

27
2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores
ZARAGOZA

"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
DE ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUI-
DOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR) PARA ACIDO
CRITICO EN TABLETAS EFERVESCENTES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A I
ROSA MARIA GUZMAN SORIANO

U N A M
FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



México, D.F.

Octubre 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : Q.F.B FRANCISCA ROBLES LOPEZ.
VOCAL : Q.F.B CIRENIA SANDOVAL LOPEZ.
SECRETARIO : Q.F.B LOURDES CERVANTES MARTINEZ.
SUPLENTE : Q.F.B LETICIA CRUZ ANTONIO.
SUPLENTE: Q.F.B CONSUELO BAUTISTA ARAGON.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

**LABORATORIOS SANOFI WINTHROP
DEPARTAMENTO DE DESARROLLO ANALITICO**

ASESOR DEL TEMA : Q. F. B CIRENIA SANDOVAL LOPEZ.

A mis padres María Elena y Nicolás quienes me brindaron su confianza y comprensión para la realización de mis metas; y hoy que consigo una de ellas quiero darles las gracias por ser como son y porque siempre los llevaré en mi corazón.

A mis hermanos Arturo, Carlos, Beatriz, Enrique y José Luis. a quienes hago partícipes de mi alegría. Así mismo a Cecilia, Diana y Ricardo. gracias por su apoyo.

*Con amor para alguien muy especial A Gerardo
Quien ahora forma parte de una nueva etapa de mi vida,
por su temura, ejemplo de nobleza y tenacidad ante
la adversidad.*

*A mis amigos: Gerardo, Martín, Margarita, Olivia,
Rosario, Rosalía, Liliam y Rosa María por
su amistad.*

*A mi director de Tesis:
Q.F.B Cirenía Sandoval López por su ayuda y
asesoría en la realización de este trabajo.*

**• ALA VIDA , PORQUE SIN ELLA NO TENDRIA LA
OPOTUNIDAD DE DER FELIZ COMO CON MI FAMILIA,
MIS AMIGOS, SIN OLVIDAR QUE ESTAS EXPERIENCIAS
SON EL COMPLEMENTO MAS MARAVILLOSO PARA SER UN
POCO MAS HUMANO •**

INDICE

	No. de pág.
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
A CROMATOGRAFIA	3
1. Antecedentes historicos	3
2. Consideraciones generales	4
3. Clasificación.	5
a. En base a la naturaleza de la fase móvil.	6
b. Considerando los procesos de separación	6
c. Según la polaridad relativa de las fases.	7
1) Fase normal	7
2) Fase reversa	7
4. Cromatografía líquida	7
a. Cromatografía líquida clásica.	7
b. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).	8
5. Definiciones	9
6. Componentes de un cromatografo de líquidos	13
a. Reservorio.	14
b. Sistema de bombeo	15
c. Programación de gradiente.	17
d. Dispositivos de inyección	18
e. Precolumnas.	19
f. Columnas.	19
g. Detectores.	20
B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	23
1. Validación	23
2. Linealidad.	24
3. Precisión.	26
4. Especificidad frente a excipientes	27
5. Exactitud	29
6. Estabilidad de la muestra	29
7. Tolerancia del sistema	30
8. Límite de deteccion	30
9. Límite de cuantificación	31
10. Placebo	31
11. Placebo cargado	31
C ACIDO CITRICO.	32
1. Propiedades Fisicoquímicas	32
2. Propiedades Farmacológicas	32
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
IV. OBJETIVOS	34
V. HIPOTESIS	35

VI. METODOLOGIA.	36
A. MATERIAL Y METODO.	36
B. CONDICIONES A PROBAR	38
C. EVALUACION DEL SISTEMA	39
D. EVALUACION DEL METODO ANALITICO	39
VII. RESULTADOS	42
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS	58
IX. CONCLUSIONES	60
X. BIBLIOGRAFIA	61
ANEXO I	64
ANEXO II	65

I. INTRODUCCION

En las formas farmacéuticas la cuantificación de los principios activos no delimita la importancia que tiene la valoración de algunos excipientes que completan el efecto terapéutico de los mismos.

El ácido cítrico es el ácido orgánico más usado en el campo de los productos farmacéuticos y alimenticios. Su buen sabor y la facilidad con que es asimilado favorecen su utilización como ingrediente ácido para mantener el pH o para mantener un pH conveniente y hacer resaltar el sabor de una extensa variedad de productos, se asocia al bicarbonato de sodio en muchos polvos y tabletas efervescentes, se emplea también en la mezcla otros agentes medicinales, como citrato de sodio y citrato de potasio.

Las tabletas de tipo efervescentes son una forma farmacéutica usada con frecuencia para acelerar la disolución de los activos en agua y de esta forma se encuentren disponibles inmediatamente para activar su función terapéutica. La mayoría de estas formas contiene en su formulación al ácido cítrico el cual al reaccionar con una sal de carbonato produce dióxido de carbono que se desprende como gas permitiendo la fácil disgregación de la tableta y por lo mismo acelerar la disolución. Por lo tanto su concentración en las formulaciones que lo contienen debe estar perfectamente evaluada, para permitir una función de disgregación total.

Existen diversas formas de cuantificar el ácido cítrico ya que su naturaleza como ácido tricarbóxico lo hace susceptible de ser valorado por medio de una titulación en medio no acuoso. El método empleado actualmente para cuantificar ácido cítrico en tabletas efervescentes de aspirina consiste en hacerlo reaccionar con una mezcla 1: 5 de piridina / anhídrido acético para formar un complejo colorido que posteriormente se lee al espectrofotómetro, dicho complejo es inestable a la luz, la reacción se lleva a cabo en una hora y en un baño de temperatura controlada. (5). Por estas razones el propósito del presente trabajo fue desarrollar y validar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de ácido cítrico en materia prima y producto terminado, debido a que los métodos de análisis para cuantificar dicho compuesto son poco exactos, reproducibles y precisos y / o requieren de cierto tiempo de análisis para poder dar un resultado final, la cromatografía de líquidos además de

ser más exacta y reproducible que estos métodos es también versátil debido a la rapidez de análisis para realizarlos .

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. CROMATOGRAFIA

1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El antecedente más remoto de la cromatografía es el análisis capilar. En 1850, Runge analizó pigmentos vegetales depositando la muestra sobre papel filtro, observando que estos se separaban en anillos concéntricos de varios colores. (12)

En 1861 Schoenbeim cambió este método circular por el unidimensional sumergiendo un extremo de tira de papel en la disolución. A esta técnica se le conoce en la actualidad como cromatografía en papel y se le ha utilizado también para separar proteínas e incluso bacterias. (12)

La cromatografía como técnica de separación fue descubierta por el botánico y químico ruso Mijail S. Tswett quien en el año de 1903 publica un trabajo en el cual se incluye la primera descripción del método, posteriormente, en 1906 publica otro que proporciona un informe detallado del método y sus aplicaciones. El propio Tswett eligió el nombre de "cromatografía" que significa "escritura de color", refiriéndose a las bandas de las diferentes sustancias coloreadas que logró separar sobre una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, en la cual introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; a continuación agregó más éter de petróleo y observó que a medida que el solvente pasaba a través de la columna se separaban bandas de diferentes colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantofilas. Después de Tswett, transcurrió un período relativamente largo durante el cual no tuvo lugar ningún avance esta técnica. (11)

En 1938 el bioquímico polaco Tadeus Reichstein obtuvo el cromatograma de flujo a partir de los volúmenes por unidad de tiempo que se requerían para que eluyeran las diferentes sustancias. Por sus trabajos sobre las hormonas de la corteza suprarrenal y la cortisona, obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1950 (junto con E. Kendall y P. Hench). (12)

En 1941 Martín y Synge introducen la cromatografía de reparto y sugirieron la posibilidad de utilizar un gas en la fase móvil del cromatógrafo. (12)

En 1944 Condsen, Gordon y Martín descubrieron un nuevo método para aplicar la técnica de reparto, con hojas de papel filtro. Este método fue llamado cromatografía de reparto sobre papel.

Al poco tiempo en 1947 en Estados Unidos de Norte América la comisión de energía atómica dio a conocer información sobre el uso de la cromatografía de intercambio iónico para la separación de productos de fisión nuclear

En 1952 Martín y James obtienen un logro particularmente importante en el desarrollo de la cromatografía de reparto gas-líquido utilizando una bureta automática para detectar y determinar los ácidos y bases; así el primer cromatógrafo de gases cubrió las necesidades de cuando menos dos grupos funcionales (12). En este mismo año, Alm , efectúa la elución por gradiente de polaridad del solvente. (12)

En 1953 Wheaton y Bauman observan el principio de exclusión. (12)

En 1954 Ray obtiene un cromatograma empleando un detector de conductividad termica en cromatografía de gases. (12)

En 1959, Porath y Flodin desarrollan la cromatografía de exclusión en geles suaves de polidextranos, técnica que recibe el nombre de cromatografía de filtración en gel. (11)

En 1962, el químico norteamericano Moore efectúa separaciones en geles rígidos de poliestireno, técnica que recibe en nombre de permeación en gel. (11)

Hasta fines de los 60's la cromatografía de gases era más popular que la de líquidos debido a que esta última se requería una inversión mayor de tiempo ya que se efectuaba en columnas abiertas a presión atmosférica , pero a fines de los 60's , gracias al avance en la instrumentación y en los empaques de las columnas se logro la cromatografía de líquidos de alta resolución. (12).

2. CONSIDERACIONES GENERALES

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las diferentes afinidades de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial (fase estacionaria) mientras que otra puede ser líquida o gaseosa (fase móvil) y se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. La afinidad relativa de los solutos para cada una de las fases, debe ser reversible para asegurar que haya transferencia de masa durante la separación cromatográfica (13).

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que puede ser puesto en capa delgada sobre un soporte inerte.

La fase estacionaria debe estar formada por partículas finamente divididas para que exista una superficie tan grande que permita que el fenómeno de adsorción-desorción de los solutos sea frecuente . La fase móvil puede ser un líquido puro , una mezcla de estos , una mezcla de soluciones (amortiguadoras) o puede ser un gas (puro o una mezcla homogénea) (13).

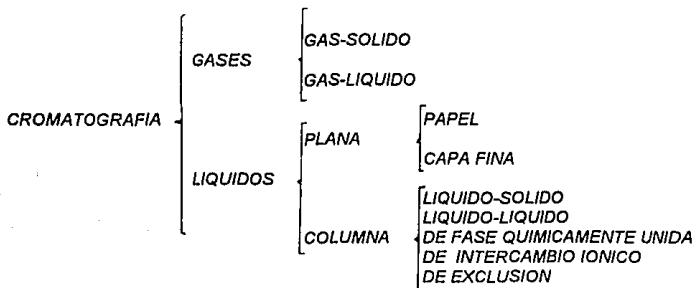
Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil . Cuando la fase estacionaria es un líquido el proceso se llama cromatografía de partición, mientras que cuando la fase estacionaria es un sólido el proceso se llama cromatografía de adsorción. En la cromatografía de partición la fase estacionaria es un líquido, frecuentemente agua, mantenida en un soporte inerte tal como gel de sílice o tierra de diatomeas, la fase móvil puede ser un gas (cromatografía gas-líquido: CGL) o bien un líquido (cromatografía líquido-líquido: CLL). En la cromatografía de adsorción la fase móvil que contiene al soluto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria, la separación tiene lugar cuando algunos de los componentes de la mezcla son más fuertemente adsorbidos por el sólido que otros. Dado que la adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie, el grado de separación alcanzado depende de la superficie adsorbente que se disponga. (13).

