



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

**Diseño de un método analítico en microescala
Para la valoración de citrato de tamoxifeno
como materia prima.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:
Federico Barajas Cervantes

Director de tesis:
M. en C. Vicente J. Hernández Abad
Asesor de tesis:
M. en C. Elizabeth G. Sánchez González



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Índice

No. de página

1. Introducción.....	5
2. Marco Teórico.....	6
2.1. Método Analítico Farmacopéico de Citrato de tamoxifeno.....	7
2.2. Propiedades del fármaco.....	8
2.3. Propiedades de los reactivos involucrados.....	10
2.4. Validación.....	11
2.4.1. Definiciones.....	11
2.4.2. Beneficios de la validación.....	13
2.4.3. Plan de Prueba Para la Validación.....	14
2.4.4. Procedimiento para evaluar los parámetros de desempeño.....	14
2.5. Comparación de dos métodos analíticos.....	22
2.5.1. Especificidad.....	22
2.5.2. Repetibilidad en exactitud.....	22
2.5.3. Repetibilidad en linealidad.....	22
2.5.4. Exactitud.....	22
2.5.5. Linealidad del método.....	22
2.5.6. Precisión del método.....	22
2.6. Estudios de correlación entre métodos.....	23
2.6.1. Definiciones.....	23
2.6.2. Procedimiento para evaluar la correlación entre métodos.....	23
2.6.2.1. Proporcionalidad.....	23
2.6.2.2. Precisión.....	24
2.7. Microescala.....	25
2.8. Métodos volumétricos de análisis.....	27
2.8.1. Definiciones.....	27
2.8.2. Clasificación de los métodos volumétricos.....	27
2.8.2.1. Métodos directos.....	28
2.8.2.2. Métodos indirectos.....	28
2.8.2.3. Métodos por retroceso.....	29
2.8.3. Detección del punto final.....	29
2.8.3.1. Métodos visuales.....	29
2.8.3.2. Métodos eléctricos.....	30
2.8.4. Titulaciones en disolventes no acuosos.....	31
3. Planteamiento del Problema.....	33
4. Objetivos.....	34
5. Hipótesis.....	35
6. Diseño Experimental.....	36
6.1. Población de Estudio.....	36
6.2. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	36
6.2.1. Criterios de inclusión.....	36
6.2.2. Criterios de exclusión.....	36
6.3. Variables.....	37
6.4. Materiales.....	37
6.5. Equipos.....	37
6.6. Reactivos.....	38
6.7. Metodología.....	38
6.8. Diagrama de Flujo.....	41
7. Resultados y análisis de resultados.....	42
7.1. Precisión del método al 100% con potenciómetro.....	42
7.2. Precisión del método al 100% con solución indicadora.....	43
7.3. Exactitud del método al 100% con potenciómetro.....	44
7.4. Exactitud del método al 100% con solución indicadora.....	45

Índice

No. de página

<i>7.5. Precisión del método al 50% con potenciómetro.....</i>	46
<i>7.6. Precisión del método al 50% con solución indicadora.....</i>	47
<i>7.7. Exactitud del método al 50% con potenciómetro.....</i>	48
<i>7.8. Exactitud del método al 50% con solución indicadora</i>	49
<i>7.9. Precisión del método al 10% con potenciómetro.....</i>	50
<i>7.10. Precisión del método al 10% con solución indicadora</i>	51
<i>7.11. Exactitud del método al 10% con potenciómetro.....</i>	52
<i>7.12. Exactitud del método al 10% con solución indicadora.....</i>	53
<i>7.13. Intercomparación de métodos usando ANADEVA.....</i>	54
<i>7.14. Linealidad del método al 100 % con potenciómetro.....</i>	63
<i>7.15. Linealidad del método al 10 % con solución indicadora</i>	65
<i>7.16. Precisión intermedia del método al 100% con potenciómetro.....</i>	67
<i>7.18. Precisión intermedia del método al 10 % con potenciómetro.....</i>	68
<i>7.19. Resumen de resultados.....</i>	69
8. Conclusiones.....	70
9. Referencias.....	71
Apéndice 1.....	73

Este proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, bajo la dirección del M. en C. Vicente J. Hernández Abad con la asesoría de la M. en C. Elizabeth G. Sánchez González, apoyado con recursos del proyecto PAPIIME EN215403, “Implementación de técnicas en microescala en la enseñanza experimental de química en los laboratorios de docencia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza”.

1. INTRODUCCION

La Química a microescala en el campo docente ha tenido un desarrollo muy vigoroso en las áreas de la Química General y de la Química Sintética (orgánica e inorgánica) para mostrar la reactividad de diversos sistemas de interés básico, ambiental, industrial, etc. con un gran impacto en la disminución de costos, tiempos de operación y residuos.

El microescalamiento en Química Analítica se ha desarrollado ampliamente en Investigación y Desarrollo Analítico desde la época de los años cincuentas tanto en electroquímica analítica como en espectrofotometría y sobre todo en los métodos de separación cromatográficos. La miniaturización de la tecnología electrónica permitió diseñar aparatos, instrumentos y sistemas analizadores cada vez más pequeños con la consecuente disminución de cantidades de muestras complejas.

Conforme la preocupación por el medio ambiente, la seguridad y los elevados costos de operación de los laboratorios ha ido creciendo, se ha hecho más patente la necesidad de reducir la escala de los métodos analíticos en los laboratorios escolares e industriales. La tendencia a disminuir la escala ha llegado a lo que actualmente se conoce como microescala.

El cuidado del medio ambiente, adquiere cada día una mayor importancia debido a que se ha creado una conciencia de protección al medio ambiente y los recursos naturales, es por ello que los métodos analíticos en microescala, contribuyen con la ecología y también contribuyen a la seguridad de los laboratorios analíticos además de que son técnicas muy económicas.

Para el caso de tamoxifeno citrato, el método analítico oficial de la Farmacopea de los estados unidos Mexicanos 7^a edición, implica el gasto de 75 mL de ácido acético glacial, 500 mg de tamoxifeno citrato y aproximadamente 10 mL de ácido perclórico (dependiendo de la valoración de este), el empleo de un método analítico a microescala que permita reducir el gasto de ácido acético, tamoxifeno citrato y ácido perclórico, contribuye en gran medida a la conservación del medio ambiente y aumenta la seguridad en el análisis de laboratorio y el costo de método analítico.

Con el presente trabajo se desarrolló un método analítico a microescala para economizar recursos propios del análisis farmacopeico para la valoración de citrato de tamoxifeno, así como disminuir el riesgo humano y ecológico, utilizando este método a microescala que demuestre que no existe diferencia significativa de la precisión y exactitud con respecto al método original, por medio de una intercomparación de métodos aplicando anadeva y validando el método.

2. MARCO TEÓRICO

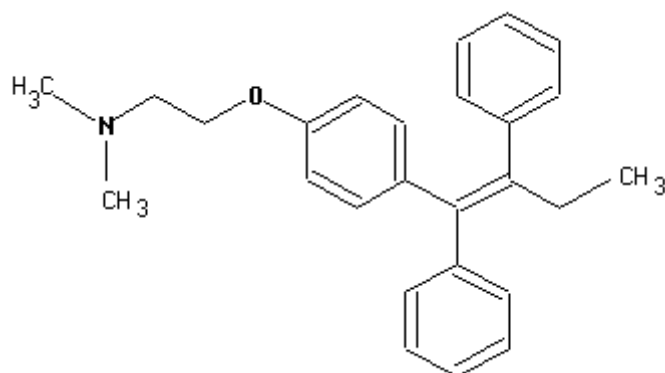
Para la realización del presente trabajo, fue necesario revisar los siguientes conceptos y temas relacionados con el método analítico, propiedades del fármaco, propiedades de los reactivos involucrados así como todo lo referente a validación de métodos analíticos, microescala y métodos volumétricos de análisis.

2.1 Método Analítico Farmacopéico de Citrato de tamoxifeno

Pesar 500 mg de Tamoxifeno citrato en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, disolver con 75 mL de ácido acético glacial, titular con ácido perclórico 0.1 N determinando el punto final potenciométricamente, usando un electrodo de vidrio y electrodo de plata – cloruro de plata como referencia. Hacer un blanco y efectuar las correcciones necesarias. Cada mL de solución 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 56.36 mg de Citrato de tamoxifeno.^{7,8}

2.2 Propiedades del fármaco

Tamoxifeno.



(Z)-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine;
1-p-beta.-dimethylaminoethoxyphenyl-trans-1,2-diphenylbut-1-ene.

Fórmula molecular: $C_{26}H_{29}NO$; Peso molecular: 371.52 g/mol; composición: C 84.06%, H 7.87%, N 3.77%, O 4.31%.

Propiedades: Punto de fusión 96-98°C

Derivado: Citrato

Nombre comercial: Kessar (Farmitalia), Noltam (Lederle), Nolvadex (Zeneca), Nourytam (Nourypharma), Tamofen (Rhone-Poulenc), Tamoxasta (Asta), Zemide (Wyeth).

Fórmula: $C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$

Propiedades: polvo cristalino blanco, inodoro, punto de fusión 140-142°C. Poco soluble en agua; soluble en etanol, metanol y acetona. Higroscópico a humedades relativas altas. Sensible a la luz. LD₅₀ en ratones y ratas: 200 mg/kg, 600 mg/kg i.p.; 62.5 mg/kg, 62.5 mg/kg i.v.; 3000-6000 mg/kg, 1200-2500 mg/kg oral.

Indicaciones terapéuticas: está indicado en el tratamiento de los tumores hormonosensibles dependientes de estrógenos, como es el caso del carcinoma mamario en fase avanzada, tanto en las mujeres pre y posmenopáusicas. Los pacientes con resultado positivo en la determinación de receptores estrogénicos (100 moles/mg de proteínas), tiene una mayor posibilidad de respuesta que aquellas con receptor estrogénico negativo. También está indicado en pacientes con cáncer mamario y metástasis ósea.

Farmacocinética y farmacodinamia en humanos: La acción antineoplásica de tamoxifeno se debe principalmente al bloqueo competitivo que ejerce sobre el estradiol a nivel de receptores específicos citoplásmicos y su posterior acción en sitios receptores particulares del núcleo celular.

De esta manera el tamoxifeno impide la incorporación del estradiol al núcleo necesario para mantener el crecimiento hormonal. La acción antiestrogénica de tamoxifeno solamente se lleva a cabo en los tejidos cuyas células responden normalmente a la estimulación estrogénica para su crecimiento y desarrollo.

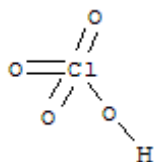
El tamoxifeno se absorbe lentamente luego de su administración oral, el nivel plasmático máximo se alcanza después de 4 a 7 horas de ingerido. Concentraciones estables de tamoxifeno se obtienen solo después de aproximadamente 30 días de tratamiento.

Una vez absorbido, el tamoxifeno tiene una fase de distribución relativamente rápida con una vida media terminal de 7 días, tiene una conversión metabólica por hidroxilación y conjugación. El derivado monohidroxiado presenta mayor actividad antiestrogénica que el compuesto original o el metabolito de hidroxilación. Los glucurónidos y otros metabolitos se excretan en heces, la excreción urinaria es mínima.

^{13,14}

2.3 Propiedades de los Reactivos Involucrados

Acido perclórico.



Fórmula HClO_4 ; Peso molecular 100.46 g/mol; Composición Cl 35.29%, H 1.00%, O 63.71%.

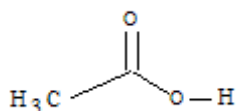
Propiedades: El ácido perclórico anhidro es un líquido incoloro, volátil, muy higroscópico.

Comercialmente existe en solución acuosa al 60-70% de HClO_4 , densidad 1.5 y 1.6 g/mL, respectivamente. La solución acuosa es extremadamente cáustica.

