características del equipo, y las limitaciones que el método analítico presenta, es necesario - enumerar algunas recomendaciones con el fin de asegurar aún más la reproducibilidad y confiabilidad de resultados obtenidos en análisis rutinarios de muestras de Eritromicina Base en el laboratorio.

- Al hacer la inyección de la muestra en forma manual o con la ayuda del automuestreador, es recomendable completar el análisis de una u otra forma, sin intercalar la inyección manual con la automática. La razón de esta limitante es debido a que se encontró una diferencia del 10% a favor de los resultados obtenidos por la inyección automática.

- Debe ser implementado el uso de un estándar interno para minimizar los errores debidos a la preparación de la muestra, técnica y equipo. Ya que el automuestreador permite cierto grado de confianza en base a la repetibilidad del sistema pero no disminuye el error por efecto de pesada en el analista.

- El uso de una precolumna para proteger tanto a la columna, como al Cromatografo de Líquidos de posibles partículas insolubles presentes en la muestra.

- Hacer un estudio de correlación de los resultados ob-

tenidos en el análisis microbiológico y por CLAR de la potencia biológica de la Eritromicina Base, con el fin de conocer el % de diferencia entre los resultados de uno y otro método. Repetirlo hasta lograr una diferencia menor o igual al 3%.

- El uso de una misma columna para la determinación de Eritromicina Base, sin inyectar muestras de Salt, caldo rico o pobre del proceso de fermentación, es otra de las recomendaciones a seguir, con objeto de proporcionarle un mayor tiempo de vida útil a la columna. El uso de una columna para cada tipo de análisis, beneficiará substancialmente su vida útil.

ANEXO 1

CALCULO DE LA CONFIABILIDAD DEL SISTEMA

$$\frac{\text{Altura en mm de Std Ery A}_1}{\text{Altura en mm de Std Ery A}_2} \times \frac{(\text{mg de Std Ery A}_2)}{(\text{mg de Std Ery A}_1)}$$

Rango de Repetibilidad 0.98 - 1.02. Si esta precisión no se obtiene, continuar la inyección hasta conseguir la duplicidad del sistema, tras dos inyecciones consecutivas del Estándar de Eritromicina A₁ y 2, en una atenuación programada de 62.48 mv. (Cálculos de potencia en la misma atenuación).

CALCULO DE LA RESOLUCION ⁽²¹⁾

Realizar el cálculo del factor de Resolución R, entre los picos de Eritromicina A y Eritromicina C. Este factor no debe ser menor de 1.2 de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$R = \frac{2 (t_A - t_C)}{W_A + W_C}$$

De donde t_A = Tiempo de retención en min. de Ery A

t_C = Tiempo de retención en min. de Ery C

W_A = Base del pico de Ery A en minutos

W_C = Base del pico de Ery C en minutos.

El cálculo de la resolución, se realizará a una atenuación, de 31.24 mv.

CALCULO DE LA POTENCIA BIOEQUIVALENTE DE LA ERITROMICINA.

En primer lugar, se calculó el porcentaje con el que se encuentra participando la Eritromicina A B y C en la muestra, para posteriormente obtener el valor de la Potencia Bioequivalente (PB) multiplicando dichos porcentajes, por los valores con que activamente participan inhibiendo el crecimiento del microorganismo de prueba en el método microbiológico.

$$\% A = \frac{\text{Altura del pico Ery A en ntra}}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times \left[\frac{\text{Peso Std. Ery A1 (mg)}}{\text{Altura (mm) St. Ery A1}} + \frac{\text{Peso Std Ery A2 (mg)}}{\text{Altura (mm) St. Ery A2}} \right] \times \text{Pureza del Estándar (\%)}$$

$$\% B = \frac{\text{Altura pico Ery B en ntra. (mm)}}{\text{Altura (mm) Std pico Ery B}} \times \frac{\text{Peso del St. (mg)}}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times 100$$

$$\% C = \frac{\text{Altura pico Ery C en ntra (mm)}}{\text{Altura (mm) Std. pico Ery C}} \times \frac{\text{Peso del St. (mg)}}{\text{Peso de la ntra (mg)}} \times 100$$

La determinación de altura en mm, para los estándares de Ery B y C, se realizarán en el cromatograma del estándar de impurezas.

$$PB = 10\%A + 7.5\%B + 3.9\%C$$

ANEXO 2

CALCULO DE LA EXACTITUD

$$H_0 : \mu = 100\%$$

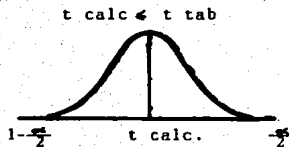
$$H_a : \mu \neq 100\%$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

$$t_{\text{tabl g.l.}} = n-1$$

$$\alpha = 0.05$$

CRITERIO DE ACEPTACION



∴ Si se cumple lo anterior el método se considera exacto.