3. CLASIFICACION

Como se menciona, la cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre las dos fases; una de ellas es la fase móvil, la cual puede ser un líquido o un gas y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez, puede ser un líquido o un sólido. El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas diferencias entre la adsorción o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias entre los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra . (12)

Tomando en cuenta varias consideraciones, la cromatografía se puede clasificar de cuatro formas básicas:

a. Basándose en la naturaleza de la fase móvil se divide en:



b. Considerando los procesos de separación se divide en:

CROMATOGRAFIA DE ADSORCIÓN. La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas; la separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción, una partícula se fija a otra superficialmente sin penetrar en ella a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals.

El grado de separación depende por lo tanto notablemente de la superficie activa del sólido y en consecuencia, el tamaño de partícula sólida que se emplea debe ser lo más pequeña posible para tener mayor superficie activa en relación al volumen del empaque. (1).

CROMATOGRAFIA DE PARTICION. La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido poroso e inerte, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria esta saturada por la fase móvil, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es, a sus diferencias en sus coeficientes de reparto. (1)

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por lo tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil generalmente es una solución amortiguadora, en la que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución. El relleno de la columna es un material que posee poro de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. (1)

Si el material estacionario es un gel reticulado se le denomina filtración en gel, y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel; pero en ambos el proceso de separación se efectúa por la diferencia de pesos moleculares.(1).

c. Según la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto, la cromatografía se puede clasificar en:

1) **Cromatografía en fase normal.** El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (p.e. gel de sílice) y la fase móvil es no polar (p.e. n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante mayores tiempos que los materiales menos polares.(15)

2) **Cromatografía en fase reversa.** Es el proceso inverso, en el cual, el lecho estacionario es de naturaleza no polar (por ejem. hidrocarburos), mientras que la fase móvil es un líquido polar, cuanto más polar es la muestra, mayor será su retención. (15).

4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas cromatográficas más versátiles con las que cuenta el analista, ya que por medio de ésta es posible realizar separaciones de mezclas basándose en diversas características, tales como la polaridad de los solutos, coeficiente de partición, peso molecular, naturaleza iónica, o su capacidad para formar complejos de afinidad.

En la cromatografía de líquidos la separación tiene lugar en una columna empacada. La fase estacionaria puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido de una capa líquida, mientras que la fase móvil es un líquido.(13)

El proceso de la cromatografía de líquidos puede ser realizado usando uno de los métodos siguientes:

a. Cromatografía de líquidos clásica. Durante muchos años se practicó la cromatografía de líquidos en una forma llamada clásica y que consiste básicamente en lo siguiente, una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre 2 a 10 cm, rellena de algún material, como gel de sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a las 200 micras, se introduce la muestra disuelta en la fase móvil o disolvente por medio de un cuentagotas o de una pipeta, luego se agrega el disolvente, con el cual se eluye la muestra a través de la columna. Los tamaños de las muestras varían entre 0.1 y 1.0 g o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta en la base de la columna

en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido, que muchas veces puede ser de horas e incluso días; otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra usualmente se adsorbe en forma irreversible. (16)

El problema principal de este tipo de cromatografía es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil. En general se usa una técnica auxiliar, como por ejemplo, espectrofotometría, análisis químico o simplemente un registro gravimétrico, para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas. (16)

b. Cromatografía de líquida de alta presión (CLAP). En esta técnica se utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. En este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm, rellenas de materiales especiales pulverizados, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30 a 40 micras y con frecuencia hasta de 3 a 10 micras, generalmente con una distribución de tamaños no mayor de 2 micras. Este tipo de columnas es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión, por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de la fase estacionaria dentro de la columna es pequeña pero se requiere que la muestra también sea pequeña entre 0.1 y 10 mg. (16)

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (100 atm o menos), la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión; a presiones más elevadas, se utilizan las válvulas de inyección. (16)

Debido a la eficiencia demasiado alta se obtienen unos 50000 platos por metro, en este método de cromatografía las presiones que se alcanzan oscilan entre 1000 y 3500 psi.

Al igual que toda técnica analítica la CLAP tiene algunas limitaciones:

VENTAJAS

- Velocidad de análisis.
- Alta resolución
- Resultados cuantitativos
- Buena sensibilidad y automatización
- Amplio espectro de aplicaciones

DESVENTAJAS

- Equipo costoso
- No existe detector universal
- Elevado costo de operación
- Experiencia indispensable

Con esta técnica es usual obtener separaciones en término de minutos e inclusive, en algunos casos en segundos. (16).

5. DEFINICIONES

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos característicos de esta técnica instrumental, a continuación se mencionan los más utilizados, indicando además en los casos pertinentes su importancia operacional y la forma en que son evaluados. (13)

a. Tiempo de retención (TR) . Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en unidades de tiempo.

b. Tiempo muerto (TM) . Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

c. Tiempo de retención corregido o relativo. (TR') . Es el tiempo de retención absoluto menos el tiempo muerto. (20). Se muestra de acuerdo con la fig. 1.

$$TR' = TR - TM$$

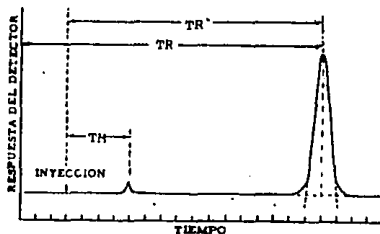


Fig. 1 Cromatograma tipo, en donde TR es el tiempo de retención, TM es el tiempo muerto TR' es el tiempo de retención corregido.

d. Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es el equilibrio de la distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

N se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16 (TR/W_b)$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados; y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna.

Existen varios métodos para cuantificarlo de pendiente de la altura a la que se tome la anchura del pico. Sin embargo, el más utilizado es el método de las tangentes, en el cual se trazan dos tangentes por los puntos de inflexión y se mide la longitud de la línea base donde cortan las tangentes (12). de acuerdo con la fig. 2.

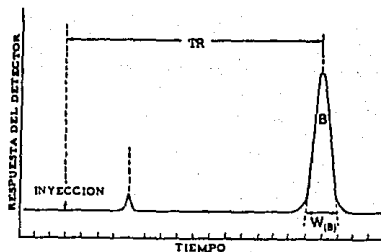


Fig. 2 Método de las tangentes para calcular el número de platos teóricos.

e. Anchura de la base del pico (Wb). Es la porción de la línea basal interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de un pico, asumiendo que la forma del pico es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de la desviación estándar de una distribución gaussiana.

f. Altura equivalente a un plato teórico (HEPT). Retomando la definición de plato teórico referente al proceso de destilación, se deduce que HEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria (12). Si el valor de HEPT es pequeño, significa que hay un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud, y por lo tanto, la columna será más eficiente. La HEPT se puede calcular con la siguiente fórmula :

$$HEPT = \text{Longitud de la columna} / \text{No. de platos teóricos}$$

g. Factor de capacidad (k). También conocido como coeficiente de distribución o reparto, es una propiedad física fundamental de cada sustancia que mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor nos indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna. (20)

En este caso k esta controlada por la fuerza iónica del solvente, debiéndose encontrar el más adecuado para la separación; dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra, los valores óptimos son de 2 a 6 y en muestra con más de dos componentes el rango es de 1 a 10. El factor de capacidad se calcula con la siguiente fórmula:

$$k = TR' / TM = (TR - TM) / TM$$

h. Factor de selectividad (a). Es la medida de la solubilidad diferencial de dos componentes en la fase estacionaria. De acuerdo a la interacción que haya con un compuesto y otro se realizará una selección de que pico sale primero y cual al final (20) Si el valor de $a = 1$, los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realizará la separación, así, entre más elevados sean los valores de a , habrá una mayor selectividad de la fase estacionaria y una mejor separación. El factor de selectividad (a puede ser <1) se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula, y a la fig. 3.

$$\alpha = TR'(B) / TR'(A) = TR(B) - TM / TR(A) - TM$$

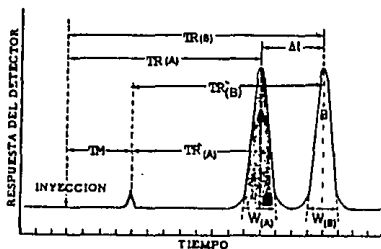


Fig. 3 Cromatograma que muestra las variables para calculo de la selectividad.

La selectividad puede mejorarse por :

1. Cambio de la fase móvil. Aumentando la polaridad, el pH y/o la fuerza ionica.
2. Cambio de la fase estacionaria. Cambiando de columna o variando el tamaño de está.
3. Variación de la temperatura. Se puede aumentar o disminuir la temperatura utilizando un horno para columnas o una circulación de agua. Al controlar correctamente la temperatura se mejora la reproducibilidad de la separación. (16)

i. Ecuación de resolución. La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos, y se define como la distancia que hay entre el centro de dos picos dividida entre el promedio de la anchura de los mismos (11) Para el cálculo de la resolución se utilizan los picos más difíciles (los más juntos), y si estos se pueden separar con éxito, todos los demás que están contenidos en la muestra lo harán.

Una resolución igual a uno se considera como una separación completa, aunque en realidad es del 98%. Cuando la resolución es de 1.5 la sobreposición de dos picos solo es del 0.3% (12)

Tanto la selectividad (α) como la eficiencia (N) y el factor de capacidad (k) están estrechamente ligadas a la resolución al utilizar la siguiente fórmula:

$$R = 1/4 (\alpha - 1/ \alpha) \quad (N) \quad (k / 1+k)$$

Selectividad **Eficiencia** **Capacidad**

6. COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS

Puesto que la cromatografía de líquidos es una técnica analítica de gran precisión, se requiere de un tipo de instrumental con ciertas características de índole general como lo son:

VERSATILIDAD. El instrumento deberá tener la capacidad para trabajar con muestras de diferente tipo, adaptarse a las diferentes técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna. Para ello deberá estar equipado con los siguientes aditamentos :

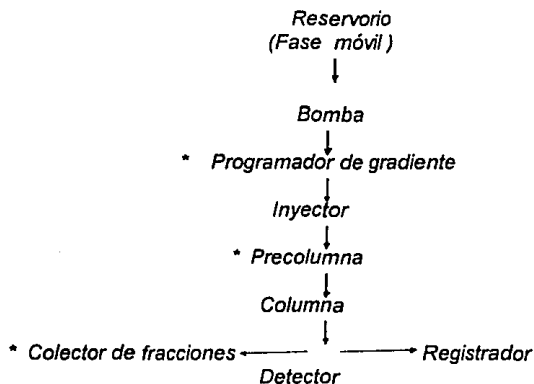
- Sistema de operación de alta presión
- Diversos detectores
- Sistemas para recolectar fracciones a la salida de la columna
- Programadores de fase móvil o disolvente (también llamados generadores de gradientes.
- Controles de temperatura para columna y el detector
- Controles de flujo.

RAPIDEZ. Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil . (16)

REPRODUCIBILIDAD Y ESTABILIDAD . Son características esenciales si se quiere obtener un funcionamiento efectivo a largo plazo. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como flujo y composición constante de la fase móvil, la temperatura, la presión, etc. (16)

SENSIBILIDAD. Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza. (16)

El siguiente diagrama muestra los componentes esenciales de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.