Precaución: Corrosivo al contacto con la piel, y membrana mucosa.

USO: En química analítica como oxidante y para separar potasio de sodio. La sal se usa en explosivos. ¹⁴

Acido acético glacial.



Fórmula: CH_3COOH ; peso molecular 60.05 g/mol; Composición: C 40.00%, H 6.71%, O 53.28%.

Propiedades: Líquido con olor penetrante. Produce quemaduras en la piel, punto de ebullición 118°C . punto de fusión 16.7°C . Punto de inflamación en recipientes cerrados: 103°F (39°C). Precaución: flamable. Es un excelente solvente para muchos compuestos orgánicos. Miscible en agua, alcohol, glicerol, éter y tetracloruro de carbono. Prácticamente insoluble en disulfuro de carbono. Se ioniza débilmente en agua: pKa 4.74. pH de la solución acuosa 1.0M = 2.4; 0.1M = 2.9; 0.01M = 3.4. LD₅₀ en ratas: 3.53 g/kg oral. Incompatible con carbonatos, hidróxidos, algunos óxidos, y fosfatos. Precaución: la ingestión puede causar corrosión severa de boca y tracto G.I. con vómitos, hematemesis, diarrea, colapso circulatorio, uremia, muerte. La exposición crónica puede causar erosión del esmalte dental, bronquitis, irritación ocular.

USO: Manufactura de varios acetatos, compuestos acetilados, acetato de celulosa, rayón, plásticos y hules; como acidificante y preservativo en alimentos; solvente para gomas, resinas volátiles, aceites. Ampliamente usado en síntesis orgánica comercial.

Uso terapéutico (VET): Vesicante, cáustico, destructor de verrugas. ¹⁴

2.4 Validación

2.4.1 Definiciones

Validación: La validación es la evidencia documentada que provee un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico o equipo, producirán de manera consistente un producto de calidad predeterminada.

La validación de un método analítico puede definirse como: el proceso mediante el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

También puede definirse como: La actividad documentada que permite demostrar que un método analítico cumple con su propósito. ^{1,2,3,4,5,6,24}

Analito: Es el componente específico a cuantificar o identificar en un Análisis Químico. ²⁴

Cantidad Mínima Cuantificable: Es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser medida con exactitud y precisión aceptable y comprobable mediante métodos estadísticos. ²⁴

Cantidad Mínima Detectable: Es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no cuantificada. ²⁴

Desviación estándar: Es la medida de dispersión de un conjunto de valores respecto de su valor promedio. ¹⁶

Coefficiente de variación: Es el valor que resulta de dividir la desviación estándar entre el promedio multiplicada por 100. Al coeficiente de variación también se le conoce como desviación estándar relativa. ¹⁸

Especificidad: Es la característica de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. ^{1,2,3,4,5,6}

Estabilidad Analítica de la Muestra: Propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y microbiológica, y la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. ^{1,2,3,4,5,6}

Evaluación Retrospectiva de Métodos Analíticos: Estudio basado en la información histórica y bibliográfica de un método analítico, que permite evaluar la precisión y exactitud de un método analítico. ²⁴

Exactitud: Expresa la concordancia entre el valor obtenido y valor conocido del analito en las muestras, al analizar aplicando un método analítico. Generalmente se expresa como porcentaje de recobro. ^{1,2,3,4,5,6}

Linealidad: Es la habilidad del sistema o del método analítico, para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, sean proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo definido. ^{1,2,3,4,5,6}

Límite de detección: Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. ^{1,2,3,4,5,6}

Límite de cuantificación: Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificado con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro de contenidos cuantitativos a bajos niveles de concentración del analito en la muestra y es usado particularmente en la determinación de impurezas y/o productos de degradación. ^{1,2,3,4,5,6}

Método Analítico: Descripción de una o más técnicas en las cuales se identifican los recursos materiales, la secuencia de actividades y procedimientos normalizados de operación. ²⁴

Métodos Analíticos de Identificación: Métodos que incluyen pruebas de barrido de IR, calorimetría de exploración diferencial (CED), difracción de rayos X, barrido al UV, tiempo de retención de HPLC, colorimetría, etc. ²⁴

Métodos analíticos para evaluar la estabilidad: Métodos analíticos cuyo propósito es cuantificar al analito obteniendo una respuesta debida única y exclusivamente a la sustancia de interés y no a sus posibles sustancias de degradación. ^{6,24}

Métodos Analíticos de Contenido: Métodos que permiten cuantificar el analito, que puede ser el activo, conservadores, excipiente o impureza entre otras. ^{6,24}

Métodos Límite. Métodos que permiten determinar la presencia o ausencia de un analito (ej.: impureza). ^{6,24}

Métodos Analíticos no oficiales: Son aquéllos que aparecen en la literatura técnica reconocida. ^{6,24}

Muestra Analítica: Es la cantidad representativa de un lote, que es objeto de evaluación en un laboratorio de control de calidad. ^{6,24}

Matriz Analítica Adicionada: Muestra de constitución conocida, que se emplea en la validación de métodos analíticos, que contiene además de los componentes de la muestra, una cantidad conocida del analito. ^{6,24}

Precisión: Expresa la concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea

del producto. La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y generalmente se expresa como coeficiente de variación.^{1,2,3,4,5,6}

Protocolo de Validación: Documento de un plan retrospectivo o prospectivo experimental, que cuando es llevado a cabo, es encaminado a producir evidencia documentada de que una metodología analítica ha sido validada.^{6,24}

Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. También se le conoce como precisión intra contenido.^{1,2,3,4,5,6}

Precisión intermedia: Expresa la precisión con diferentes analistas y en días diferentes.^{1,2,3,4,5,6}

Recobro: Cuantificación de la cantidad conocida del analito, determinado en el placebo analítico adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico de interés.^{6,24}

Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios diferentes.^{6,24}

Revalidación: Repetición de la validación de una metodología analítica o parte de ésta.^{1,2,3,4,5,6}

Rango: Es el intervalo entre los niveles de concentración alta y baja del analito, estudiadas en la linealidad.^{6,24}

Robustez: Es la capacidad del método para proporcionar resultados confiables al realizar cambios internos en los parámetros del método.^{1,2,3,4,5,6}

Tolerancia: Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones externas al método como diferentes proveedores de reactivos diferentes equipos, condiciones ambientales, estabilidad de la lectura, diferentes analistas, etc.²⁴

Validación de Métodos Analíticos: Es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio y métodos estadísticos, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.^{6,24}

2.4.2 Beneficios de la validación

Los Beneficios que se obtienen al realizar estudios de validación son muy diversos, entre ellos tenemos: cumplir con la regulación sanitaria, contar con procedimientos normalizados de operación, económicos (reducción de costos, ya que con procesos validados se puede asegurar una mejor productividad), optimización del proceso, aseguramiento de la calidad (facilita la labor de inspección de proceso y control de calidad en los productos).²⁴

2.4.3 Plan de prueba para la validación

El plan de prueba para la validación se establece en función de estudios de laboratorio para varios parámetros de desempeño, que dependen de la aplicación analítica deseada.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros de desempeño que se deben evaluar en función de la aplicación analítica deseada. ²⁴

Tabla 1. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO EN VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO / POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO / VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN / ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD ¹	SI ³	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA ²	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

* PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO
1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensado por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

2.4.4 Procedimiento para evaluar los parámetros de desempeño

Precisión del sistema.

Metodología.

Se determina la respuesta en 6 soluciones al 100% del estándar obtenidas por dilución o pesadas independientes, de lo indicado en el método analítico.

Información de reporte y cálculos.

Reportar la señal analítica y calcular el coeficiente de variación.

Criterios de aceptación.

El CV no debe exceder el 1.5% para métodos físico-químicos. Valores superiores se pueden presentar en métodos de contenido de impurezas o en métodos que utilicen un sistema biológico de medición, pero estos deben ser justificados.^{6,24}

Linealidad del Sistema.

Metodología.

Para contenido, preparar 5 niveles de concentración. El nivel de concentración central debe ser la concentración de la solución del estándar como lo indica el método, lo que usualmente se representa como el 100% y se deben de preparar niveles de concentración adicionales superiores al 100% e inferiores al 100%, por ejemplo 80, 90, 100, 110, 120. Cada nivel de concentración debe prepararse al menos por duplicado, ya sea por dilución de una solución estándar concentrada o por pesadas separadas. El intervalo de linealidad debe incluir la especificación de contenido del producto. Para métodos de contenido de materias primas y producto terminado, se pueden evaluar rangos de concentración del 100 ± 25 %. Otros esquemas se pueden justificar, como es el caso de métodos para contenido para producto en estabilidad, producto intermedio o control de procesos.

Para métodos de contenido de impurezas, se evalúan rangos que pueden ir del límite de cuantificación o del nivel de la impureza en el producto al 120 % de la especificación fijada para la impureza. Para establecer la especificación de la impureza en el producto

Información de reporte y cálculos.

Reportar la relación señal analítica vs concentración.

Calcular el valor de la pendiente, la ordenada en el origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de variación para la señal analítica vs concentración.

Criterios de aceptación.

El coeficiente de determinación debe ser no menor de 0.98.

El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.

El coeficiente de variación de regresión no debe exceder el 2%.

Valores menores del coeficiente de determinación deben ser justificados.

Valores superiores al criterio de aceptación del coeficiente de variación se pueden presentar en métodos de contenido de impurezas o en métodos que utilicen un sistema biológico de medición, y estos deben ser justificados.^{6,24}

Especificidad.

Para contenido de materias primas, producto intermedio, control de proceso y producto terminado.

Metodología.

Analizar como lo indica el método, muestras individuales de producto sin analito, de sustancias relacionadas, de precursores, de homólogos; y una mezcla del producto con las sustancias relacionadas y/o precursores y/u homólogos.

Información de reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) dependiendo el caso.

Criterio de aceptación.

La señal analítica de las sustancias relacionadas y/o precursores y/u homólogos, no debe interferir con la señal del analito.

Para contenido de producto en pruebas de estabilidad.

Metodología.

A) Si los productos de degradación reportados se pueden adquirir en el mercado; se procede a analizar como lo indica el método, muestras individuales del producto y de los productos de degradación; así como la mezcla de ambos.

B) Si no se tiene información de los productos de degradación o estos no se pueden adquirir en el mercado, someta a las siguientes condiciones de estrés al producto: luz, temperatura, oxígeno; álcali, ácido entre otras y proceda a analizar las muestras de estrés y de producto, como lo indica el método.

Información de reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) si se trata del caso (A).

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) y reportar el contenido del producto si se trata del caso (B).

Criterio de aceptación.

Para el caso (A), la señal analítica de los productos de degradación, no debe interferir con la señal del analito.

Para el caso (B) siempre y cuando se presente degradación, la señal analítica de los productos de degradación, no debe interferir con la señal del analito y el contenido debe disminuir significativamente.

Para contenido o límite de impureza.

Metodología.

Analizar muestras individuales de impureza (orgánicas, inorgánicas o solventes residuales) y del producto de pureza elevada, como lo indica el método; así como la mezcla de estos.

Información de reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) dependiendo el caso.

Criterio de aceptación.

La señal analítica del producto, no debe interferir con la señal de la impureza y esta debe ser consistente.^{6,24}

Exactitud y repetibilidad.

Metodología.

Recuperar el analito en el producto al nivel del 100% de la especificación, utilizando el método analítico.

Para métodos de contenido, se pueden evaluar rangos de concentración del 100 ± 20 %. Otros esquemas se pueden justificar, como es el caso de métodos de contenido para producto en estabilidad, producto intermedio o control de procesos.