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_1 - \frac{\alpha}{2} \cdot s / \sqrt{n}$$

CALCULO DE LA PRECISION

$$H_0: \sigma \leq 3\%$$

$$H_a: \sigma > 3\%$$

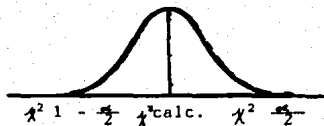
$$\chi^2 \text{ calc.} = \frac{(n-1) S^2}{\sigma^2}$$

$$\chi^2 \text{ tab. g.l.} = n-1$$

$$\alpha = 0.05$$

CRITERIO DE ACEPTACION

$$\chi^2 \text{ calc.} \leq \chi^2 \text{ tab.}$$



Si se cumple lo anterior el método se considera preciso.

LIMITES DE CONFIANZA

$$\sqrt{\frac{(n-1) S^2}{\chi^2 (1 - \frac{\alpha}{2})}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) S^2}{\chi^2 (\frac{\alpha}{2})}}$$

* NOTA: Aún para $\sigma = 2\%$, el método es preciso; $\chi^2 \text{ cal} = 23.07$

ANEXO 3

CALCULO DE:

Ordenada al Origen

$$A = \frac{(\Sigma Y) (\Sigma X^2) - (\Sigma X) (\Sigma XY)}{n (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

Pendiente

$$B = \frac{n (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)}{n (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

De donde:

$$\Sigma X = 73.50$$

$$\Sigma Y = 73.36$$

$$\Sigma XY = 355.16$$

$$\Sigma X^2 = 356.25$$

$$\Sigma Y^2 = 354.17$$

$$\Sigma XY^2 = 9816.69$$

$$(\Sigma X)^2 = 5402.25$$

$$(\Sigma Y)^2 = 5381.69$$

$$S_x = 1.82$$

$$A = 0.0299 \approx 0.03$$

$$B = 0.9908$$

ECUACION DE LA RECTA CORREGIDA

$$\hat{Y} = A + BX$$

$$Y = 0.03 + 0.9908 X$$

INFERENCIA PARA "A"

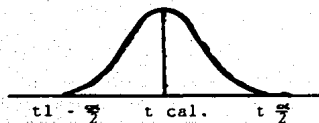
$$H_0 : A_0 = 0$$

$$H_a : A \neq 0$$

$$t \text{ calc} = \frac{A - A_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{(X_i - \bar{X})^2 \cdot n}}}$$

$$t \text{ tab g.l.} = n-1$$

$$\alpha = 0.05$$



CRITERIO DE ACEPTACION

$$t \text{ calc} \leq t \text{ tab}$$

Si se cumple lo anterior, el método se considera con una o denada al origen igual con cero.

INTERVALO DE CONFIANZA

$$A \pm t \frac{\alpha}{2} \cdot \hat{S}_{X/Y} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n (\sum X_i - \bar{X})^2}}$$

INFERENCIA PARA B

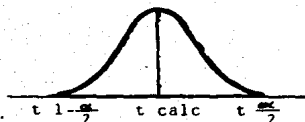
$$H_0 : B = 1$$

$$H_a : B \neq 1$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{(B - B_0) S_X \sqrt{n-1}}{S_{Y/X}}$$

$$t_{\text{tab}} = g.l. = n-1$$

$$\alpha = 0.05$$



CRITERIO DE ACEPTACION

$$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$$

Si se cumple lo anterior, el método se considera con una pendiente igual con uno.