* Partes que son opcionales ya sea en las formas de gradiente o en sistema isocrático.

a. **Reservorios.** Los reservorios de la fase móvil pueden ser de acero inoxidable o vidrio con capacidad hasta de 1litro. La fase a emplear puede ser orgánica o inorgánica (soluciones acuosas de sales o soluciones amortiguadoras). Los constituyentes de esta mezcla deben tener una alta pureza (grado HPLC o CLAP) ya que pequeñas trazas de contaminantes interfieren en el estudio. Es importante que la fase móvil sea degasificada por ultrasonido o por vacío y agitación, además de ser filtrada por partículas extrañas que puedan obturar el sistema.(16)

Fase móvil. Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son importantes; de ahí que se traten los aspectos generales y las características de la fase móvil.

En lo que respecta a las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía de líquidos, cabe citar:

- *Disolver la muestra.*
- *No degradar o disolver la fase estacionaria.*
- *Tener baja viscosidad.*
- *Ser compatible con el tipo de detector utilizado.*
- *Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.*
- *Un valor de k' entre 2 y 10 es deseable en general.*

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben seleccionar con cuidado.

Quando se lleva a cabo la cromatografía líquido-líquido (CLL), la fase móvil puede disolver la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su introducción al instrumento o mediante el uso de una precolumna que, por lo general, consiste en una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de los utilizados en cromatografía de gases (CG), que contienen un alto porcentaje de fase estacionaria. A través de esta precolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de fase estacionaria.(16)

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. (16)

La fase móvil debe de ser compatible con el detector empleado, lo cual es particularmente importante en el caso de la programación de ésta puede afectar el funcionamiento del detector.

La fase móvil o disolvente, como también se le llama, debe de ser de alta pureza, usualmente grado cromatográfico, o en el último de los casos grado espectro; esto es importante cuando se desea realizar análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta o el de fluorescencia. Los disolventes empleados en cromatografía líquida (CL) son los mismos que se emplean en cromatografía de capa fina y que se muestran con respecto a su valor eluotrópico. (16)

b. Bomba *Dado que las columnas que se emplean en CLAP están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Para, lo cual requiere un*

sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían demasiado lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- *Presión máxima de operación (usualmente hasta 4000 psi).*
- *Intervalo de volúmenes obtenidos.*
- *Reproducibilidad y constancia de flujo.*
- *Características de flujo (continuo o pausado).*

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema. (16)

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño, se pueden considerar básicamente de dos tipos:

a. Bombas mecánicas:

- 1) *Recíprocas (de pistón o diafragma).*
- 2) *De desplazamiento continuo.*

b. Bombas neumáticas.

1) Bombas Recíprocas . *Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, si no más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente 600 atm. Estas bombas operan mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, se llena y se vacía, de modo alternativo una pequeña cámara (16) . La principal desventaja es que el flujo que se obtiene en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme lo cual puede causar pérdida de eficiencia en la columna e inestabilidad en el detector, debido a lo anterior, es necesario eliminar dichas pulsaciones mediante un sistema amortiguador. Una forma sencilla de lograrlo es colocando una sección larga de tubo capilar entre la bomba y la cámara de inyección , este tubo capilar se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba. Por otra parte la ventaja principal de este tipo de bombas es el flujo de volumen constante.*

Un avance más reciente en el diseño de este tipo de bombas lo constituye la bomba de doble pistón, accionado de tal forma que mientras un pistón succiona el disolvente, el otro lo expulsa de la columna; el flujo de ambos pistones, ya libre de pulsaciones, es encausado por una vía común. (16)

2) Bombas de desplazamiento continuo . Llamadas también bombas de émbolo o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen, el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad. (16). El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo, o sea libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para llenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación.

Cabe mencionar que los flujos desplazados por estas bombas varían entre 0.5 a 10 ml / hora a presiones de hasta 340 atm. Su costo relativo es elevado y siempre existe cierta dificultad al llenar la bomba con una nueva fase móvil.

Bombas Neumáticas . En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a altas presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene. (16)

La presión máxima obtenida está limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido. Este último problema se puede resolver utilizando algún tipo de interfase entre el líquido y el gas, evitando el contacto directo entre ellos, o bien más fácil aún, desechando las últimas porciones de líquido que ha sido saturado por el gas.

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, conviene colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas bloqueen el sistema, este tipo de filtro debe de tener la capacidad de retener partículas extrañas sin producir una caída de presión excesiva.

c. Programadores de gradientes. Los programadores de gradiente pueden o no ser utilizados, dependiendo de las características de la muestra a separar. Cuando la muestra en estudio es muy compleja, la elución con gradiente o programación con gradientes puede ser ventajosa y en ocasiones esencial. Algunas de las ventajas de la elución con gradiente son los tiempos menores de análisis, mejor formación del pico, mejor limpieza de la columna y mejor reconocimiento de las condiciones isocráticas. Los aparatos programadores de gradientes se dividen en dos grandes grupos: baja presión y alta presión.

Los aparatos de baja presión constan normalmente de una bomba y el mezclado se realiza en la entrada de la misma. En general, válvulas de intercambio se usan para medir los diferentes porcentajes de las fases móviles que entran a la bomba con cada golpe.

Los sistemas de gradiente de alta presión son sistemas de bombas binarios o ternarios, donde cada bomba impulsa una fase móvil diferente. A su vez cada bomba aporta una fracción de la velocidad lineal del flujo, dependiendo de la composición deseada.

Los sistemas de alta presión son más flexibles, más reproducibles y permiten un mayor rango en la composición y selección de la forma del gradiente. Con cualquier forma de gradiente que se use es necesario siempre asegurar una mezcla adecuada de los solventes. Esto lleva a usar algún tipo de cámara de mezclado. (12)

d. Dispositivos de Inyección. Los métodos principales por los que se introduce la muestra en una cámara de CLAP son dos: éstos pueden ser por medio de una válvula de inyección o por métodos de detención del flujo. Los métodos de detención del flujo requieren que se interrumpa el flujo de la fase móvil hacia la columna mientras se introduce la muestra a la columna. Luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza. Generalmente el método más usado para la introducción de la muestra en la columna es por medio de una válvula de inyección.

La válvula de paso (loop) de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna. Ahora es cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula con ayuda de una jeringa. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyección, la fase móvil viaja por el "loop" y lleva la muestra hacia la entrada de la columna. (12)

Actualmente la inyección de la muestra puede hacerse en forma automática. Los inyectoros automáticos consisten principalmente, de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como tiempos de inyección, tiempos de elución, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de la muestra, lavado de válvulas y jeringa, inicio de inyección para el registro así como la operación de programadores de gradientes o controles de sistema.

Existen principalmente tres métodos por medio de los cuales los inyectoros automáticos llenan la válvula de inyección, estos métodos son : desplazamiento positivo, por succión y con jeringa.

Los inyectoros automáticos permiten una inyección sin atención, además de que eliminan algunos errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionado por técnicas de inyección manual.

f. Precolumnas. Consisten por lo general en una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de preferencia igual que el de la columna pero con un tamaño de partícula mayor, a través de la cual se hace pasar la fase móvil y la muestra antes de que se introduzcan en la columna. Sirven para proteger y alargar la vida de la columna. (12)

g. Columnas. En todo proceso cromatográfico, la columna es la parte esencial del sistema CLAP, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla de interés. Básicamente consiste en un fragmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme, capaz de resistir altas presiones, el más ampliamente utilizado es el acero inoxidable. La longitud de la columna varía entre 7 y 30 cm y su diámetro interno es de alrededor de 3 - 4 mm, aunque en las columnas de tipo preparativo puede ser hasta de más de 1 cm. (15)

La capacidad de la columna depende por lo tanto de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas más eficaces son las de diámetro pequeño (3 mm) que efectúan análisis más rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido, lo que exige un detector muy sensible.

En la actualidad las columnas empleadas para CLAP ha alcanzado un desarrollo sorprendente, siendo común obtener eficiencias del orden de 50 000 platos teóricos por metro de columna, lo cual es en general superior a las obtenidas en la cromatografía de gases. (16)

h. Fases Estacionarias. Los materiales que se utilizan en cromatografía líquida "clásica", tales como gel de sílice, alúmina, zeolitas, celulosa, etc., se utilizan poco en CLAP por que sus partículas suelen ser muy grandes, de forma irregular y en muchas ocasiones sus propiedades son difíciles de reproducir.

En CLAP el tamaño de partícula es importante por que controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia dentro y hacia afuera de los poros de dicha partícula. A medida que el tamaño de ésta aumenta, el proceso de difusión se hace más lento, es decir, la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria es lenta. Al mismo tiempo hay que considerar que si aumenta el flujo de la fase móvil para obtener análisis más rápidos, el proceso de difusión, que es lento, hace que la columna pierda eficiencia y por lo tanto, resolución.

Conforme disminuye el tamaño de la partícula, la profundidad de los poros también disminuyen el proceso de transferencia de masa se hace más rápido, permitiendo obtener análisis más rápidos sin pérdidas de resolución. Estas razones explican el porqué solo se utilizan materiales porosos cuyo tamaño de partícula es menor a 50 μ . (16)

Otros tipos de materiales utilizados son los llamados adsorbentes pelliculares, "adsorbentes de capa porosa", "de porosidad superficial" o de "centro sólido", consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa fina de adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. Los dos tipos de adsorbentes aunque difieren en muchas de sus propiedades, tienen mucho en común; ambos pueden introducirse en la columna con cierta facilidad dando lugar a altas eficiencias; pueden utilizarse en cromatografía líquido-sólido, dependiendo de la actividad de su superficie, o bien pueden recubrirse de alguna fase líquida y utilizarse en cromatografía líquido-líquido.

Así mismo se pueden unir químicamente en su superficie a alguna fase líquida y crear un nuevo tipo de cromatografía, ya que el proceso efectuado con estos rellenos de columna no son exactamente líquido-líquido o líquido-sólido.(15)

Por otra parte los materiales porosos tienen una gran superficie específica (50 - 500 m²/ gr) y pueden aceptar muestras de tamaño considerable, del orden de mg/gr de relleno, sin perder eficacia. En contraste los materiales pelliculares son de superficies específicas menores (entre 1 y 12 m /gr), aceptan menos muestra, de 10 a 20 veces menos que los materiales porosos , y su costo es considerablemente más elevado. (20).

i. Detectores. El fin de un detector de CLAP es el de monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por lo tanto hacer posible un registro de cómo la composición varía con el tiempo. El detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos:

- Altamente sensible.
- Estable
- De lectura continua
- De respuesta universal.

Hoy en día no existe este detector y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular. (16) El problema de diseñar y construir detectores para cromatografía líquida no ha sido tarea fácil y ha requerido de una tecnología avanzada.

El problema de detección en cromatografía de líquidos (CL) , se entiende mejor si se piensa en el proceso que se debe de llevar a efecto. Hace falta un cierto dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna, por desgracia la mayoría de las propiedades de la muestra que pudieran medirse son muy similares en magnitud y características a las del

disolvente (fase móvil), y eso dificulta el proceso de detección. Para resolver este problema se sugieren dos caminos que consisten: uno, en eliminar el disolvente con anterioridad al proceso de detección, y el otro, en medir alguna propiedad de la solución que contiene la muestra y de alguna manera compensar o sustraer de la propiedad medida aquella fracción que sólo corresponde al disolvente. Por supuesto que esto no es fácil de hacer, porque para lograr una alta sensibilidad se deben de controlar además de parámetro de operación susceptibles de influenciar dichas propiedades de la solución y del disolvente. Por lo general este segundo método requiere un control cuidadoso del flujo y de la temperatura.(15)

Detectores de absorción (U.V/Vís). Estos detectores son los de más uso en CLAP y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es muy amplio.