Para métodos de contenido de impurezas, se evalúan rangos que pueden ir del límite de cuantificación o del nivel de la impureza en el producto al 120 % de la especificación fijada para la impureza.

Información de reporte y cálculos.

Reportar el recobro de cada muestra.

Para el recobro reportar el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza del recobro.

Criterios de aceptación.

El intervalo de confianza del recobro debe de incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98 – 102% si el método es cromatográfico,

98 – 102% si el método es volumétrico,

97 – 103% si el método es químico o espectrofotométrico,

95 – 105% si el método es microbiológico,

El CV del porcentaje de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si el método es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si el método es microbiológico,

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Para el caso de contenido de impurezas o en métodos que utilicen un sistema biológico de medición, se pueden justificar valores superiores.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.^{6,24}

Linealidad del método.

Metodología.

Recuperar el analito en el producto, por lo menos a tres niveles de concentración, incluyendo la especificación, utilizando el método analítico y realizando el análisis por lo menos por triplicado a cada nivel de concentración.

Para métodos de contenido se pueden evaluar rangos de concentración del 100 ± 20 %. Otros esquemas se pueden justificar, como es el caso de métodos de contenido para producto en estabilidad, producto intermedio o control de procesos.

Para métodos de contenido de impurezas, se evalúan rangos que pueden ir del límite de cuantificación o del nivel de la impureza en el producto al 120 % de la especificación fijada para la impureza.

Información de reporte y cálculos.

Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada (como %) de cada muestra.

Para la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada, calcular la pendiente, ordenada al origen, desviación estándar, coeficiente de determinación, intervalo de confianza para la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión.

Criterios de aceptación.

El coeficiente de determinación de la cantidad adicionada vs cantidad recuperada debe ser mínimo 0.98. Valores menores del coeficiente de determinación deben ser justificados.

El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad.

El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero.

El coeficiente de variación de regresión:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico o volumétrico,

no mayor de 3% si el método es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si el método es microbiológico

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra. ^{6,24}

Precisión intermedia.

Metodología.

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % (en el caso de contenido) o una muestra homogénea cuyo contenido este incluido en el rango lineal de exactitud (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes, aplicando el método analítico.

Información de reporte y cálculos.

Reportar el contenido de cada muestra y calcular promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación total (CV).

Criterios de Aceptación.

$CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$CV \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos.

$CV \leq 5\%$ para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Valores superiores deben ser justificados.

Para el caso de contenido de impurezas se pueden justificar valores superiores. ^{6,24}

Estabilidad Analítica de la Muestra.

Metodología:

El analista debe establecer la etapa de análisis en la cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar (muestras dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras dependientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés. Terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparación (contenido / potencia / valoración inicial). Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de una solución de referencia. Reportar el contenido / potencia / valoración de cada fracción.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras independientes, a partir de una muestra homogénea, el analista debe analizar por triplicado (contenido / potencia / valoración inicial). Simultáneamente y de la misma muestra, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de una solución de referencia. Reportar el contenido / potencia / valoración de cada preparación.

Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética del análisis inicial (\bar{y}_0) y de cada condición de almacenaje (\bar{y}_i). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$).

Criterios de Aceptación:

$|d_i| \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$|d_i| \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos.

$|d_i| \leq 5\%$ para métodos biológicos.

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.^{6,24}

Límite de detección.

Metodología.

Preparar de 3 a 5 niveles de concentración en un rango del 20% al 120% donde el 100% representa la especificación del límite de impurezas. Cada nivel de concentración debe prepararse al menos por duplicado, ya sea por dilución de una solución estándar concentrada o por pesadas separadas. Medir la señal analítica como lo indica el método. Otros esquemas se deben justificar.

Información de reporte y cálculos.

Reportar la relación señal analítica vs respuesta. Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, la desviación estándar de regresión, coeficiente de correlación, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la pendiente.

Calcular el LD (Límite de detección) con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Donde: σ , es la desviación estándar de regresión.

S , es la pendiente.

Criterios de Aceptación.

El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98.

El intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el cero.

El límite de detección debe ser menor de la especificación del límite de la impureza.^{6,24}

Límite de cuantificación.

Metodología.

Preparar de 3 a 5 niveles de concentración en un rango del 20% al 120% donde el 100% representa la especificación del contenido de impurezas. Cada nivel de concentración debe prepararse al menos por duplicado, ya sea por dilución de una solución estándar concentrada o por pesadas separadas. Medir la señal analítica como lo indica el método. Otros esquemas se deben justificar.

Información de reporte y cálculos.

Reportar la relación señal analítica vs respuesta. Calcular el valor de la pendiente, ordenada al origen, desviación estándar de regresión, coeficiente de correlación, coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la pendiente.

Calcular el LC (límite de cuantificación) con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde: σ , es la desviación estándar de regresión.

S , es la pendiente de la línea de calibración.

Criterios de Aceptación.

El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98.

El intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el cero.

El límite de cuantificación debe ser menor de la especificación del contenido de la impureza.^{6,24}

Tolerancia.

Metodología.

Definir por lo menos una condición de tolerancia que procedan a evaluar, como:

Proveedores de reactivos.

Proveedores de material.

Equipos

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % (en el caso de contenido) o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el rango lineal de exactitud (para el caso de impurezas), aplicando el método analítico a las condiciones de tolerancia definidas. Otros esquemas deben ser justificados.

Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación total (CV) del contenido / potencia / valoración.

Criterio de Aceptación:

$CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$CV \leq 3\%$ para métodos químicos y espectrofotométricos.

$CV \leq 5\%$ para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

Para el caso de contenido de impurezas se pueden justificar valores superiores. ^{6,24}

Estudios de Robustez.

Metodología.

Definir al menos dos condiciones de operación con cambios menores en el método analítico.

Analizar una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % (para contenido) o una muestra homogénea cuyo contenido sea cuantitativo (contenido de impurezas); por triplicado a las dos diferentes condiciones de operación de análisis, además de la condición normal de operación. Otros esquemas deben ser justificados.

Información de reporte y cálculos.

Reportar el contenido para cada condición instrumental y calcular el promedio aritmético de cada condición y de la condición normal de operación.

Criterios de Aceptación.

La diferencia absoluta entre el promedio de cada condición instrumental respecto de la condición normal de operación no debe exceder el 2 % para métodos cromatográficos y volumétricos, del 3% para métodos químicos y espectrofotométricos y del 5% para métodos microbiológicos.

Otro criterio de aceptación debe ser justificado. ^{6,24}

2.5 Comparación de dos métodos analíticos

2.5.1 Especificidad.

Este parámetro debe de cumplir para cada método analítico ya sea demostrando su especificidad o exactitud. ^{4,5,6,24}

2.5.2 Repetibilidad en exactitud.

De los datos de exactitud y repetibilidad utilizar la información del porcentaje de recobro.

Calcular la varianza S^2 del porcentaje de recobro de cada método.

Criterio de aceptación. El intervalo de confianza para la razón de varianzas, debe incluir el valor de 1. ^{4,5,6,24}

2.5.3 Repetibilidad en linealidad.

De los datos de linealidad del método utilizar la información del porcentaje de recobro.

Calcular la varianza S^2 del porcentaje de recobro de cada método.

Criterio de aceptación. El intervalo de confianza para la razón de varianzas, debe incluir el valor de 1. ^{4,5,6,24}

2.5.4 Exactitud.

De los datos de exactitud y repetibilidad, utilizar la información del porcentaje de recobro.

Calcular la media aritmética (Y_{promedio}) y varianza S^2 del porcentaje de recobro de cada método.

Criterio de aceptación. El intervalo de confianza para la diferencia de las dos medias poblacionales del porcentaje de recobro debe incluir el valor de 0. ^{4,5,6,24}

2.5.5 Linealidad del método.

De los datos de linealidad del método utilizar la información de la cantidad adicionada y cantidad recuperada de cada método, así como el porcentaje de recobro de cada método.

Para cada método, calcular la pendiente (b_{11} y b_{12}) y ordenada al origen (b_{01} y b_{02}) de la relación cantidad adicionada – cantidad recuperada, así como la media aritmética ($Y_{1\text{promedio}}$ y $Y_{2\text{promedio}}$) y varianza (S^2_1 y S^2_2) del porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación. El intervalo de confianza para la diferencia de las pendientes de cantidad adicionada – cantidad recuperada debe incluir el valor de 0.

El intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada – cantidad recuperada debe de incluir el valor de cero.

El intervalo de confianza para la diferencia de las dos medias poblacionales del porcentaje de recobro, debe incluir el valor de cero. ^{4,5,6,24}

2.5.6 Precisión del método.

De los datos de precisión del método, utilizar la información de valoración del analito de cada método.

Calcular las varianzas (S^2_A y S^2_B).

Criterio de aceptación. El intervalo de confianza para la razón de varianzas, debe incluir el valor de 1. ^{4,5,6,24}

2.6 Estudios de correlación entre métodos

2.6.1 Definiciones

Estos estudios se aplican a métodos de contenido y los parámetros a evaluar en este tipo de estudio son proporcionalidad y precisión.

Proporcionalidad: Estos estudios no necesariamente establecen equivalencia de resultados, sino proporcionalidad ya que en muchas ocasiones la respuesta analítica es diferente.^{4,5,24}

Precisión: Es deseable que el método no oficial tenga una precisión igual o mejor que el método oficial o que su precisión sea aceptable para la aplicación analítica deseada.^{4,5,24}

2.6.2 Procedimiento para evaluar la correlación entre métodos

2.6.2.1 Proporcionalidad

Metodología

Caso 1.- Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar una cantidad suficiente de placebo analítico con el tipo de componentes que comúnmente están presentes en la muestra, de tal manera que pueda ser analizado por ambos métodos en tres diferentes niveles del analito, que incluya la especificación.

Del placebo analítico preparado, tomar una cantidad suficiente para adicionar el analito al nivel inferior. Fraccionar en tres muestras y analizar cada muestra con ambos métodos, bajo las condiciones analíticas de cada método.

Caso 2.- No se conocen los componentes de la muestra.

El analista debe seleccionar por lo menos 9 muestras del producto, cuyo nivel de analito cumple con la especificación. El analista debe fijar una etapa de los métodos analíticos, en los cuales transfiera una mayor o menor cantidad con el objeto de poder variar el nivel del analito, como puede ser al pesar la muestra, al transferir un volumen, al efectuar una dilución, entre otras.

Es conveniente que 3 muestras tengan un nivel bajo, 3 el nivel correspondiente a la especificación y 3 un nivel alto del analito.

Las 9 muestras deben ser identificadas y analizadas por ambos métodos, bajo las condiciones analíticas de cada método.

Información de reporte y cálculos.

Reportar la relación valoración método a comparar (Y) – Valoración método de referencia (X). Calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0),

el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

Criterio de aceptación.

El $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero. ^{4,5,24}

2.6.2.2 Precisión

Metodología.

Por lo menos dos analistas, en por lo menos dos días, deben analizar por triplicado muestras independientes (pesadas o alícuotas) de un lote homogéneo de producto, cuyo nivel de analito este cercano a la especificación; tanto con el método de referencia como con el método a comparar.

Información del reporte y cálculos.

Reportar el contenido del analito de todas las muestras en %, para ambos métodos.

Criterio de aceptación.