LIMITES DE CONFIANZA

$$B \pm t_{\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{S_{Y/X}}{S_X \sqrt{n-1}}$$

CALCULO DE LA SENSITIVIDAD

$$f = \frac{B}{\hat{S}_{Y/X}}$$

ERROR TIPICO DE ESTIMACION

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - (A \sum Y) - B (\sum XY)}{n}}$$

ERROR TIPICO DE ESTIMACION MODIFICADA

$$\hat{S}_{Y/X} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \cdot S_{Y/X}$$

CRITERIO DE ACEPTACION

$$f \rightarrow \alpha$$

Si lo anterior se cumple, y el valor de sensibilidad tiende a infinito, el método es capaz de detectar variaciones en la concentración del principio activo menores a 1 mg.

ANEXO 4

TABLA DE ANADEVA

	g.l.	S.C.	M.C.	F calc	F tab.
ANALISTA	i-1	$\frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{y^2}{ijk}$	SC An/(i-1)	M.CAn/MCDia	g1 $\frac{1}{3}$
DIA	(i j-1)	$\frac{\sum r Y_{ij}^2}{K} - \frac{\sum Y_{ij}^2}{-iK}$	SCDia/(i j-1)	MCDia/MC	g1 = $\frac{2}{32}$
ERROR	(K-1) j i	$\frac{\sum r^2 Y_{ijk} - \sum Y_{ij}^2}{K}$	SC _e /(K-1) j i		

CRITERIO DE ACEPTACION

SI F calc. F TAB. Hay efecto del parámetro de estudio.

SI F calc. F TAB. Las diferencias son debidas al error experimental.

ANEXO 5

ESPERANZA CUADRÁTICA

F.V. MC

$$A1 = 1.78 = \sigma_{\epsilon}^2 K(1j) + \sigma^2 Dj(1) + \sigma^2 A1 = \sigma_{\epsilon}^2 k(1j) + K\sigma^2 Dj(1) + jk\sigma^2 A1$$

$$Dj(1) = .90 = \sigma_{\epsilon}^2 K(1j) + \sigma^2 j(1) = \sigma_{\epsilon}^2 k(1j) + K\sigma^2 Dj(1)$$

$$k(1j) = 5.0 = \sigma_{\epsilon}^2 k(1j)$$

Despejando:

$$\text{Para el error } \sigma_{\epsilon}^2 = 5.0$$

$$\text{Para el día } \sigma^2 Dj(1) = \frac{9.0 - 5.0}{9.0} = 0.44$$

$$\text{*Para el analista } \sigma^2 A1 = \frac{1.98 - 9.0}{18} = -0.40$$

Se considera la esperanza cuadrática del día, igual a la del analista.

$$\text{Variaciones individuales: } \sqrt{\sigma_{\epsilon}^2} = \sqrt{5} = 2.24 \approx 2.24 \text{ (Note: original image shows } \sqrt{5} \text{ and } 9.0\% \text{, but } \sqrt{5} \text{ is } 2.24 \text{, not } 9.0\% \text{.)}$$

$$\text{Variaciones por día y por analista: } \sqrt{\sigma^2 Dj(1)} = \sqrt{0.44} = 0.66 \approx 0.66 \text{ (Note: original image shows } \sqrt{0.44} \text{ and } 2.6\% \text{, but } \sqrt{0.44} \text{ is } 0.66 \text{, not } 2.6\% \text{.)}$$

* Se utiliza el valor de la esperanza cuadrática del efecto por día, en la Esperanza cuadrática del analista, debido al valor negativo presente en este parámetro.

LIMITES DE CONFIANZA PARA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Repetibilidad	100% Recobro \pm	$t_{32}^{E_{ijk}}$ g.l.	$\times \sqrt{\sigma^2_E}$
Reproducibilidad inter día-analista	100% Recobro \pm	$t_2^{Dj(1)}$ g.l.	$\times \sqrt{\sigma^2_{Dj(1)}}$
Reproducibilidad intra-analista	100% Recobro \pm	$t_1^{A(1)}$ g.l.	$\times \sqrt{\sigma^2_{A1}}$