A la salida de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de fotodetección. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de luz que llega a la fotocelda se reduce al ser absorbida por éstos, ocasionando un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificadas e introducida a un registro o sistema de datos.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta: el de longitud de onda variable y el de longitud de onda fija o fotómetro que utiliza filtros para fijar la longitud de onda a 250 nm.

El fotómetro de luz ultravioleta es relativamente insensible a cambios de flujo y temperatura, y siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro, es muy fácil efectuar programaciones de fase móvil.

Los detectores de longitud de onda variable permiten una gran flexibilidad para optimizar la longitud de onda. Utilizan un monocromador para seleccionar la longitud de onda como un espectrofotómetro. Algunos detectores de longitud de onda variable permiten obtener los espectros de absorción para seleccionar la longitud de onda óptima.

Detectores de índice de refracción. Este detector también es conocido como refractómetro diferencial. Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna. El detector de índice de refracción puede considerarse como universal, pero es poco utilizado en CLAP por las siguientes razones:

- Es menos sensible que los detectores de fluorescencia o ultravioleta.
- Es sensible a variaciones de temperatura, debido a que el índice de refracción cambia con la temperatura.
- Tendencia a romperse y sensible a la presión. También la celda de flujo del detector es muy frágil.
- No puede usarse normalmente para gradientes. Si la composición de la fase móvil cambia, el índice de refracción también cambia.

Detectores de fluorescencia. Estos detectores se basan en que cuando una molécula absorbe energía, los electrones ocupan un estado de energía excitado. Esta energía debe disiparse cuando la molécula regresa a su estado normal o basal. Si la molécula cae instantáneamente a su nivel basal con la emisión de energía en forma de luz se dice que fluoresce. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación.

La cantidad de fluorescencia o eficiencia (F) se puede definir como la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones absorbidos. De tal manera que la eficiencia F tiene un valor máximo de 1.

Las ventajas más grandes de la fluorescencia son la sensibilidad y la selectividad. Se trata de una técnica muy poderosa cuando se realizan análisis de sustancia que existen en muy pequeña cantidad (trazas).

En la actualidad, el detector más sensible de que se dispone es el de fluorescencia. Existen dos diseños básicos de éstos, los llamados fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Ambos equipos rinden buenos resultados. (12)

B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Durante todo el proceso de fabricación, los productos farmacéuticos deben contar con un alto grado de calidad, de manera tal que al final posea las características físicas, químicas y analíticas especificadas. Ante tales requerimientos aumenta cada día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis que permitan verificar dicha calidad.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, principalmente por que es un requisito ante la Secretaría de Salud y por otra parte por que debe probar que funciona para las aplicaciones analíticas deseadas. (4)

1. VALIDACION. *La validación se define como el proceso por el cuál queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos. (18)*

Para que una técnica se considere válida estadísticamente, se deben establecer parámetros estadísticos para evaluar linealidad y precisión del sistema, linealidad, exactitud, precisión, tolerancia y especificidad del método que está siendo evaluado.(28)

Por otra parte, cualquier proceso de medición está sujeto a error. Es de esperarse que el error de un método analítico, deba ser evaluado para determinar su exactitud y establecer su precisión. El error de un método analítico se divide por error sistemático y error aleatorio, los cuales son independientes y aditivos.(28,29).

El Error Sistemático, es aquel que da lugar a medidas incorrectas y por lo tanto la exactitud se ve afectada por este error. Se divide en error constante o absoluto, el cual es independiente de la concentración del fármaco en el medicamento y en error proporcional o relativo el cual depende de la concentración del fármaco en el medicamento. Se clasifican en:

- *Error Instrumental, debido a la mala calibración de equipos o instrumentos.*
- *Error de método, debido a reacciones incompletas o no cuantitativas.*
- *Error operativo, debido a la falta de experiencia del analista con el método analítico y que por ello, omite o realiza defectuosamente la técnica correspondiente*
- *Error personal, debido a la mala apreciación de un resultado, un mal cálculo o una lectura errónea.(29)*

El Error Aleatorio. es aquel error que permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático por lo que da lugar a medidas imprecisas y por lo tanto la precisión del método está determinada por esta clase de error.

Considerando la variedad de métodos, existen diferentes esquemas de validación (21) . Las categorías más comunes que requieren validarse son:

a. Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados (incluyendo conservadores).

b. Categoría II. Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

c. Categoría III. Métodos analíticos para determinar características físicas (p. ej. : disolución, liberación del principio activo, etc.)

En base a lo anterior, los parámetros que deberán considerarse en la validación de métodos analíticos, se enlistan en la tabla No. 1 (ver anexo I)

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. Los parámetros a evaluar en general en un proceso de validación son los que a continuación se definen.

2. LINEALIDAD. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, sean directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Este parámetro se divide en linealidad del sistema y linealidad del método.

Linealidad del Sistema. La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) de una misma solución estándar utilizando cuando menos cinco niveles de concentración y haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos; el nivel central debe corresponder al 100% de la concentración esperada. (23).

Con los resultados obtenidos se deberá elaborar una curva y calcular los siguientes parámetros:

Media (\bar{X}), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV), coeficiente de correlación lineal (r) y error estándar de correlación (r^2). (23)

1) Criterio
 $CV < 1.5\%$
 $r > 0.99\%$
 $r^2 > 0.98\%$

Nota : Para métodos microbiológicos $r > 0.98 \%$

Linealidad del Método. Se determina con placebos adicionados al principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, se realiza con cinco niveles de concentración haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre el nivel central correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del usos y aplicaciones del método (control de calidad y/o indicativo de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación. (23).

Con los datos obtenidos calcular :

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación lineal, error experimental de regresión y sensibilidad, también construir una curva (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) y calcular la ecuación de la recta que indique un modelo lineal.

1) Criterio
 $B = 0.0$
 $m = 1.0$
 $r > 0.99\%$
 $r^2 > 0.98\%$

El coeficiente de variación y el por ciento recuperado depende del tipo de método, que se utilice y deberán estar de acuerdo a la tabla I.

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Cromatográficos	98 - 102%	< 2%
Titrimétricos	98 - 102%	< 2%
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%	< 3%
Microbiológicos	95 - 105%	< 5%

TABLA 1 Valores de CV y por ciento de recobro a considerar para la linealidad del método (23, 24).

Notas: - En métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, la amplitud del estudio dependerá de las cantidades mínima y máxima esperadas.
 - Para suspensiones semisólidos se acepta una ampliación del 1 %

3. PRECISION. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de un muestra homogénea del producto.

Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, etc.). (7, 18, 22)

Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferente laboratorio, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.). Se determina cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra (placebos cargados con el 100% del principio activo).

a. Precisión del sistema. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema con los datos obtenidos calcular media, desviación estándar y coeficiente de variación.

1) Criterio
 $CV > 1.5\%$

Nota : Para métodos microbiológicos $CV < 3\%$

b. Precisión del método (reproducibilidad). Este estudio se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas los cuales deben realizar en un día el análisis por triplicado al 100% de la concentración y en otro día repetir el análisis de la muestra por triplicado. Se deberá trabajar de manera independiente partiendo de una mezcla homogénea del producto cercano al 100% de la concentración teórica.

La evaluación de la reproducibilidad se hace con respecto a una tabla de análisis de varianza (ANADEVA), la cual nos indica la fuente de variación que influye en la obtención de los resultados.

1) Criterio

El coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado. Los valores de CV se muestran en la tabla II

METODO	CV
Cromatográfico	< 2%
Titrimétrico	< 3%
Químicos y Espectrofotométricos	< 3%
Microbiológicos	< 5%

TABLA II Valores de CV para evaluar la precisión del método (13, 14).

4. ESPECIFICIDAD. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Indica el grado de interferencia (o ausencia de esta) en el análisis de mezclas. (22 ,28).

Se determina confrontando el método, por separado, al placebo, placebo cargado (excipientes + estándar) y al estándar y los productos de degradación.

El parámetro de especificidad se realiza dependiendo del tipo de método (control de calidad o indicativo de estabilidad)

1) Métodos de control de calidad. Con el método propuesto:

- Analizar placebos del producto.*
- Identificar la respuesta del (los) activo (s), excipientes en caso de tenerlas, y de otras sustancias auxiliares.*
- Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.*

2) Métodos indicativos de estabilidad. Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia . El analista que realice el estudio deberá escoger aquel de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto sea el más adecuado u otro si así lo considera pertinente.

- Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70°C, 120°C ó a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).

- Exponer la sustancia de interés , el placebo y muestras de lote del producto a la luz U.V o la luz fluorescente y /o humedad.

- Si es necesario hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1 - 2 y/o a 10 - 12 y colocarlas a 60°C - 80°C durante 2 - 4 semanas.

- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con semisólidos pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de 2 - 4 semanas a temperatura ambiente y/o por hidrólisis (pH 1 - 2 y 10 - 12), colocando las muestras a 60°C - 80°C durante 2 -4 semanas (24,8).

- Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación) utilizando cuando menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes:

Cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de gases y/o cromatografía en capa fina.

*Notas: * Se sugiere que la degradación sea tal que la concentración de la sustancia en estudio sea disminuida de 10 a 25 % con respecto a la original.*

* Cuando el pH de las muestras es cambiado, éste debe ser ajustado siempre al pH normal de las muestras antes del análisis a menos que se demuestre que el análisis no es dependiente del pH.

3) Criterio

Verificar que los productos de degradación pueden ser separados de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado (interferencia no mayor del 2%).

- Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.
- De no ser así optimizar el método o desarrollar otro.

5. EXACTITUD. Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo (placebos cargados) .(29)

Se determina analizando de manera independiente y como mínimo seis placebos cargados con el 100% del principio activo . (7, 18)

Con los resultados obtenidos calcular :

Media, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza (IC).

1) Criterio

El IC para la media debe incluir el 100%

El por ciento recuperado y el CV deberán cumplir con los criterio establecidos en la linealidad del método (tab I).

6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación , de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Estabilidad de la muestra analítica. Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer en un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo diferentes condiciones (temperatura ambiente, refrigeración, luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido para cada método analítico.

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

1) Criterio

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no excede los porcentajes establecidos en la tabla VI.

METODO	PORCENTAJE
Cromatográfico	± 2%
Titrimétrico	± 2%
Químicos y Espectrofotométricos	± 3%
Microbiológicos	± 5%

TABLA III Valores del coeficiente de variación para evaluar la estabilidad de la muestra analítica (23).

7. TOLERANCIA DEL SISTEMA. Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales. (22, 18,7).

8. LIMITE DE DETECCION. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones de operación establecidas.

9. LIMITE DE CUANTIFICACION. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.(22)

10. PLACEBO. Es la mezcla de todos los componentes que contiene una formulación, exceptuando el o los principios activos.

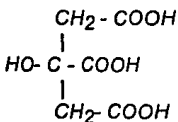
11. PLACEBO CARGADO. Son muestras de placebos a los que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo

C. ACIDO CITRICO

1. NOMBRES QUIMICOS.

- Acido-2-hidroxi-1,2,3- propanotricarboxilico.
- Acido b- Hidroxitricarboxilico.

2. FORMULAS : CONDENSADA Y DESARROLLADA



3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Cristales translúcidos incoloros o polvo cristalino fino o granular blanco, inodoro y de intenso sabor ácido, es insoluble en cloroformo, benceno, bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y tolueno. Soluble en agua: 54% w/w a 10° 59% a 20° ; 64.3% a 30°; 84% a 100°. Punto de fusión 153°.(25)

Cristaliza de soluciones acuosas concentradas y calientes., es un ácido orgánico fuerte. A 25°C pK_1 3.128 ; pK_2 4.761; pK_3 6.396 .(5)

4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

Es importante para el metabolismo energético; además participa en la utilización del calcio de los alimentos, especialmente en la absorción del calcio; en primer lugar reduce el pH en la porción superior del intestino y luego forma complejos cálcicos que pueden atravesar la pared intestinal en el medio alcalino.