El intervalo de confianza unilateral inferior, para la razón de varianzas del método a comparar respecto del método de referencia, no debe exceder el valor de 1. ^{4,5,24}

2.7 Microescala.

En nuestros días se ha hecho más evidente la necesidad de reducir la escala de los métodos analíticos en los laboratorios escolares e industriales, con el fin de proteger el medioambiente, la seguridad de los trabajadores y disminuir los elevados costos de operación de los laboratorios. Para llevar a cabo las distintas técnicas de microescala las cantidades son menores de 1g o de 2 mL, estas cantidades oscilan entre los 25 mg a 150 mg para sólidos y de 100 a 2000 μ L para líquidos. Las ventajas de la Química a microescala son:

- Reducción en el uso de productos químicos, y por lo tanto la reducción de residuos en su origen.
- Reducción tanto en los costos de compra, así como, del reciclaje y de la recogida de los materiales.
- Se produce un aumento considerable de la seguridad e higiene en el laboratorio de forma tal que se puede mejorar la calidad de aire en el laboratorio, se produce una menor exposición a productos químicos tóxicos, existe una menor posibilidad de que se inicie un fuego o se produzca una explosión y se disminuiría el número de accidentes por el derrame de productos químicos.
- Disminuir la duración del experimento, dándose un aumento en la práctica de experimentos, reduciendo los gastos por el uso de agua, gas y/o electricidad para llevar a cabo las prácticas.
- Menor costo en vidrio roto, debido al costo del material convencional más pequeño (vasos, matraces, pipetas, placas, etc.). en la actualidad los equipos que se utilizan para la microescala son con juntas ensamblables algunas de ellas esmeriladas o con rosca, son de alguna forma más costosos que el material convencional. De acuerdo con la tendencia de utilizar la microescala tanto en laboratorios escolares como en la industria, se espera que el costo del material disminuya debido a que habría un mayor número de proveedores, los cuales conforme a la oferta y la demanda de material tendrían que disminuir su costo.
- Implementar la política medioambiental que promueve el principio de las tres "R": reducir, reciclar y recuperar.
- Operar de manera más racional posible de acuerdo a la técnica utilizada, es decir ninguna de las técnicas es más difícil de aprender y aplicar con respecto a las técnicas convencionales. De hecho el material a utilizar es más fácil de montar que los convencionales.

- Adquisición de destreza en el manejo de materiales y productos, desarrollo de habilidades que no se adquieren a escala normal.
- Ahorro de tiempo en la dedicación al análisis e interpretación de resultados. Por otro lado se reduce el tiempo de reacción de los experimentos realizados a microescala en comparación con los realizados de manera convencional.^{9,10,11,12,15,17,25}

2.8 Métodos volumétricos de análisis

2.8.1 Definiciones

Método volumétrico

Se basa en una titulación en la cual se mide el volumen de un reactivo (titulante) que reacciona con una cantidad conocida de una muestra.

Titulante

Solución cuya concentración es conocida experimentalmente, con cuatro cifras significativas, debe ser estable, la relación con la muestra debe ser estequiométrica y la reacción con la muestra debe ser rápida y completa.

Patrón primario

De composición conocida y alta pureza, estable a temperatura ambiente y no debe absorber gases como CO₂, SO₂ o agua (si es necesario debe secarse hasta peso constante), debe reaccionar rápida y estequiométricamente (es decir cuantitativamente).

Punto de equivalencia

Punto teórico al cual la cantidad de titulante añadido es exactamente equivalente a la cantidad de muestra disuelta.

Punto en el cual la reacción es completa.

Indicador

Sustancia que estando en contacto con la muestra en solución es capaz de detectar o hacer evidente el punto final de una reacción, al cambiar de un modo característico en el punto de equivalencia o cerca de él.

Valoración

Proceso de adición de un volumen medido de la solución de concentración conocida (titulante) para que reaccione con la muestra desconocida.

Proceso de adición de un volumen medido de la solución de concentración desconocida (titulante) para que reaccione con la muestra conocida (patrón primario).^{21,22,23}

2.8.2 Clasificación de los métodos volumétricos

En Cuanto a la estequiometría

Directos

Indirectos

Por retroceso

En cuanto al tipo de reacción

De precipitación

Complejométricos

Neutralización

Redox^{21,22,23}

2.8.2.1 Métodos directos

El reactivo titulante se adiciona directamente con una bureta a la disolución que contiene el reactivo por titular.^{21,22,23}
ejemplo:



Cálculos

$$\% = \frac{(\text{Vm}-\text{Vb})(\text{Nr})(\text{Eq})(100\%)}{(\text{W})(\text{Nt})}$$

Vm = Volumen gastado de titulante por la muestra

Vb = Volumen gastado de titulante por el blanco

Nr = Normalidad real

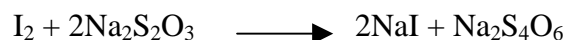
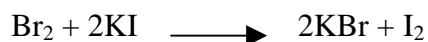
Eq = No. de equivalentes en mg/mL de la muestra

W = Peso de la muestra en mg

Nt = Normalidad teórica

2.8.2.2 Métodos indirectos

Se hace reaccionar la sustancia a titular con un reactivo específico, como resultado se obtiene una cantidad químicamente equivalente de otra sustancia, la cual se titula con la solución titulante.^{21,22,23}
ejemplo:



Cálculos

$$\% = \frac{(\text{Vm}-\text{Vb})(\text{Nr})(\text{Eq})(100\%)}{(\text{W})(\text{Nt})}$$

Vm = Volumen gastado de titulante por la muestra

Vb = Volumen gastado de titulante por el blanco

Nr = Normalidad real

Eq = No. de equivalentes en mg/mL de la muestra

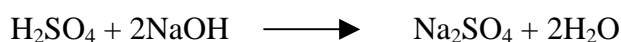
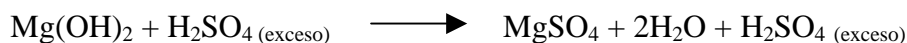
W = Peso de la muestra en mg
Nt = Normalidad teórica

2.8.2.3 Métodos por retroceso

Se añade la solución titulante en exceso a la muestra, el exceso de la solución titulante que no reacciona con la muestra, se titula con una nueva solución titulante.

Se obtiene así el volumen que no reaccionó con la muestra el cual se resta al volumen inicial para encontrar el volumen que si reacciona con la muestra.^{21,22,23}

Ejemplo:



Cálculos

$$\% = \frac{[(V1 * N1) - (V2 * N2)] - [(V1 * N1) - (V2 * N2)]}{W * Nt} (\text{Eq}) (100\%)$$

V1 = Volumen gastado de titulante 1

N1 = Normalidad real titulante 1

V2 = Volumen gastado de titulante 2

N2 = Normalidad real titulante 2

Eq = No. de equivalentes en mg/mL de la muestra
con respecto al titulante 1

W = Peso de la muestra en mg

Nt = Normalidad teórica del titulante 1

2.8.3 Detección del punto final

El punto final se detecta mediante un cambio brusco de alguna propiedad de la mezcla reaccionante o de alguna sustancia que se añade a dicha mezcla y se clasifican en:

- Métodos visuales
- Métodos eléctricos^{21,22,23}

2.8.3.1 Métodos visuales

- El reactivo es autoindicador.

El permanganato de potasio se reduce a ión Mg^{2+} incoloro en medio ácido, pero cuando se completa la reacción redox, la primera gota produce un color rosado (color original del titulante).

- Indicadores ácido base

Son más débiles que los compuestos que se valoran o que se utilizan como titulantes, no reaccionan de forma permanente con el titulante hasta que la reacción principal se completa, deben escogerse en las cercanías del punto final de la titulación.

- Indicadores redox

Sustancias intensamente coloreadas capaces de sufrir oxidación o reducción a potenciales característicos, estos potenciales deben ser muy cercanos a los valores del sistema principal de forma que un débil exceso del reactivo reaccione con el indicador.

- Formación de productos solubles de color diferente

En la titulación de plata se utiliza como titulante una solución de tiocianato y como indicador una sal férrica, el ión plata forma un precipitado blanco de AgSCN , la próxima gota origina un color rojo de $\text{Fe}(\text{SCN})_2^{2-}$ soluble.

- Desaparición del color de la sustancia que se valora

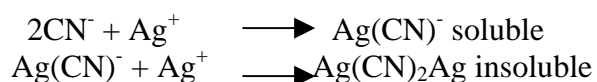
En la determinación de cobre de una disolución cúprica amoniacal con cianuro, el punto final se observa por la desaparición del color azul intenso del ión $2\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ ya que el producto de la reacción con cianuro es incoloro $2\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$

- Formación de un segundo precipitado de color diferente a partir del precipitado principal

En la valoración de cloruros con nitrato de plata donde se utiliza como indicador cromato de potasio, se forma un precipitado blanco de AgCl pero cuando se completa la reacción, se forma un nuevo precipitado de color rojo naranja de Ag_2CrO_4

- Valoración hasta aparición de turbidez

En la valoración de cianuro con ión plata se forma un compuesto que es soluble pero la próxima gota forma un cristal de dos moléculas que es insoluble ^{21,22,23}



2.8.3.2 Métodos eléctricos

- Potenciométrico.

Se mide el potencial eléctrico de dos electrodos colocados en la disolución el potencial cambia rápidamente cerca del punto de equivalencia.

- Conductométrico.

La eliminación de los iones por neutralización, precipitación o complejación da lugar a cambios en la conductancia en función de la cantidad de titulante añadido cerca del punto final

- Amperométrico.

Se mide la corriente que pasa a través de una celda polarográfica, una alteración del ritmo de cambio de la corriente, indica el punto estequiométrico.

- Coulombimétrico.

Se mide la cantidad de electricidad necesaria para completar una reacción de electrólisis o la generación electrolítica de un reactivo titulante, con la medida de la corriente y el tiempo se pueden calcular el número de coulombios que intervienen y con ello el número de equivalentes que se buscan.^{21,22,23}

2.8.4 Titulaciones en disolventes no acuosos

Definición de Lewis:

Un ácido es una sustancia que acepta un par electrónico y una base es una sustancia que dona un par electrónico.

En soluciones acuosas, todos los ácidos fuertes reaccionan con el disolvente convirtiéndose casi completamente en iones OH^- y H_3O^+

La potencia aparente de un ácido o de una base se determina por la magnitud de sus reacciones con el disolvente.

Muchos compuestos insolubles en agua, cuando se disuelven en disolventes orgánicos, acentúan sus propiedades ácidas o básicas, por lo que seleccionando un disolvente apropiado se pueden valorar mediante una titulación no acuosa.

Seleccionando un disolvente y titulante apropiado, se puede valorar a la parte fisiológicamente activa de un compuesto, además se pueden titular directamente principios activos en preparados farmacéuticos.

Compuestos que pueden titularse como ácidos:

Ácidos halogenados, anhídridos ácidos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, grupos enólicos (barbitúricos, xantinas, iminas, fenoles, pirroles y sulfonamidas).

Compuestos que pueden titularse como bases:

Aminas, compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, oxazolininas, compuestos cuaternarios de amonio, sales alcalinas de ácidos orgánicos e inorgánicos débiles y algunas aminas.

Para titular un compuesto básico se emplea principalmente una solución volumétrica de ácido perclórico en ácido acético y en algunos casos en dioxano.

Para titular un compuesto ácido se emplea principalmente una solución de metóxido de sodio en una mezcla de metanol y benceno

Para titular sales de ácidos halogenados, estos se disuelven en ácido acético ó anhídrido acético y se agrega acetato mercurico el cual separa el ión haluro como un complejo haluro-mercúrico sin ionizar. ^{21,22,23}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos analíticos actuales, en química analítica, emplean grandes cantidades de reactivos, generándose una cantidad considerable de desechos químicos que pueden alterar el medio ambiente, el tiempo empleado en el análisis es largo y por lo tanto la exposición del analista a las sustancias tóxicas es alta; el costo del análisis es alto debido a la cantidad de reactivos utilizados.