9. BIBLIOGRAFIA

1. K. Tsuji and John H. Robertson. Determination of Erythromycin and its Derivatives by Gas-Liquid Chromatography. Analytical Chemistry 43 (1971), p. 818.
2. Code of Federal Regulations, Title 21-Food and Drugs, - U.S., Government Printing Office, Washington, D.C., 1970.
3. N.R. Kuzel and H.F. Coffey, J. Pharm. Sci., 56 (1967), p. 522.
4. K. Tsuji and John F. Goetz, High Performance Liquid - Chromatographic Determination of Erythromycin, Journal of Chromatographic 147, (1978), p. 359.
5. K. Tsuji and John F. Goetz, G-L-C Determination of Erythromycin in Entenc - Coated Tablets, Journal of Pharmaceutical Sciences 61 (1972), p. 1633.
6. A. Banaszek, K. Krowicki and A. Zamojski. Journal Chromatography 32 (1968), p. 581.
7. T. Anderson, Journal Chromatography, 14 (1964), p. 127.
8. G. Richard, C. Radecka et. al., Chromatographic Differentiation of Erythromycin and its Esters. Journal Chromatography, 67 (1972), p. 69.

9. A. Vilim, M.J. Le Belle et. al., A simple Thin-Layer - Chromatographic Identification Procedure for Erythromycin Base, Stearate, Estolate and Ethylsuccinate, Journal Chromatography, 133 (1977), p. 239.
10. P. Kurath, P.H. Jones et. al., Acid Degradation of Erythromycin A and Erythromycin B, Experientia, 27 (1971), p. 362.
11. J.M. McGuire, R.L. Bunch et. al., Antibiot. Chemother., 2 (1952), p. 281.
12. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 28th Edition, The Pharmaceutical Press Londres, (1982), pp. 1158-1162.
13. AMA Drug Evaluations 1st Edition, American Medical Association Chicago III, (1971), p. 401.
14. Varian Associates, Inc. 1st Edition, Basic Liquid Chromatography, USA (1978).
15. The Perkin-Elmer Corporation, Chromatography Division, Principios de la Cromatografía (MS-150) 1^a Edición, Norwalk U.S.A. (1981).
16. A.F. Pérez y A. Bolaños, Curso Básico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, ABBOTT LABORATORIOS DE MEXICO PLANTA TLAXCALA, (1986).

17. C.I. Marín, I.Q.L. Generalidades de cromatografía de Líquidos de Alta Presión. México-Puebla (1986).
18. J. Guerra and M.J. Finkelson. Validation of Analytical Methods, by F.D.A. Laboratories, Pharmaceutical Technology 74 (1986), p. 76.
19. Guide for use of Terms in reporting data in Analytical Chemistry 47 (1975).
20. Proyecto 63-758-62 ABBOTT LABORATORIES NORTH CHICAGO, USA (1984).
21. The United States Pharmacopeia, 20th Edition, United States Pharmacopeial Convention, USA (1980), pp. 938-946.
22. K. Tsuji et. al.. HPLC as a rapid means of monitoring Erythromycin and Tetracycline Fermentation Processes, Journal Antibiot, 31 (4) (1978), pp. 302-308.
23. M.L. Chen, et. al., Analysis of Erythromycin fluids by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, Journal Chromatography 278 (1) (1983), pp. 91-100.
24. J. Tadanier, J.R. Martin et. al., Journal American Chemistry Society, 95 (1973) p. 593.

25. K. Abrijela et. al.. Thin-Layer Chromatography of Erythromycin, Erythromycin oxime, Erythromycytamine and their Acil derivatives. Journal Chromatography 133 (1977), pp. 415-419.
26. K.Y. Tserng and J.G. Wagner, Analytical Chemistry, 48 (1976), p. 348.
27. K. Tsuji and John F. Goetz, Elevated Column Temperature for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Erythromycin and Erythromycin Ethylsuccinate. Journal Chromatography, 157 (1978), pp. 185-196.
- 28.- K. Tsuji, Fluorimetric Determination of Erythromycin and Erythromycin Ethylsuccinate in Serum by a High performance Liquid Chromatographic Post-Columns, On-Stream Derivatization and Extraction Method. Journal Chromatography 158 (1978), pp. 337-348.
29. J. Tadanier, J.R. Martin et. al.. C8 Epimeric 10,11-Anhydroerythromycins A and the C8 Epimeric 10-12-Epoxyerythromycins A. Journal of the American Chemical Society, 24 (1973), pp. 593-595.
- 30.- J. Tadanier, J.R. Martin et. al.. C8 Epimerizations of Erythromycin B and 10,11-Anhydroerythromycin B. Journal of the American Chemical Society, 24 (1973), pp. 592-593.