El ácido cítrico es también de utilidad para el transporte e incorporación de calcio al tejido óseo.

1) Toxicidad. Su toxicidad es muy baja y es fácil de asimilar.

2) Presentación. En sales efervescentes, jarabes, elixires, polvos y tabletas efervescentes , con dosis que varían desde 80 a 500 mg. (3).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las buenas prácticas de manufactura de la industria farmacéutica el aspecto más importante es el control de calidad de materia primas y producto terminado para el cual generalmente se requiere de métodos analíticos con características de exactitud, precisión y reproducibilidad aceptables para que permitan una adecuada cuantificación del principio activo en una forma farmacéutica, de ahí la necesidad de desarrollar y optimizar métodos analíticos eficientes y confiables que satisfagan éstas cualidades.

El ácido cítrico es un excipiente muy usado en muchas formas farmacéuticas tales como las tabletas efervescentes, su cuantificación es importante desde el punto de vista de la función que se desea obtener del producto con el cual se formula (efecto de efervescencia, el ácido cítrico junto con el bicarbonato de sodio efectúan la disgregación de la tableta y en consecuencia la liberación del principio activo). El ácido cítrico se cuantifica mediante diversos métodos tales como titulación ácido-base, espectrofotometría UV-Vis, análisis microvolumétrico de Puche, análisis microcolorimétrico de Pucher, Sherman y Vickery, etc. El método oficial Farmacopeico es el espectrofotométrico UV-Vis por desarrollo de color, la reacción se lleva a cabo entre el ácido cítrico, piridina, anhídrido acético en medio no acuoso, la cual requiere del control de temperatura de reacción y la ausencia de luz, controlar el tiempo en que inicie la reacción, cuidado en el manejo de los reactivos usados, además de altos tiempos de realización (requiere de 2 a 3 hrs para efectuarse), y alto costo de realización: tanto en costo de reactivos por lote así como el trabajo horas / hombre; por ser un método manual que lo hace poco preciso y sujeto a muchas variables. Ante estas circunstancias se hace necesario implementar un método de análisis el cual sea más práctico, eficiente, confiable y versátil, tal como la Cromatografía de Líquidos en tabletas efervescentes.

Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país, la validación es ahora un requisito cuya finalidad es tener un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación.

De lo anterior se desprende la necesidad de desarrollar un método de análisis para el Ácido Cítrico que pueda ser empleado como método de rutina y como indicativo de estabilidad, y así asegurar que el producto final está de acuerdo al diseño establecido.

IV. OBJETIVOS

A. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de ácido cítrico en tabletas efervescentes por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.

B. Objetivos Específicos.

1. Probar experimentalmente, la fase móvil y la fase estacionaria óptimas para la adecuada separación del principio activo y excipientes en la formulación.

2. Seleccionar las condiciones analíticas y operativas adecuadas para la cuantificación de ácido cítrico.

3. Validar el método analítico propuesto evaluando el sistema y el método a través de los parámetros de exactitud y precisión la concentración de ácido cítrico en las formulaciones que lo contienen.

V. HIPOTESIS

De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de ser un compuesto fácilmente ionizable será posible desarrollar el método para su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa en tabletas efervescentes., así mismo se plantea que el método se utilice como método de rutina al cumplir con las características de especificidad, linealidad , exactitud y reproducibilidad.

VI. METODOLOGIA

A. MATERIAL Y EQUIPO.

1. Material:

Matraz volumétrico de 100 ml, marca Pyrex
Vasos de precipitado de 100 ml, marca Pyrex
Embudo de filtración, marca Pyrex
Pipeta volumétrica de 10 ml, marca Kimax
Matraz volumétrico de 1000 ml marca Pyrex
Probeta graduada de 500 ml marca Pyrex
Membranas de Nylon 66, 0.22 μ y 47 mm de diámetro
Kit de filtración para solventes, marca Millipore
Kit de filtración para membranas, marca Millipore
Papel Whatman No. 1

2. Reactivo:

Acido Citrico estándar de referencia
Acido Fosfórico al 85% , marca Mallinckrot
Acetonitrilo grado HPLC, marca Mallinckrot
Low UV PIC A (tetrabutilamonio hidrógeno sulfato), marca Millipore

3. Equipo:

Baño de ultrasonido, marca Mettler, modelo ME-11
Cromatógrafo de líquidos, marca Waters, equipado con:
Bomba, Waters 600E.
Auto inyector automático Waters 717.
Detector Espectrofotométrico UV / Vis Waters 991 con arreglo de diodos.
CPU modelo sistema personal NEC power MATE SX / 16.
Monitor VGA color
Plotter Waters 5200

1. Preparación de soluciones :

a. **Solvente A.** Transferir a un aforado de 1000 ml, una alícuota de 10 ml del frasco reactivo Low UV PIC A , adicionar 900 ml de agua grado HPLC, ajustar el pH a 2.5 con ácido fosfórico concentrado, diluir y aforar con agua grado HPLC (concentración final 0.025 M) . Filtrar a través de equipo de clarificación de solventes y desgasificar por 15 min en baño de ultrasonido.

b. **Solvente B.** Filtrar 500 ml de acetonitrilo grado HPLC a través del equipo de clarificación de solventes y desgasificar por 15 min en baño de ultrasonido.

c. **Agua acidificada.** A 150 ml de agua grado HPLC ajustar el pH a 2.5 con ácido fosfórico concentrado.

d. **Acido Fosfórico al 1 % .** Tomar una alícuota de 10 de ácido fosfórico al 85% y transferirlo a un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar al aforo con agua grado HPLC y mezclar.

e. **Solución de Referencia. (SR)** Pesar 80 mg de Acido Cítrico estándar de Referencia USP en un volumétrico de 100 ml y adicionar 50 ml de agua acidificada pH 2.5 agitar y llevar al volumen con el mismo solvente. (solución R)

f. **Solución Muestra. (SM)** Pesar en un matraz volumétrico de 100 ml, una cantidad de muestra equivalente de 80 mg de ácido cítrico, exactamente pesados, agregar 50 ml de ácido fosfórico al 1% , sonicar por 10 minutos, diluir al volumen con el mismo solvente. Filtrar en papel Whatman No. 1 o equivalente, desechando los primeros 10 mililitros del filtrado. Pasar el filtrado a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente. (conc. final 800 µg/ ml).

2. Sistema Cromatográfico:

Columna: Nova -Pak C 18 , 3.9 x 150 mm, 5µm

Detector: UV a 220 nm

Flujo: 1.3 ml/ min.

Vol. Inyección: 20 µl.

Fase Móvil. Iniciar con 100% del solvente A después de 2.5 minutos, aumentar en un minuto la composición hasta 80% del solvente B utilizando una curva lineal, mantener composición del flujo durante 2 minutos, regresar a las condiciones iniciales de composición y flujo en un minuto y utilizando una curva lineal, mantener dichas condiciones durante 5 minutos.

3. Procedimiento:

Inyectar al cromatógrafo, por separado y como mínimo seis volúmenes iguales de 20 μ l de la solución de referencia, registrar el área de los picos y calcular el coeficiente de variación ($CV < 1.5\%$) y el factor de coelección ($As < 2\%$). Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo 20 μ l de la solución muestra. Obtener su correspondiente cromatograma y medir el área del pico.

B. CONDICIONES A PROBAR

Para el desarrollo del método para Ácido Cítrico se consideraron las propiedades fisicoquímicas tales como la solubilidad y su pKa. De esta manera dada su estructura química, pKa de 3.1, y la solubilidad del mismo (73.75 % en agua). Se procedió a trabajar el compuesto de la siguiente forma: Puesto que se trata de una especie iónica es posible de desarrollar un método por cromatografía de líquidos en fase reversa, partiendo de que el pKa que el compuesto posee se probó controlando la ionización de este disolviendo al compuesto en un medio acuoso a pH de 2.5. Posteriormente se probó una columna C18 Novapack de 15 cm la cual posee mejor resolución que una μ bondapack para este tipo de especies iónicas. En cuanto a la elección de la fase móvil se probó primero con un buffer de fosfatos:acetonitrilo en la cual se observó una buena separación del ácido cítrico, pero los excipientes de dicha formulación tardan demasiado en salir, obteniéndose que el tiempo de corrida fue de 25 minutos. Se procedió a realizar un gradiente de tal manera que el compuesto de interés saliera en un tiempo relativamente corto y los excipientes salieran más tarde para que el tiempo de la corrida fuese menor., por lo que se utilizó un gradiente variando la composición de la fase móvil a un flujo de 1.3 ml/min de 100% de solvente Pic A LOW UV pH 2.5 por un tiempo de 2.5 min y posteriormente aumentando en un minuto la composición hasta un 80% de Acetonitrilo utilizando una curva lineal, manteniendo esta durante 2 minutos, de donde después se regresa a las condiciones iniciales de composición y flujo en un minuto utilizando una curva lineal, manteniendo dichas condiciones durante 5 minutos., para obtenerse un tiempo final de corrida de 11.0 minutos. La longitud de onda fue seleccionada realizando un barrido a 6 distintas longitudes de onda de la cual la más adecuada fue de 220 nm.

Posteriormente se realizaron pruebas con una muestra real disolviéndola en el mismo sistema acuoso a pH 2.5, para esta se presentó el inconveniente de que al ser inyectado al cromatógrafo no se obtuvo una buena resolución del pico, debido a que en la formulación uno de los excipientes (el carbonato de calcio) provocó que el pH de la muestra se modificara a 3.5 con lo cual la resolución se vio afectada. Para resolver este problema se empleo ácido fosfórico al 1%; con el cual se logró obtener una buena resolución de la muestra, la cual es muy similar al estándar.

C. EVALUACION DEL SISTEMA

1. Linealidad del sistema. Para evaluar este parámetro se preparó una solución "stock de la solución patrón, como se indica en la preparación de la solución de referencia, hasta donde se obtiene la solución (SR) posteriormente para los cinco niveles, se realizó el siguiente procedimiento.

a. Procedimiento. En matraces volumétricos de 100 ml se vertieron los siguientes ml 10,15,20,25 y 30 de la solución SR de ácido cítrico para los niveles de 50, 75, 100, 125 y 150 % respectivamente, con ayuda de pipetas volumétricas, posteriormente se mezclaron y se llevó al aforo con agua acidificada a pH 2.5, se filtró y se inyectaron 20 microlitros al cromatógrafo de líquidos con la ayuda del inyector automático (automuestreador).

2. Precisión del sistema. Para evaluar este parámetro se prepararon seis muestras como se hizo para el nivel del 100% de la linealidad del sistema.

D. EVALUACION DEL METODO ANALITICO.

1. Linealidad del método. Para la determinación de la linealidad del método se prepararon placebos cargados a cinco niveles de concentración y por triplicado cada nivel, para adicionar una cantidad exacta de Acido Cítrico se preparó una solución patrón con materia prima valorada de la siguiente manera:

a Procedimiento. En matraces volumétricos de 100 ml se pesó de manera independiente 1.25 gramos de placebo, y se adicionaron 40, 60, 80 100 y 120 mg de ácido cítrico respectivamente para cada nivel 50, 75, 100, 125 y 150 %, posteriormente se agita en el baño de ultrasonido por 10 minutos, se diluyeron hasta el aforo con el mismo solvente. Se filtró por papel Whatman No. 1 o equivalente, desechando los primeros 10 ml del filtrado, esta solución se filtró a través de un filtro membrana de 0.2 micras y se inyectaron 20 microlitros con la ayuda del automuestreador al cromatógrafo de líquidos, se registraron los resultados de las áreas de los picos obtenidos.