Para disminuir la generación de residuos tóxicos, la utilización de cantidades grandes de reactivos y la exposición del analista tanto a reactivos como a residuos, se propone llevar a microescala el método analítico farmacopéico de Citrato de tamoxifeno, esto permitirá además del beneficio económico, beneficio ecológico y de seguridad en el laboratorio. Para la implantación de prácticas nuevas, seguras y económicas en los laboratorios de docencia en pregrado y posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

4. OBJETIVO

Diseñar y validar un método analítico a microescala para la determinación de tamoxifeno citrato como materia prima sin que se vea afectado su desempeño.

Disminuir la generación de residuos peligrosos tanto para el analista como para el medio ambiente, reducir la cantidad de reactivos utilizados, minimizar la exposición del analista tanto a reactivos como a residuos y disminuir el costo del análisis.

5. HIPOTESIS

El método analítico farmacopéico de Citrato de tamoxifeno, se puede llevar a microescala, sin que se vea afectado el desempeño del mismo y por lo tanto el resultado analítico.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Población de estudio

El estudio se llevó a cabo en muestras de Tamoxifeno citrato materia prima de la marca Amedrugs lote 0440645 y ácido acético de la marca J.T. Baker lote A27C53, para lo cual fue necesario contar con cantidad suficiente para todo el estudio tanto del fármaco como del disolvente (ácido acético).

6.2 Criterios de Inclusión y Exclusión

6.2.1 Criterios de inclusión

- En cuanto al fármaco

Fueron incluidas muestras de fármaco solo de la marca y lote indicadas anteriormente.

- En cuanto al ácido acético

Fue incluido el reactivo ácido acético solo de la marca y número de lote indicado anteriormente.

6.2.2 Criterios de exclusión

- En cuanto al fármaco

Fueron excluidas muestras de fármaco de marca y lote diferentes a las indicadas anteriormente.

-En cuanto al reactivo

Fue excluido el reactivo de marca y número de lote distinto al indicado anteriormente

- En cuanto a la validación del método analítico

Fue excluida la prueba de adecuabilidad debido a que esta prueba está diseñada para métodos cromatográficos.

Fue excluida la prueba de linealidad del método debido a que esta prueba está diseñada para medir la linealidad y exactitud del método al recuperar el principio del producto terminado a diferentes niveles de concentración; el método analítico estudiado es para valorar materia prima.

Fue excluida la prueba de estabilidad de la muestra analítica debido a que se titula inmediatamente después de preparar la muestra, esta prueba está diseñada para métodos instrumentales principalmente cromatográficos, donde la muestra es analizada por el equipo siguiendo una lista de programación, por lo tanto pasa un periodo de tiempo largo desde la preparación hasta la inyección.

Fueron excluidos los límites de detección y cuantificación ya que el propósito del método es determinar la valoración del fármaco que es un componente puro; esta prueba está

diseñada para métodos que evalúan impurezas o sustancias de degradación cuya concentración es baja.

Fue excluida la tolerancia debido a que esta prueba evalúa los resultados entre marcas y lotes de reactivos o materiales, pero como ya se indicó anteriormente, estas variables fueron controladas.

Fue excluida la prueba de robustez debido a que esta prueba está diseñada para evaluar los resultados obtenidos al hacer cambios menores internos del método por ejemplo volumen pero en este caso se controlaron los materiales usados así como los equipos y por lo tanto la variación interna del método.

Fue excluida la prueba de especificidad ya que se trata de un método para materia prima, por lo tanto se asume que se trata de un fármaco puro y que no hay excipientes a evaluar; por otro lado la especificidad para métodos indicativos de estabilidad se realiza en producto terminado.

6.3 Variables

Las variables a determinar en el estudio serán:

Variable independiente; la concentración.

Variable dependiente; la respuesta analítica en este caso el volumen gastado de solución de ácido perclórico 0.1 N.

Variables controladas son el fármaco, los reactivos, la solución titulante, el material utilizado y el equipo.

6.4 Materiales

Matraz volumétrico de 2000 mL marca Pyrex clase A con una tolerancia de 0.6 mL

Vaso de precipitados de 1000 mL marca Kimax

Vaso de precipitados de 100 mL marca Corning

Probeta graduada de 100 mL marca Pyrex

Pipeta graduada de 10 mL marca Pyrex

Matraz Erlenmeyer de 250 mL marca Corning

Matraz Erlenmeyer de 50 mL marca Corning

Bureta de 25 mL Marca Pyrex clase A con una tolerancia de 0.03 mL

Bureta de 10 mL Marca Kimax clase A con una tolerancia de 0.02 mL

Soporte universal

Pinzas para bureta

6.5 Equipos

Agitadores magnéticos

Parrilla de agitación marca Lab-Line

Potenciómetro marca Beckman modelo pH 340 con electrodo de vidrio y electrodo de plata cloruro de plata como referencia.

6.6 Reactivos

Ácido acético glacial marca J.T. Baker lote A27C53 pureza 99.9 %

Ácido perclórico marca J.T. Baker lote Y22C09 pureza 60 – 70 %

Anhídrido acético marca TeciQuim lote AAN-01-JA pureza 97 – 100 %

Cristal violeta marca TeciQuim lote CV1-01-SSR

Agua purificada producida en la planta piloto FES Zaragoza sin lote destilada el día de prueba

6.7 Metodología

La metodología a seguida para la realización del proyecto fue la siguiente:

1. El proyecto inició con la revisión bibliográfica.

2. El siguiente paso consistió en determinar la precisión del sistema y exactitud, del método original (método farmacopéico), lo cual tiene como propósito verificar el desempeño del mismo, esto se realizó de la siguiente manera:

- Precisión del sistema.

Se Pesaron 500 mg de Tamoxifeno citrato en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se disolvieron con 75 mL de ácido acético glacial, se titularon con ácido perclórico 0.1 N determinando el punto final con ayuda de solución indicadora de cristal violeta así como potenciométricamente, usando un electrodo de vidrio y electrodo de plata – cloruro de plata como referencia. Se realizó un blanco y se efectuaron las correcciones necesarias. Cada mL de solución 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 56.36 mg de Citrato de tamoxifeno. Se realizó la determinación 6 veces y se calculó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

- Exactitud (repetibilidad)

Se calculó el porcentaje recuperado de cada una de las 6 determinaciones realizadas en el paso anterior y se determinó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

3. A continuación se escaló el método al 50 % y 10 % y se determinó la precisión y exactitud de cada uno de ellos de la siguiente manera:

- Precisión del método al 50 %.

Se Pesó 250 mg de Tamoxifeno citrato en un matraz Erlenmeyer de 125 mL se disolvió con 35 mL de ácido acético glacial, se tituló con ácido perclórico 0.1 N determinando el punto final con ayuda de solución indicadora de cristal violeta así como potenciométricamente, usando un electrodo de vidrio y electrodo de plata – cloruro de plata como referencia. Se realizó un blanco y se efectuaron las correcciones necesarias. Cada mL de solución 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 56.36 mg de Citrato de tamoxifeno. Se realizó la determinación 6 veces y se calculó la media aritmética, la

desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

- Exactitud del método al 50 %.

Se calculó el porcentaje recuperado de cada una de las 6 determinaciones realizadas en el paso anterior y se determinó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

- Precisión del método al 10 %.

Se pesó 50 mg de Tamoxifeno citrato en un matraz erlenmeyer de 25 mL disolver con 10 mL de ácido acético glacial, se tituló con ácido perclórico 0.1 N determinando el punto final con ayuda de solución indicadora de cristal violeta así como potenciométricamente, usando un electrodo de vidrio y electrodo de plata – cloruro de plata como referencia. Se realizó un blanco y se efectuaron las correcciones necesarias. Cada mL de solución 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 56.36 mg de tamoxifeno citrato. Se realizó la determinación 6 veces y se calcularon la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

- Exactitud del método al 10 %.

Se calculó el porcentaje recuperado de cada una de las 6 determinaciones realizadas en el paso anterior y se determinó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para la determinación con solución indicadora y la determinación potenciométrica.

4. Se realizó la intercomparación de métodos aplicando ANADEVA; utilizando como factores, el peso del fármaco y el volumen de ácido acético, y como determinaciones, la precisión y exactitud.

5. Se realizó la validación del método a microescala más pequeño, que demostró que no tiene diferencia con respecto al método original, según la inter comparación realizada en el punto anterior. Este método resultó ser el método al 10% utilizando potenciómetro para la detección del punto final.

Los parámetros de validación realizados fueron

- Precisión del sistema

Se tomaron los resultados de precisión del sistema realizados con anterioridad para el método seleccionado (método al 10% utilizando potenciómetro para la detección del punto final).

- Exactitud (repetibilidad)

Se tomaron los resultados de exactitud realizados con anterioridad para el método seleccionado (método al 10% utilizando potenciómetro para la detección del punto final).

- Linealidad del sistema.

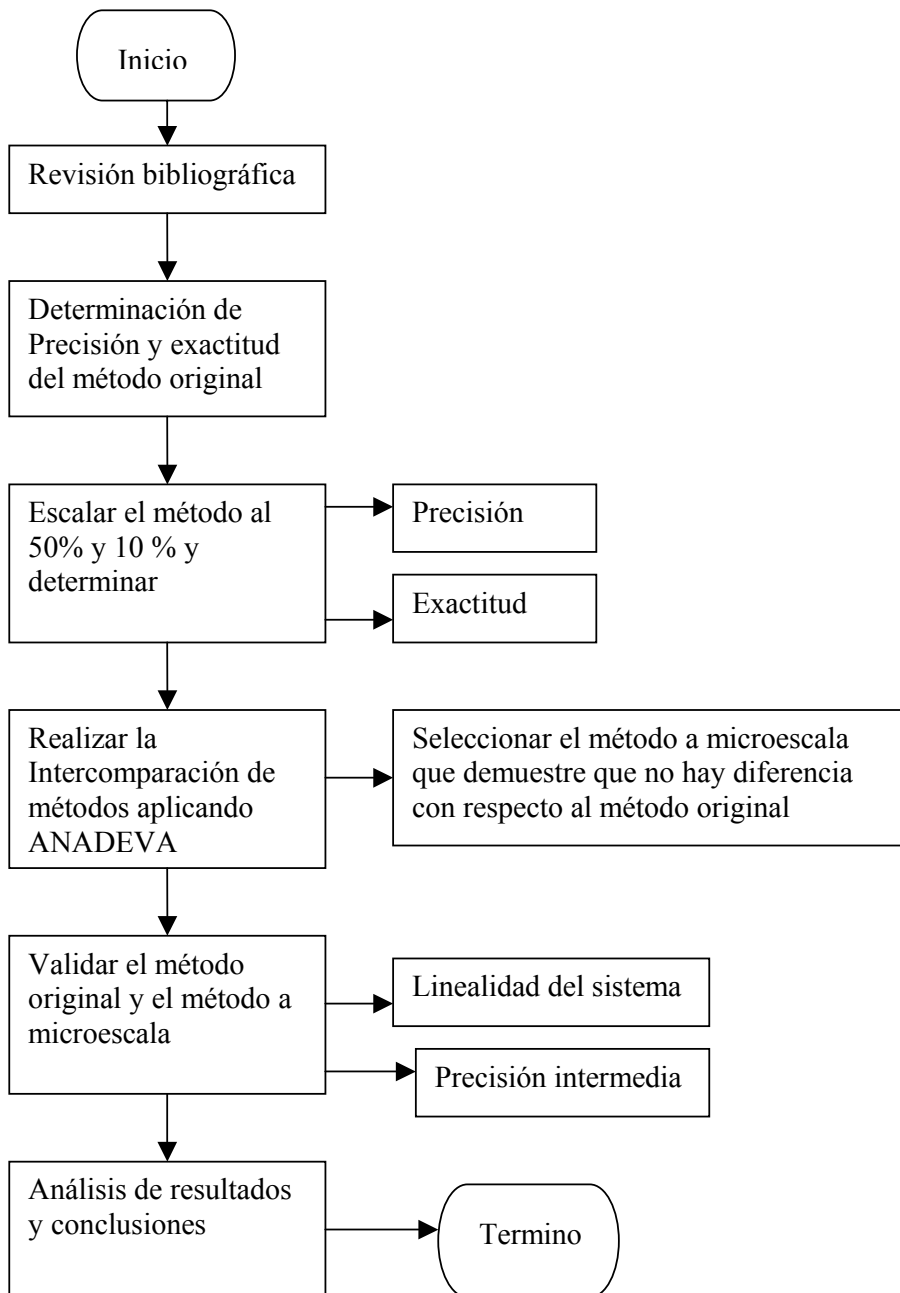
Se realizó una curva de calibración con 5 niveles de concentración. El nivel de concentración central fue la concentración de la solución del estándar como lo indica el método a microescala correspondiente, (lo que usualmente se representa como el 100%). Los niveles son 90%, 95%, 100%, 105% y 110%. Cada nivel de concentración se preparó por duplicado, por pesadas separadas. Se aplicó el procedimiento de valoración correspondiente al método en microescala seleccionado, y se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de variación para la señal analítica vs concentración.