2. Exactitud del método. Para la determinación de la exactitud al 100% , se prepararon diez placebos cargados, las muestras se prepararon de la siguiente manera.

En un matraz volumétrico de 100 ml se pesarán 1.25 gramos de placebo y de manera independiente se cargaron los placebos con 80 mg de ácido cítrico patrón, se agitarán por 10 minutos en el baño de ultrasonido, después se diluyeron hasta el aforo con el mismo solvente. Filtrando en papel Whatman No. 1 o equivalente, desechando los primeros 10 ml del filtrado esta solución se filtró a través de un filtro membrana de 0.2 micras y se inyectaron 20 microlitros con la ayuda del automuestreador al cromatógrafo de líquidos, se registraron los resultado de las áreas de los picos obtenidos.

3. Estabilidad de la muestra. Para determinar la estabilidad de la muestra, se prepararon 9 placebos cargados a concentración de 100% , estas muestras se prepararon de la misma manera que la exactitud.

Al evaluar las muestras para su estabilidad, éstas son sometidas a fiferentes condiciones de almacenamiento (luz, oscuridad y refrigeracion) , las muestras deben ser analizadas antes y después de almacenarse a un tiempo determinado (24 , 48, 72 hrs.) , dependiendo de las condiciones que se fijen para su operación.

4. Especificidad. Para la determinación de la especificidad del método se comparó un placebo solo contra un placebo cargado, y el estándar, cada uno por triplicado, así como de los productos de degradación .

5. Tolerancia. Para la determinación de la tolerancia del método se modificó el pH de la fase móvil, las variaciones realizadas fueron las siguientes:

Se realizaron cambios hacia abajo y hacia arriba del pH que marca la técnica (2.3 y 2.8) para no afectar la estabilidad de la columna.

6. Ranqo. Se hizo en base a los resultados obtenidos para la linealidad del método tomando en cuenta los límites que son de 90 a 110 % de la concentración establecida.

7. Precisión (reproducibilidad). Para la determinación de la reproducibilidad del método se realizó con dos analistas de la siguiente manera:

a. En el primer día cada analista prepara tres muestras de manera independiente de las tabletas de Acido Cítrico como producto terminado y las analiza con el método propuesto.

b. En el segundo día se preparan otras tres muestras de manera independiente de las tabletas con el método propuesto

VII. RESULTADOS

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

<i>Cantidad adicionada</i> <i>mg/ml</i>	<i>Respuesta</i> <i>ABC</i>
0.40	0.22918
0.40	0.22856
0.40	0.22969
0.60	0.34367
0.60	0.34337
0.60	0.34305
0.80	0.45805
0.80	0.45827
0.80	0.45851
1.00	0.57321
1.00	0.57244
1.00	0.57323
1.20	0.68774
1.20	0.67696
1.20	0.68615

TABLA IV . Resultados de la linealidad del sistema para Acido Cítrico

ECUACION DE LA RECTA

$$Y = 0.5692 X + 0.0021$$

$$A = 0.0021$$

$$B = 0.5692$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9997$$

$$CV = 0.1206 \%$$

1. Evaluación de la ordenada al origen.

Hipótesis planteada.

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$S_{y/x} = 0.7284$$

$$S(x_i - \bar{x})^2 = 1.2$$

$$t_{cal} = 0.0037$$

$$t_{tab.} = t_{0.975}(3 \text{ g. l.}) = 2.1604$$

Area de Aceptación

$$t_{\alpha/2} < t_{cal} < t_{1-\alpha/2}$$

CRITERIO

$$t_{cal} < t_{tab.}$$

$$-2.1604 < 0.0037 < 2.1604$$

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen cercano a "cero".

2. Evaluación de la pendiente

Hipótesis planteada

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

$$t_{cal} = -0.6478$$

$$t_{tab.} = 2.1604$$

Area de Aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{cal} \leq t_{1-\alpha/2}$$

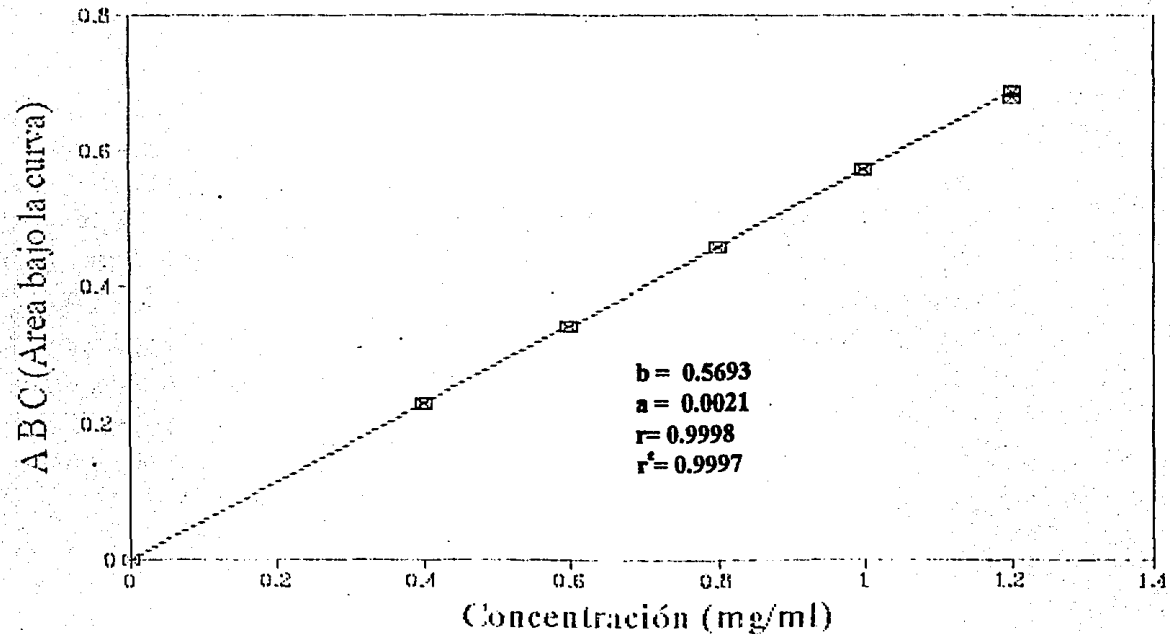
CRITERIO:

$$-2.1604 \leq -0.6478 \leq 2.1604$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente que se puede considerar aproximada a "uno".

Ver gráfica 1 linealidad de sistema para ácido cítrico

LINEALIDAD DEL SISTEMA DEL ACIDO CITRICO



Grafica 1 Linealidad del sistema (% adicionado Vs Area bajo la curva).

B. PRECISION DEL SISTEMA.

<i>Cantidad adi.</i>	<i>Respuesta</i>
<i>mg/ml</i>	<i>ABC</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4579</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4589</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4584</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4545</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4577</i>
<i>0.80</i>	<i>0.4581</i>

TABLA VI Resultados de la precisión del sistema para el Acido Cítrico.

$$Y = 0.4576$$

$$DE = 0.0015$$

$$CV = 0.3445\%$$

1. Criterio

Puesto que el CV < 1.5% , el sistema se considera preciso

C. LINEALIDAD DEL METODO

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% Recuperado
<i>mg/ml</i>	<i>mg/ml</i>	
0.40002	0.405946	101.48
0.40002	0.399634	99.90
0.40002	0.405641	101.40
0.60003	0.607425	101.23
0.60003	0.607321	101.21
0.60003	0.609836	101.63
0.80004	0.810019	101.24
0.80004	0.808306	101.03
0.80004	0.810997	101.36
1.00005	1.011250	101.11
1.00005	1.005600	100.55
1.00005	1.034700	100.46
1.20006	1.209736	100.80
1.20006	1.215039	101.24
1.20006	1.209249	100.76

TABLA VI Resultados de linealidad del método para ácido cítrico.

ECUACION DE LA RECTA

$$Y = -0.0029 X + 1.0203$$

$$A = -0.0029$$

$$B = 1.0203$$

$$r = 0.9979$$

$$r^2 = 0.9959$$

$$cv = 0.4530 \%$$

1. Evaluación de la ordenada al origen.

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A <> 0$$

$$S_{y/x} = 1.3133$$

$$S_{(x_i - \bar{x})^2} = 1.2001$$

$$t_{cal} = 0.0027$$

$$t_{tab.} = t(0.975, 13 \text{ g.l.}) = 2.1604$$

Area de Aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{cal} \leq t_{1-\alpha/2}$$

CRITERIO

$$-2.1604 \leq t_{cal} < t_{tab.} \leq 2.1604$$

0.0027

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

2. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada.

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B <> 1$$

Calculando con la formula 3 del anexo II, tenemos:

$$t_{cal} = 0.0169$$

$$t_{tab.} = 2.1604$$

Area de Aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t_{calc} \leq t_{1-\alpha/2}$$

CRITERIO:

$$-2.1604 \leq t_{cal} < t_{tab} \leq 2.1604$$

0.0169

3. Coeficiente de variación

$$CV = \frac{0.4577}{101.02} \times 100 = 0.4530\%$$

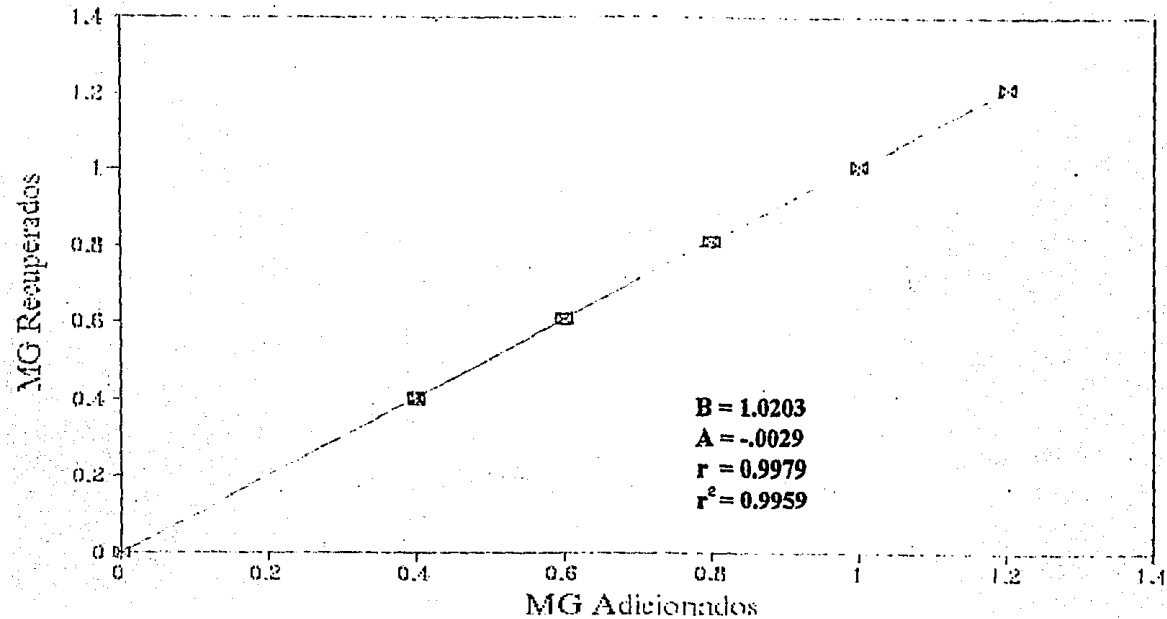
CRITERIO :

El coeficiente de variación debe ser menor al 2%.