- Precisión intermedia.

Se realizó la precisión intermedia del método analítico al nivel de concentración como lo indica el método a microescala correspondiente, (lo que usualmente se representa como el 100%). por dos analistas diferentes en dos días diferentes; cada analista realizó la determinación por triplicado para cada uno de los dos días.

De la misma forma se realizó la validación del método original (farmacopéico).

6.8 Diagrama de Flujo



7. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

7.1 Resultados de precisión del sistema en el método original (escala 100%) con potenciómetro

Tabla No. 2 Precisión con potenciómetro

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 501.4 mg	9.40
2 = 500.8 mg	9.45
3 = 501.2 mg	9.40
4 = 499.8 mg	9.35
5 = 501.8 mg	9.40
6 = 501.9 mg	9.40
Promedio	9.40
Desvest	0.03162
CV	0.34 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico original (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 2, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza el potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.2 Resultados de precisión del sistema en el método original (escala 100%) con solución indicadora

Tabla No. 3 Precisión con solución indicadora

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 501.6 mg	9.40
2 = 501.4 mg	9.45
3 = 501.6 mg	9.45
4 = 501.5 mg	9.45
5 = 502.6 mg	9.50
6 = 502.9 mg	9.50
Promedio	9.46
Desvest	0.03764
CV	0.40 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico original (descrito anteriormente de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 3, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.3 Resultados de exactitud del método original (escala 100%) con potenciómetro

Tabla No. 4 Exactitud con potenciómetro

Muestras	% Recuperado
1 = 501.4 mg	99.90
2 = 500.8 mg	100.17
3 = 501.2 mg	99.94
4 = 499.8 mg	99.45
5 = 501.8 mg	99.58
6 = 501.9 mg	99.62
Promedio	99.78
Desvest	0.27115
CV	0.27 %
Intervalo de confianza	99.49 – 100.06
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico original (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 4, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza el potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.4 Resultados de exactitud del método original (escala 100%) con solución indicadora

Tabla No. 5 Exactitud con solución indicadora

Muestras	% Recuperado
1 = 501.6 mg	99.90
2 = 501.4 mg	100.17
3 = 501.6 mg	100.47
4 = 501.5 mg	100.51
5 = 502.6 mg	100.64
6 = 502.9 mg	100.68
Promedio	100.40
Desvest	0.30224
CV	0.30 %
Intervalo de confianza	99.98 – 100.71
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico original (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 5, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza una solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.5 Resultados de precisión del sistema en el método escalado al 50% con potenciómetro

Tabla No. 6 Precisión con potenciómetro

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 251.8 mg	4.75
2 = 252.0 mg	4.70
3 = 250.4 mg	4.75
4 = 250.6 mg	4.70
5 = 251.8 mg	4.75
6 = 251.9 mg	4.75
Promedio	4.73
Desvest	0.02582
CV	0.55 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico escalado al 50% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 6, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza el potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.6 Resultados de precisión del sistema en el método escalado al 50% con solución indicadora

Tabla No. 7 Precisión con solución indicadora

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 251.0 mg	4.75
2 = 250.8 mg	4.70
3 = 250.9 mg	4.70
4 = 250.9 mg	4.75
5 = 251.0 mg	4.80
6 = 250.9 mg	4.80
Promedio	4.75
Desvest	0.04472
CV	0.94 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico escalado al 50% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 7, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.7 Resultados de exactitud del método escalado al 50 % con potenciómetro

Tabla No. 8 Exactitud con potenciómetro

Muestras	% Recuperado
1 = 251.8 mg	100.26
2 = 252.0 mg	100.04
3 = 250.4 mg	101.07
4 = 250.6 mg	99.52
5 = 251.8 mg	100.26
6 = 251.9 mg	100.10
Promedio	100.21
Desvest	0.49977
CV	0.50 %
Intervalo de confianza	99.68 – 100.73
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico escalado al 50% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 8, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.8 Resultados de exactitud del método escalado al 50 % con solución indicadora

Tabla No. 9 Exactitud con solución indicadora

Muestras	% Recuperado
1 = 251.0 mg	100.26
2 = 250.8 mg	100.04
3 = 250.9 mg	100.00
4 = 250.9 mg	100.58
5 = 251.0 mg	101.32
6 = 250.9 mg	101.16
Promedio	100.56
Desvest	0.56559
CV	0.56 %
Intervalo de confianza	99.97 – 101.15
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico escalado al 50% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 9, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.9 Resultados de precisión del sistema en el método escalado al 10% con potenciómetro

Tabla No. 10 Precisión con potenciómetro

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 51.1 mg	0.96
2 = 52.5 mg	0.98
3 = 52.6 mg	0.98
4 = 51.5 mg	0.96
5 = 50.8 mg	0.96
6 = 51.4 mg	0.98
Promedio	0.97
Desvest	0.01095
CV	1.13 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico escalado al 10% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 10, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.10 Resultados de precisión del sistema en el método escalado al 10% con solución indicadora

Tabla No. 11 Precisión con solución indicadora

Muestras	Volumen gastado (mL)
1 = 51.2 mg	0.98
2 = 52.4 mg	1.00
3 = 52.6 mg	1.00
4 = 51.6 mg	0.98
5 = 51.6 mg	0.98
6 = 51.5 mg	0.98
Promedio	0.99
Desvest	0.01033
CV	1.05 %
Criterio de aceptación	$CV \leq 1.5 \%$

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico escalado al 10% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, como se puede observar en la tabla No. 11, el coeficiente de variación es menor a 1.5 % por lo que el método analítico es preciso cuando se utiliza solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.11 *Resultados de exactitud del método escalado al 10 % con potenciómetro*

Tabla No. 12 Exactitud con potenciómetro

Muestras	% Recuperado
1 = 51.1 mg	101.24
2 = 52.5 mg	98.64
3 = 52.6 mg	98.27
4 = 51.5 mg	100.05
5 = 50.8 mg	100.05
6 = 51.4 mg	102.74
Promedio	100.16
Desvest	1.65568
CV	1.65 %
Intervalo de confianza	98.43 – 101.90
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con potenciómetro, siguiendo el método analítico escalado al 10% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 12, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza potenciómetro para determinar el punto final de la titulación.

7.12 Resultados de exactitud del método escalado al 10 % con solución indicadora

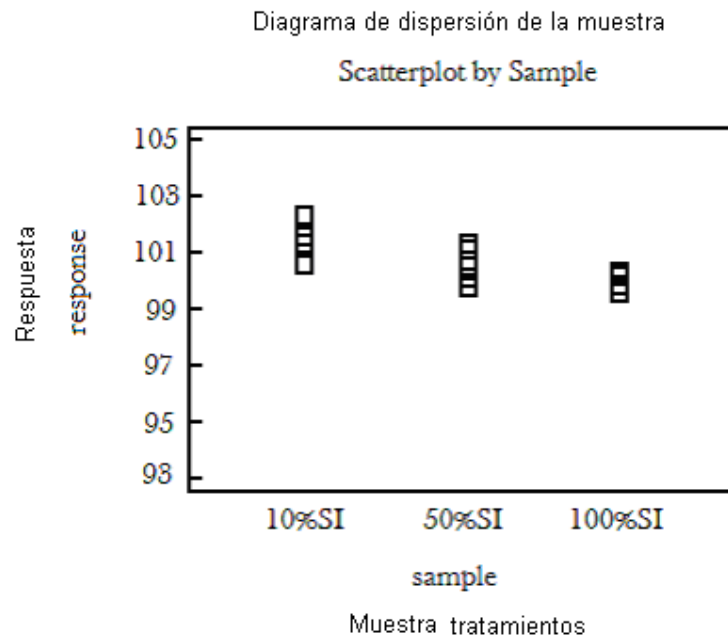
Tabla No. 13 Exactitud con solución indicadora

Muestras	% Recuperado
1 = 51.2 mg	103.35
2 = 52.4 mg	100.66
3 = 52.6 mg	100.28
4 = 51.6 mg	102.13
5 = 51.6 mg	102.13
6 = 51.5 mg	102.74
Promedio	101.88
Desvest	1.19101
CV	1.17 %
Intervalo de confianza	99.99 – 103.13
Criterio de aceptación	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 % El CV \leq 2.0 % El intervalo de confianza debe incluir al 100 %

Se prepararon y titularon 6 diferentes soluciones con solución indicadora, siguiendo el método analítico escalado al 10% (descrito anteriormente en la parte de la metodología), se obtuvo la respuesta analítica y se calcularon los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad, como se puede observar en la tabla No. 13, el promedio se encuentra dentro del intervalo de 98 – 102 %, el coeficiente de variación es menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la media incluye al 100 %, por lo que el método analítico es exacto cuando se utiliza solución indicadora para determinar el punto final de la titulación.

7.13 **Resultados de la intercomparación de métodos aplicando análisis de varianza**

Figura 1 Gráfica de dispersión de la respuesta analítica (% recuperado) vs. tratamientos utilizando solución indicadora



Tratamientos

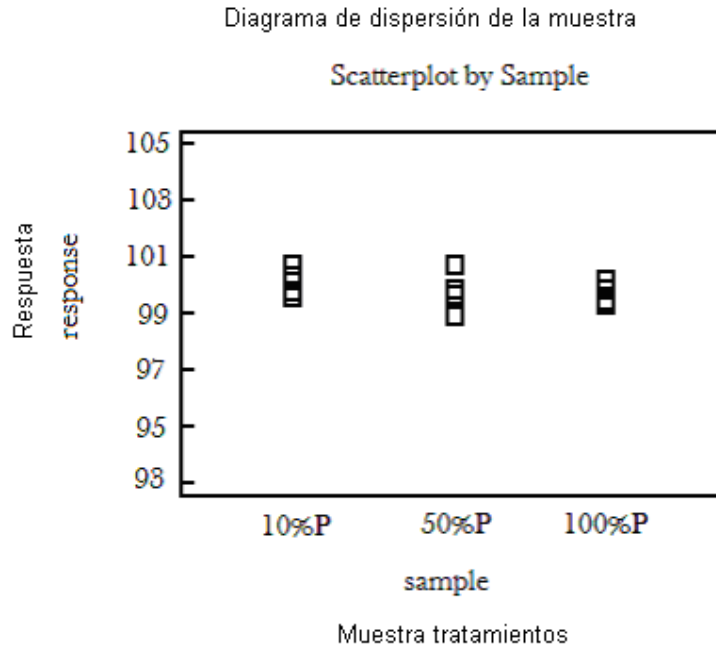
10%SI = Escala del 10% con solución indicadora