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente cercano a "uno".

Ver gráfico 2 linealidad de método de ácido cítrico.

LINEALIDAD DEL METODO DE ACIDO CITRICO



Gráfica 2 Linealidad del método (% Adicionado vs % Recuperado).

D. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

X %	Y%
Adicionado	Recuperado
100	100.7598
100	100.1953
100	98.4585
100	101.2375
100	98.3282
100	98.1980
100	101.6283
100	100.3690
100	101.6934
100	100.8467

TABLA VIII Resultados de exactitud del método al 100 %

1. Con el coeficiente de variación (CV)

$$CV = S/x * 100$$

CRITERIO DE ACEPTACION $CV < 1.5\%$

$$CV = 1.3575\%$$

2. Con el estadígrafo de contraste t de student.

$$H_0: m = 100\%$$

$$H_a: m \neq 100\%$$

$$t_{cal} = 0.3985$$

$$t_{tab} = t(0.975, 9) = 2.262$$

CRITERIO:

1. CV 1.5

$$2. t_{cal} < t_{tab}$$

$$1.3575 \leq 2.262$$

Como $t(0.975) \geq t_{cal} \geq t(0.025)$, podemos considerar al método como exacto.

E. PRECISION.

(Reproducibilidad)

Modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = M + A_i + D_j(i) + e_k(ij)$$

Hipótesis planteada.

Analista

Día

Ho : M1 = M2
Ha : M1 <> M2

Ho : M1 = M2
Ha : M1 <> M2

ANALISTA

		I	II
		100.32	101.46
	I	99.86	100.47
D		99.91	98.69
I			
A		99.36	99.18
	II	100.96	99.47
		100.71	97.35

TABLA VIII. Muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad del método.

Con los resultados anteriores se calcularon los parámetros que se muestran en la tabla IX ver anexo II tabla 2.

ANALISTA

		I	II	
D	I	300.09	300.62	600.71
I				
A	II	301.03	296	597.03
		601.12	596.62	1197.74

TABLA IX Muestra los totales de la tabla VIII.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

<i>FV</i>	<i>gl</i>	<i>SC</i>	<i>MC</i>	<i>Fcal.</i>	<i>Ftab.</i>
<i>Analista</i>	1	1.6875	1.6875	0.9110	38.51
<i>Día</i>	2	3.7047	1.8523	1.8089	6.06
<i>Error</i>	8	8.1920	1.0240		

TABLA X Muestra los resultados obtenidos para el análisis de varianza en la evaluación de la reproducibilidad del método.

CRITERIO:

Se compara el valor de $F_{gl, gl; 0.05}$ y $F_{gl, gl; 0.05}$ contra los valores calculados de F_a y F_d , respectivamente:

$Sí$ el valor de $F_a < F_{gl, gl; 0.05}$ el método analítico es reproducible por los analistas.

0.9110 < 38.51 Por lo tanto el método analítico es reproducible por los analistas.

$Sí$ el valor de F_d es menor que $F_{gl, gl; 0.05}$ el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

1.8089 < 6.06 Por lo que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

El coeficiente de variación fue calculado como sigue:

$$CV = \frac{1.1112}{99.81} \times 100 = 1.1130\%$$

Como $CV < 2\%$ se cumple con el criterio para métodos cromatográficos

F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

CONDICION - TIEMPO

t0/luz	t0/obsc	t0/ref.	luz/24 h	luz/48 h	obs/24 h	obs/48 h	ref/24 h	ref/48 h
101.23	101.62	100.75	101.32	100.43	101.35	100.47	100.12	100.53
98.32	100.36	100.19	99.41	98.37	101.27	100.66	99.47	100.32
98.19	101.69	98.45	98.47	98.66	100.49	100.12	100.23	98.10
$\bar{x}=99.2$	101.22	99.80	99.73	99.15	101.04	100.42	99.94	99.65

TABLA XI Resultados de la estabilidad de la muestra analítica

1. Intervalo de confianza para cada condición por tiempo

Condición / Tiempo	IC
LUZ / 24 hrs	-1.99 - 2.96
LUZ / 48 hrs	-2.35 - 2.16
OBSC. / 24 hrs	-1.16 - 0.79
OBSC. / 48 hrs	-1.68 - 0.07
REF / 24 hrs	-1.25 - 1.54
REF / 48 hrs	-2.13 - 1.84

TABLA XII Tabla de intervalo de confianza condición / tiempo.

CRITERIO:

Las muestras son estables a luz, oscuridad, y refrigeración por 48 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor de "cero".

2. Coeficiente de variación para el análisis de las muestras por Condición / Tiempo (I).

Condición / Tiempo	I (%)
Luz / 24 hrs	100.48
Luz / 48 hrs.	99.90
Obsc. / 24 hrs.	99.81
Obsc. / 48 hrs.	99.20
Ref. / 24 hrs.	100.15
Ref. / 48 hrs.	99.84

TABLA XIII Valores de coeficiente de variación de muestras de Acido Cítrico por condición / tiempo.

CRITERIO:

La muestra es estable a luz, obscuridad y refrigeración y por 48 horas, ya que I se encuentra entre los valores de 98 a 102%.

G. ESPECIFICIDAD

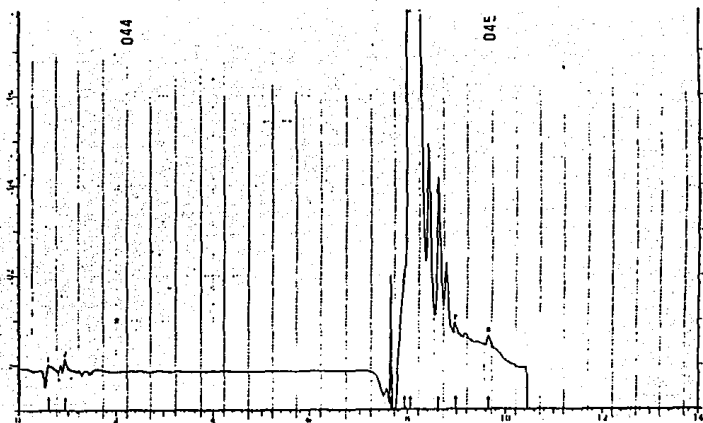
Los resultados obtenidos para la especificidad se muestran en el cromatograma 1 placebo solo en el cual se observó que no existe interferencia de ningún otro pico que pueda sumarse al pico del Acido Cítrico.

H. TOLERANCIA DEL METODO

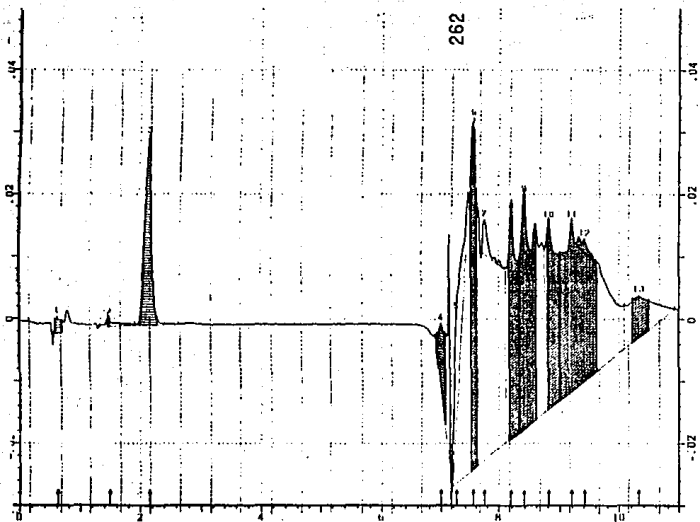
La tolerancia del método, se comprobó modificando las condiciones de la fase móvil (pH).

A pH de 2.3 y de 2.8, el método no dio respuesta por lo tanto el método no es tolerable a los cambios de pH a los que fue sometido, por lo que se deberá cuidar de no trabajar bajo estas condiciones.

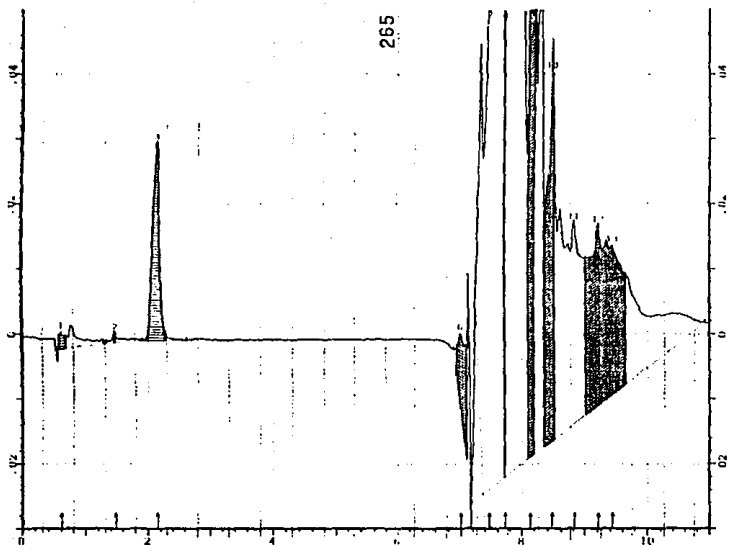
ESPECIFICIDAD FRENTE A EXCIPIENTES



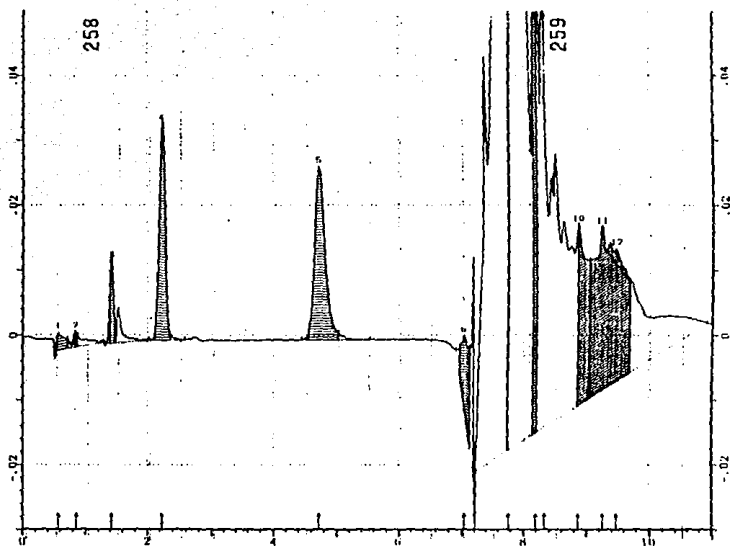
Cromatograma 1 Nos muestra la respuesta de un placebo solo observandose que no aparece otro pico que pueda sumarse al del activo en estudio.



Cromatograma 2. Nos muestra la respuesta del Estandar de referencia de Acido Cítrico pico No 3 el cual se presenta en mismo tiempo de retención del placebo cargado



Cromatograma 3. Nos muestra la respuesta de un Placebo Cargado de Acido Cítrico donde podemos observar el pico No. 3 corresponde al compuesto de interes.



Cromatograma 4. Nos muestra los Productos de degradación (Acido salicílico pico No. 5) en la formulación de las tabletas Acido Cítrico las cuales fueron sometidas a humedad . De donde se observo que el pico de interes (pico No. 3) no se ve modificado.

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

La validación del método analítico para la determinación del ácido cítrico se realizó tomando en cuenta los parámetros mínimos establecidos por el laboratorio (linealidad y precisión del sistema, linealidad precisión, exactitud del método así como la estabilidad de la muestra y la tolerancia y especificidad del método).

Al evaluar la linealidad del sistema como se puede observar en los resultados obtenidos en la grafica 1, se encontró que el sistema es lineal ya que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida por el equipo, resultando una ordenada al origen y una pendiente satisfactorias para un modelo lineal simple.

Para la precisión del sistema, considerando los resultados experimentales, se encontró que el sistema es preciso ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor de 1.5 (0.3445), en las condiciones de operación a las que fue sometido.

Para la linealidad del método , tomando en cuenta los resultados experimentales de la grafica 2 , se observó que existe una relación lineal, entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y) , siguiendo un modelo de regresión lineal simple.

Para la exactitud al 100% , como se aprecia en los resultados obtenidos en la tabla VII, se deduce que el método es exacto, ya que el CV resulto ser menor a 1.5 por lo que puede ser empleado para la cuantificación del ácido cítrico.

Para la reproducibilidad del método, como lo demuestran los resultados obtenidos experimentalmente no existe una diferencia significativa entre analista, y tampoco en el día, por lo tanto puede ser realizado por cualquier analista y en cualquier día.

Los resultados de estabilidad de la muestra demuestran que esta es estable a temperatura ambiente por 24 y 48 horas, después de preparada, ya sea que se almacene a temperatura ambiente o en refrigeración.

Para la especificidad del método como se aprecia en el cromatograma No 4 no existe interferencia con los productos de degradación, en este caso uno de estos productos de degradación es el ácido salicílico así como de ninguno de los excipientes de la formulación de la tableta por lo que puede ser utilizado en pruebas de rutina y como indicativo de estabilidad.

Los resultados de tolerancia del método demostraron que no es tolerable a los cambios de pH (2.3 y 2.8), debido a que se elimina la supresión de la ionización para el ácido cítrico.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Finalmente con respecto al desarrollo del método podemos mencionar que dicho método se trato que fuese sencillo, rápido y barato.

IX. CONCLUSIONES

Una vez finalizado este trabajo podemos decir que el método propuesto para cuantificar Acido Citrico en tabletas solubles como producto terminado es adecuado de acuerdo a todos los parámetros evaluados.

La respuesta obtenida por el sistema es lineal y preciso.

El método es lineal, exacto, preciso y reproducible, bajo las condiciones de operación normal.

El método propuesto es específico para pruebas de rutina (control de calidad) ya que no existe interferencia con los productos de degradación(ver cromatograma 4).

Las muestras son estables por lo menos 24 horas.

Por todo lo anterior podemos concluir que el método analítico propuesto cumple con los requisitos analíticos deseados y por lo tanto puede emplearse como método rutinario en la cuantificación de ácido Citrico en tabletas solubles como producto terminado.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Remington, "Farmacia", 17a ed., Ed. Medica Panamericana S.A., Buenos Aires Argentina, Vol. II, p.1787. (1987).
2. Martindale. "The Extra Pharmacopeia", 27a ed., Aidley Wade, Publidhrf by: The Pharmaceutical Press, (1977). p 1558
3. Del Pozo A., "Enciclopedia Farmacéutica De Drogas y Productos Químicos", Ed. Científico Médica, España, Tomo I, p. 272, (1962).
4. Diario Oficial de la Federación, Tomo CDDXII, No.11, México, D.F., Lunes 18 de Enero, 1988.
5. Farmacopea De Los Estados Unidos Mexocanos, 5a. Ed. (1988). p. 584
6. Memorias del Curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución impartido por Millipore, México, D.F., Agosto. 1992.
7. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación la Dirección General de Control de insumos para la salud, Secretaria de Salud, "Métodos Analíticos, Validación ", 1990.
8. Guerra, J., "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories", Pharm. Technol., March 1986, p. 74 -84.
9. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas; Ed. P.L.M. S.A de C.V.; 35a. ed Méx. 1993. p 227,228,458-460.
10. Boehlert, J.P., "Assay Development in Stability Test Methods", Drug Development and Industrial Pharmacy, 10, (8,9) p 1343 - 1371, (1984).
11. Yost, R.W., "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica", Perkin Elmer, México, D. F., 1980. p 31-40
12. Memorias del Curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución impartido por Perkin Elmer, México, D.F., Junio 1989. p 35-45
13. Snyder, L. R. and. Kirkland, J.J., " Introduction to Modern Liquid Chromatography., 2a. ed., Jhon Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A (1979). p 45-51

14. *Cromatografía de Líquidos de Alta resolución*, Editado por Millipore Div. Waters Associates Inc., México, D.F., (1992). p 2-9
15. Johnson, E.L., "Basic Liquid Chromatography", Varian Associates, Inc., Library of Congress Catalog, Palo alto California, U.S.A., (1987).
16. Harod, M.M., "Cromatografía Líquida de Alta Presión", 2a ed., Secretaría de la Organización de los Estados de Washington, D.C., (1980).
17. Dennis, R., Recent Advemces om HPLC Technology., Pharm Int., June, 1984 :142-146.
18. Asociación Farmacéutica Mexicana. "Taller de Validación", AFM. 1987.
19. Harold M. Mc Nair. "La Cromatografía de Líquidos no Reemplaza a la Cromatografía de Gases.", Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas., 5(5), 70-71 (1974).
20. García de M.A., "Cromatografía Líquida de Alta Resolución", 1a Edición, Editorial Limusa, S.A., de C.V., México, D. F., 1980.
21. Irman, E.L., "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples", Journal Chromatograpy Science., 25(7) 1987.
22. Pharmaceutical Manufactures Association. "Current Concepts for Validation of Compendial Assays". *Pharmaceutical Forum*, 1986, p1241.
23. "Metodos Analíticos de Validación ". Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud SSA.
24. *Requisitos Mínimos Para La Validación De Métodos Analíticos*. Comité de Elaboración de Guías Oficiales.
25. *The Meck Index*, Elevent Ed., USA, 1989, p. 363.
26. *Analytical Methods Validation en Pharmaceutical Process Validation*, Loftus T.B. and Nash A.R. (editor), Marcel Dekker Inc., New York, 1984.
27. LUAL, " Componentes para programas de validación de métodos analíticos" Pharma News (4), 39-42. (1993)
28. Lee, M.L., Taylor M. and Dantrowits J. "Statistical Evaluation of Quality Control Test" Pharma. Technol. (19), 108-120, (1988).
29. LUAL "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos" Pharma News. (4).32-44, 1993.

30. Duarte J:E and Vest D.K. " Validating Alternate Laboratory Assay Methods". Pharma Technol. (3), 60-66, 1979.

31. Carey R.N., Wold S. and Westgard J.O. " Principal Compent Analysis: An Alternative to Referee Method Comparison Studies ". Anal. Chem. (47), 1824-1829, 1975.

ANEXO I

	I	II	A	III
PARAMETRO			A	B
<i>Linealidad y precisión</i>	X	X	X	X
<i>Exactitud</i>	X	*	X	
<i>Límite de detección</i>		*		X
<i>Límite de cuantificación</i>		*	X	
<i>Reproducibilidad</i>	X	X	X	X
<i>Especificidad (interferencia)</i>	X	*	X	X
<i>Especificidad (en estabilidad)</i>		*	X	X
<i>Estabilidad de la muestra</i>	X	X	X	X

TABLA 1 Parámetros mínimos para validar métodos analíticos (23,24).

* Puede ser requerida, depende de la naturaleza de las especificaciones de la prueba.

Donde:

I: Control de calidad.

II: Métodos analíticos en pruebas de biodisponibilidad , como ejemplo disolución , fármacos de liberación controlada, etc.

III: Métodos analíticos indicativos de estabilidad.

A = Métodos analíticos cuantitativos.

B = Métodos analíticos para pruebas límite.

ANEXO II

1. Linealidad.

$$S_{y/x} = \frac{Y^2 - a y - b xy}{n - 2} \quad \dots\dots 1$$

a. Evaluación de A (a).

$$t_{cal} = \frac{a - A}{S_{y/x} \left(\frac{x^2}{n} - \frac{(\sum x_i)^2}{n^2} \right)^{1/2}} \quad \dots\dots 2$$

* Criterio de Aceptación. Si $t(0.975, n-2) > t_{cal} > t(0.25, n-2)$ el método se acepta y podemos decir que tiene una ordenada al origen considerada como "cero".

b. Evaluación de B (b).

$$t_{cal} = \frac{(b - B) \cdot S_{y/x} (n-1)^{1/2}}{S_{y/x}} \quad \dots\dots 3$$

* Criterio de Aceptación. Si $(t_{a/2} \leq t_{cal} \leq t_{1-a/2})$, el método se acepta y podemos decir que tiene una pendiente considerada como "uno".

2. Exactitud.

$$t_{cal} = (x - m) / (DE / n) \quad \dots\dots 4$$

* Criterio de aceptación. $t(0.975, n-1) > t_{cal} > t(0.25, n-1)$

* Si se acepta consideramos al método como exacto.

3. Reproducibilidad.

Modelo Matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + \varepsilon_{k(ij)}$$

Y_{ijk} = el ensayo de la sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el i ésimo analista en el j ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$).

$\delta_j(i)$ = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1 \dots d$).

$\varepsilon_{k(ij)}$ = error del método analítico (donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas (donde $a = 2$)

d = número de días. (donde $d = 2$)

r = número de replicaciones (donde $r = 3$)

Calcular:

$$Y_{1.} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} \qquad Y_{21.} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{.1} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} \qquad Y_{22.} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

Suma de cuadrados de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{2j}^2 = (y_{11})^2 + (y_{12})^2 + (y_{21})^2 + (y_{22})^2$$

Suma de cuadrados de cada analista en los dos días :

$$(\sum y_{i..})^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

Suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

Suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_{2i}^2}{dr} - \frac{y_{2..}^2}{adr}$$

Suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la fórmula:

$$SCd = \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{dr}$$

Suma de cuadrados del error (SCe) con la fórmula :

$$SCe = \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r}$$

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	gl	SC	MC	Fca1	Ftab
Analista	a - 1	SCa	MCa=SCa/ gla	Fa=MCa/ MCd	Fgla/gld
Día	(d - 1)a	SCd	MCd=SCd/ gld	Fd=MCd /MCe	Fgld/gle
Error	(r-1)ad	SCE	MCE=SCe/ g/e		

TABLA No. 2 Muestra los cálculos para la evaluación de la reproducibilidad del método.

F 0.05* = Los valores de F0.05 se obtienen de la tabla de F, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para un $\alpha = 0.005$

Interpretación de resultados :

Si $F_a < F_{gla, gld}; 0.05$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{gla, gld}; 0.05$ El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{gld, gle}; 0.05$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d \geq F_{gld, gle}; 0.05$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

4. Estabilidad de la muestra.

$$Y_{ij}^2 = (Y_{a1})^2 + (Y_{a2})^2 + \dots + (Y_{d5})^2 + (Y_{d6})^2$$

$$Y_i.^2 = (Y_a)^2 + (Y_b)^2 + (Y_c)^2 + (Y_d)^2$$

$$SCE = Y_{ij}^2 - Y_i.^2 / r$$

$$MCE = SCE / t (r-1)$$

$$tD = Y_n - (Y_n / 2MCE / r)$$