50%SI = Escala del 50% con solución indicadora

100%SI = Escala del 100% con solución indicadora

En la figura 1 se puede observar que la dispersión para el tratamiento 10%SI es mayor que en los otros dos casos, además presenta mayor diferencia con respecto al método original 100%SI

Figura 2 Gráfica de dispersión de la respuesta analítica (%recuperado) vs. tratamientos utilizando potenciómetro



Tratamientos

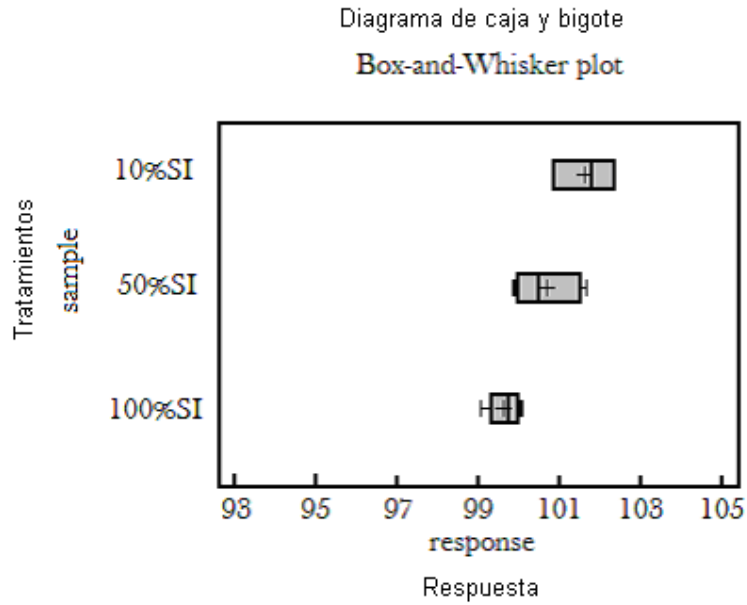
10%P = Escala del 10% con potenciómetro

50%P = Escala de 50% con potenciómetro

100%P = Escala del 100% con potenciómetro

En la figura 2 se puede observar que la dispersión del tratamiento 10%P es menor que en el caso del tratamiento 50%P, además puede observarse que los dos métodos escalados no presentan tanta diferencia con respecto al método original. 100%P.

Figura 3 Gráfica de caja y bigote de la respuesta analítica utilizando Solución indicadora



Tratamientos

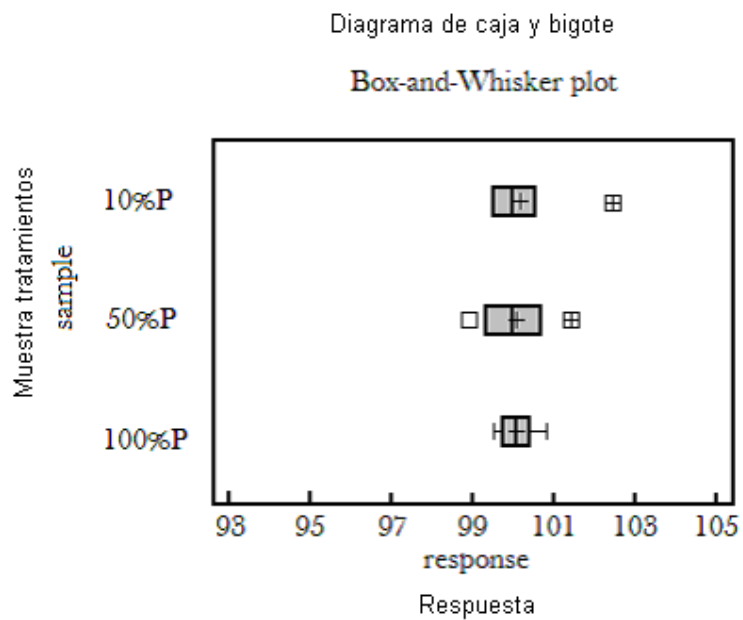
10%SI = Escala del 10% con solución indicadora

50%SI = Escala del 50% con solución indicadora

100%SI = Escala del 100% con solución indicadora

En la figura 3 se puede observar que si existe diferencia significativa entre las respuestas obtenidas de las diferentes escalas para la titulación usando solución indicadora, siendo la escala al 10% la que presenta la mayor diferencia con respecto a la escala al 100 %.

Figura 4 Gráfica de caja y bigote de la respuesta analítica utilizando potenciómetro



En la figura 4 se puede observar que no existe diferencia significativa entre las respuestas obtenidas de las diferentes escalas para la titulación usando potenciómetro, tanto la escala al 50 % como la escala al 10% presentan diferencia no significativa con respecto a la escala al 100 %.

Tabla No. 14 Análisis de varianza para solución indicadora

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón	Valor P
Entre grupos	371.607	2	185.804	736.17	0.0000
Dentro de grupos	3.7859	15	0.252393		
Total	375.393	17			

En la tabla 14 se puede observar que el valor de P es menor al 0.05 por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre las respuestas obtenidas de la titulación utilizando solución indicadora, con un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla No. 15 Análisis de varianza para potenciómetro

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón	Valor P
Entre grupos	0.720344	2	0.360172	0.09	0.9121
Dentro de grupos	58.3759	15	3.89173		
Total	59.0962	17			

En la tabla 15 se puede observar que el valor de P es mayor a 0.05 por lo tanto no existe diferencia estadísticamente significativa entre las respuestas obtenidas de la titulación utilizando potenciómetro, con un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla No. 16 Comparación múltiple de los pares de tratamientos con solución indicadora

Comparación múltiple de tratamientos			
Método 95.0	N	Media	Grupo Homogéneo
10%SI	6	101.88	X
50%SI	6	100.56	X
100%SI	6	100.40	X
Contraste	Diferencia		+/- Límite
10%SI – 50%SI	*1.32		0.618236
10% SI – 100%SI	*1.48		0.618236
50%SI – 100%SI	0.16		0.618236

* Indica diferencia estadísticamente significativa

La tabla No. 16 presenta una comparación múltiple de tratamientos para observar las diferencias estadísticamente significativos de los promedios.

Los valores marcados con un asterisco indican que hay diferencia estadística significativa.

Tabla No. 17 Comparación múltiple de los pares de tratamientos con potenciómetro

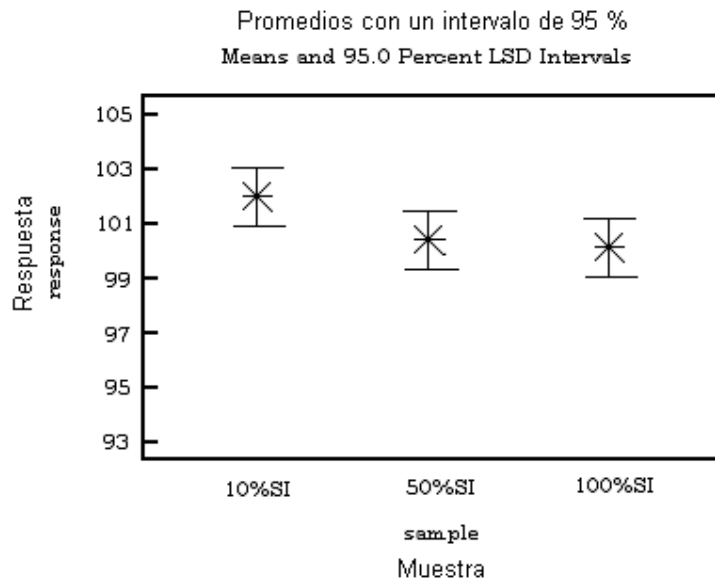
Comparación múltiple de tratamientos			
Método 95.0	N	Media	Grupo Homogéneo
10%P	6	100.16	X
50%P	6	100.21	X
100%P	6	99.78	X
Contraste	Diferencia		+/- Límite
10%P – 50%P	-0.05		2.42765
10% P – 100%P	0.38		2.42765
50%P – 100%P	0.43		2.42765

* Indica diferencia estadísticamente significativa

La tabla No. 17 presenta una comparación múltiple de tratamientos para observar las diferencias estadísticamente significativos de los promedios.

En este caso no hay diferencia estadísticamente significativa ya que no hay valores marcados con un asterisco.

Figura 5 gráfica de valores medios con un intervalo de 95 % para solución indicadora



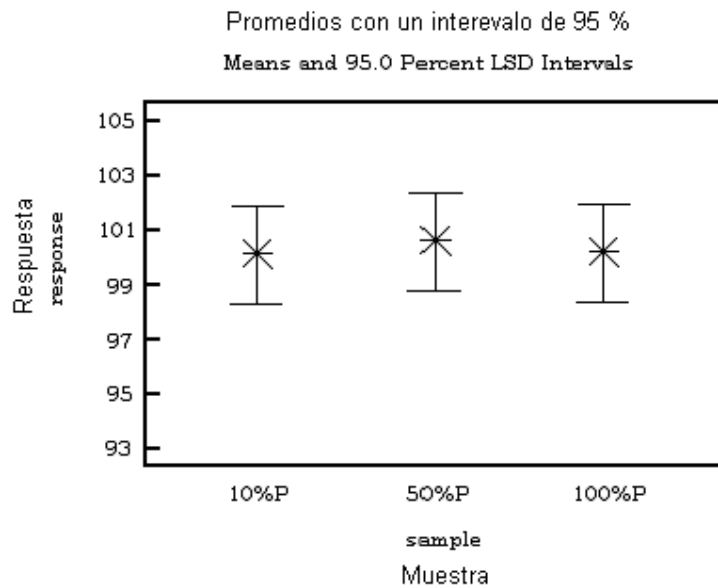
Tratamientos

10%SI = Escala al 10 % con solución indicadora

50%SI = Escala al 50 % con solución indicadora

100%SI = Escala al 100% con solución indicadora

Figura 6 gráfica de valores medios con un intervalo de 95 % para potenciómetro



Tratamientos

10%P = Escala al 10 % con potenciómetro

50%P = Escala al 50 % con potenciómetro

100%P = Escala al 100% con potenciómetro

Tabla No. 18 Valores promedios con un intervalo de 95.0 % para solución indicadora

Tabla de promedios con un intervalo de 95%

	N	Promedio	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
10%SI	6	101.88	0.205099	100.28	103.35
50%SI	6	100.56	0.205099	100.00	101.32
100%SI	6	100.40	0.205099	99.90	100.68
Total	18	100.95			

Tabla No. 19 Valores promedios con un intervalo de 95.0 % para potenciómetro

Tabla de promedios con un intervalo de 95%

	N	Promedio	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
10%P	6	100.16	0.80537	98.27	102.74
50%P	6	100.21	0.80537	99.52	101.07
100%P	6	99.78	0.80537	99.90	100.17
Total	18	100.05			

Debido a que la escala al 10% con potenciómetro, no presenta diferencia estadísticamente significativa, mientras que la escala al 10% con solución indicadora, si la presenta, se eligió esta primera como método a microescala y se procedió a validar en cuanto a linealidad.

7.14 Resultados de la linealidad para el método original (escala 100%) con potenciómetro

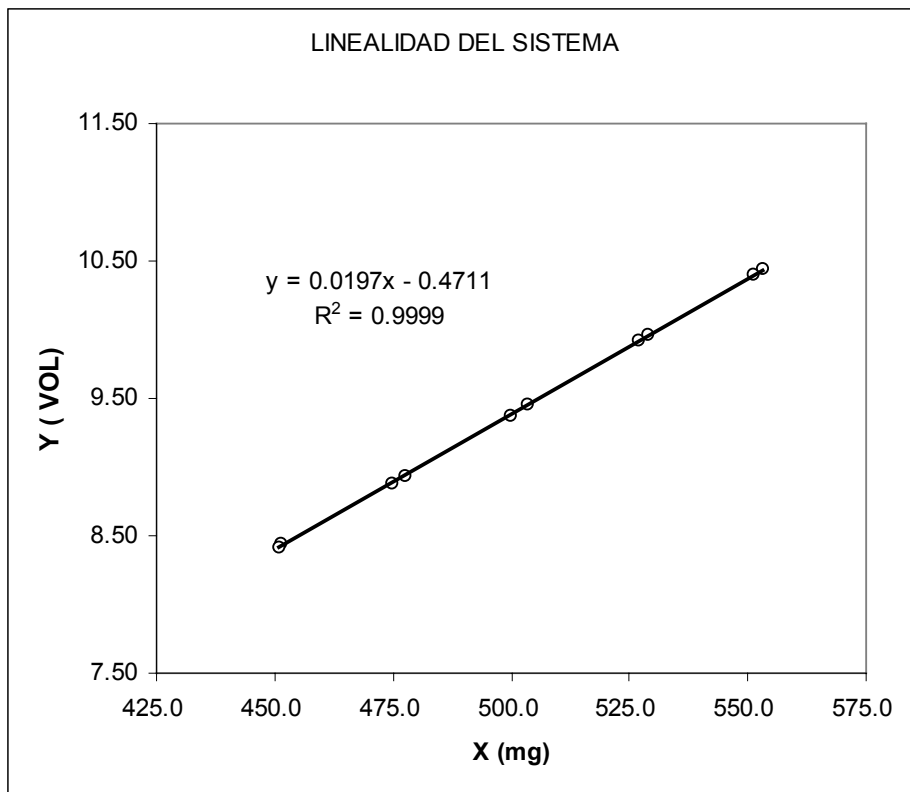
Tabla No. 20 Resultados de linealidad del sistema escala 100 % utilizando potenciómetro

Muestra	X peso (mg)	Y Volumen (mL)	Cantidad adicionada (%)	Promedio Volumen (mL)	Desvest	CV
1	451.1	8.44	90.22	8.43	0.014	0.17
2	450.8	8.42	90.16			
3	477.5	8.94	95.50	8.91	0.042	0.48
4	474.7	8.88	94.94			
5	503.5	9.46	100.70	9.42	0.057	0.60
6	499.7	9.38	99.94			
7	526.8	9.92	105.36	9.94	0.028	0.28
8	528.9	9.96	105.78			
9	553.0	10.44	110.60	10.42	0.028	0.27
10	551.2	10.40	110.24			
Resultados:						
B	-0.4711					
M	0.0197					
R ²	0.99992					
CV r	0.38					
LIC (M)	0.0032					
LSC (M)	0.0362					
Ecuación						
Y = 0.0197X - 0.4711						
Criterios de aceptación:						
R ²	No menor de 0.98					
CV r	No mayor a 2 %					
LIC (M)	El intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el valor de cero					
LIC (M)						

Se prepararon por duplicado muestras correspondientes al 90%, 95%, 100%, 105% y 110% de la cantidad teórica, se determinó la respuesta analítica y se calculó la ordenada al origen (B), la pendiente (M), el coeficiente de correlación (R²) el coeficiente de variación de regresión (CV r) y el intervalo de confianza para la pendiente con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad.

Se puede observar que los resultados cumplen con los criterios de aceptación ya que se obtuvo una R² mayor a 0.98, un CV r menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la pendiente con una probabilidad de 97.5 % y n-1 grados de libertad no incluye al cero

Figura No. 7 linealidad del sistema para la escala al 100% utilizando potenciómetro



Debido a que se cumple con los criterios de aceptación se concluye que el sistema es lineal en la escala al 100% cuando se utiliza potenciómetro para detectar el punto final.

**7.15 Resultados de la linealidad para el método a microescala (escala 10%).
Con potenciómetro**

Tabla No. 21 Resultados de linealidad del sistema escala 10 % utilizando potenciómetro

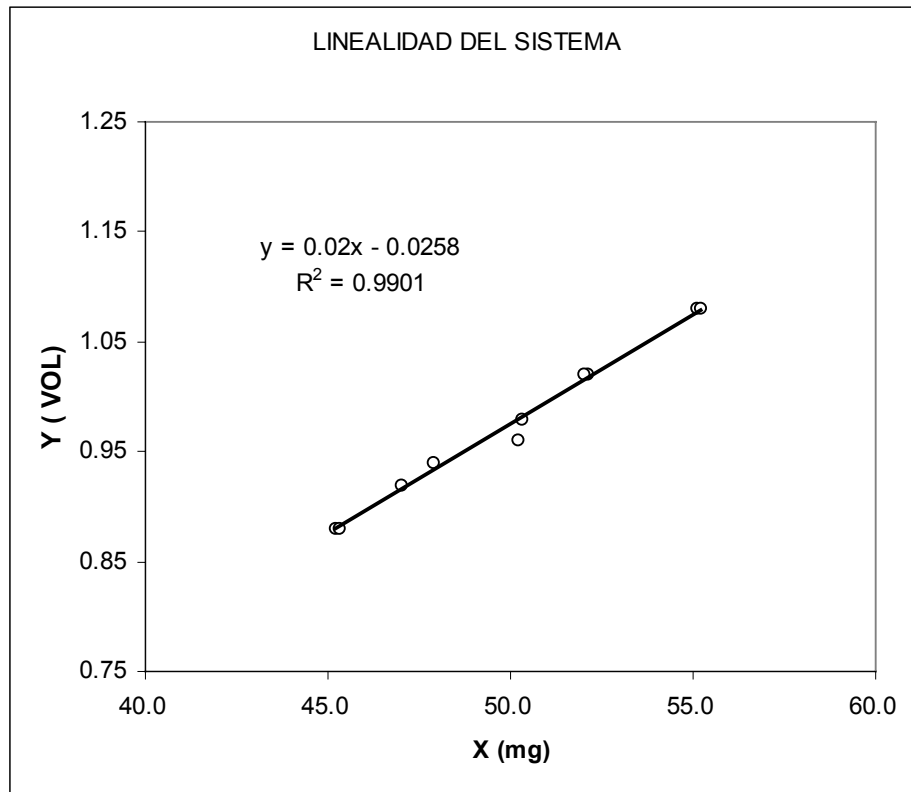
Muestra	X peso (mg)	Y Volumen (mL)	Cantidad adicionada (%)	Promedio Volumen (mL)	Desvest	CV
1	45.2	0.88	9.04	0.88	0.00	0.00
2	45.3	0.88	9.06			
3	47.0	0.92	9.40	0.93	0.01	1.52
4	47.9	0.94	9.58			
5	50.3	0.98	10.06	0.97	0.01	1.46
6	50.2	0.96	10.04			
7	52.1	1.02	10.42	1.02	0.00	0.00
8	52.0	1.02	10.40			
9	55.1	1.08	11.02	1.08	0.00	0.00
10	55.2	1.08	11.04			
Resultados:						
B	-0.0258					
M	0.02					
R ²	0.9901					
CV r	0.77					
LIC (M)	0.022					
LSC (M)	0.0379					
Criterios de aceptación:						
R ²	No menor de 0.98					
CV r	No mayor a 2 %					
LIC (M)	El intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el valor de cero					
LIC (M)						

Ecuación
Y = 0.02X - 0.0258

Se prepararon por duplicado muestras correspondientes al 9.0%, 9.5%, 10%, 10.5% y 11.0% de la cantidad teórica, se determinó la respuesta analítica y se calculó la ordenada al origen (B), la pendiente (M), el coeficiente de correlación (R²) el coeficiente de variación de regresión (CV r) y el intervalo de confianza para la pendiente con una probabilidad del 97.5 % y n-1 grados de libertad.

Se puede observar que los resultados cumplen con los criterios de aceptación ya que se obtuvo una R² mayor a 0.98, un CV r menor a 2.0 y el intervalo de confianza para la pendiente con una probabilidad de 97.5 % y n-1 grados de libertad no incluye al cero

Figura No. 8 linealidad del sistema para la escala al 10% utilizando potenciómetro



Debido a que se cumple con los criterios de aceptación se concluye que el sistema es lineal en la escala al 10% cuando se utiliza potenciómetro para determinar el punto final.

7.16 Resultados de la Precisión intermedia para el método original (escala 100%) con potenciómetro

Tabla No. 22 Resultados de precisión intermedia para el método original con potenciómetro.

	Analista 1		Analista 2	
Día 1	1 = 500.8 mg	100.84 %	1 = 501.0 mg	100.80 %
	2 = 502.2 mg	99.98 %	2 = 502.0 mg	100.60 %
	3 = 500.5 mg	100.32 %	3 = 501.3 mg	100.16 %
Día 2	1 = 501.5 mg	100.70 %	1 = 500.4 mg	100.34 %
	2 = 501.5 mg	100.12 %	2 = 500.5 mg	100.32 %
	3 = 500.2 mg	100.96 %	3 = 501.6 mg	100.68 %
Totales		Promedio	100.49 %	
		Desvest	0.3200	
		CV	0.32 %	

Se prepararon y titularon 3 diferentes soluciones utilizando potenciómetro, siguiendo el método analítico original al 100%, se realizó por dos analistas y en dos días diferentes, se obtuvo la respuesta analítica y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. como se puede observar en la tabla No. 22, el coeficiente de variación es menor a 2.0 por lo que el método analítico es preciso cuando se realiza por dos analista diferentes en dos días diferentes.

7.17 Resultados de la precisión intermedia para el método escalado al 10 % con potenciómetro

Tabla No. 23 Resultados de precisión intermedia para el método escalado al 10 % con potenciómetro.

	Analista 1		Analista 2	
Día 1	1 = 50.3 mg	99.95 %	1 = 50.6 mg	101.47 %
	2 = 50.6 mg	101.47 %	2 = 51.4 mg	99.89 %
	3 = 52.1 mg	98.55 %	3 = 51.7 mg	99.31 %
Día 2	1 = 52.0 mg	100.79 %	1 = 51.1 mg	100.48 %
	2 = 53.4 mg	98.15 %	2 = 52.2 mg	100.41 %
	3 = 50.8 mg	101.07 %	3 = 51.9 mg	100.99 %
Totales		Promedio	100.21 %	
		Desvest	1.085	
		CV	1.08 %	

Se prepararon y titularon 3 diferentes soluciones utilizando potenciómetro, siguiendo el método analítico escalado al 10%, se realizó por dos analistas y en dos días diferentes, se obtuvo la respuesta analítica y se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. como se puede observar en la tabla No. 23, el coeficiente de variación es menor a 2.0 por lo que el método analítico es preciso cuando se realiza por dos analista diferentes en dos días diferentes.

7.18 *Resumen de resultados de validación*

Tabla No. 22 Resumen de resultados de validación del método original (escala 100%) utilizando potenciómetro

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Dictamen
Precisión	$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 0.34 \%$	Aceptable
Exactitud	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 %	99.78 %	Aceptable
	El $CV \leq 2.0 \%$	$CV = 0.27 \%$	Aceptable
	El intervalo de confianza debe incluir al 100 %	99.49 % - 100.06 %	Aceptable
Linealidad del sistema	R^2 no menor a 0.98	$R^2 = 0.99992$	Aceptable
	CV_r no mayor a 2 %	$CV = 0.38 \%$	Aceptable
	El intervalo de confianza para la pendiente no debe de incluir el valor de cero	0.0032 – 0.0362	Aceptable
Precisión intermedia	$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 0.32 \%$	Aceptable

Tabla No. 23 Resumen de resultados de validación del método escalado al 10% utilizando potenciómetro

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Dictamen
Precisión	$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 1.13 \%$	Aceptable
Exactitud	El promedio debe estar entre el intervalo 98 – 102 %	100.16 %	Aceptable
	El $CV \leq 2.0 \%$	$CV = 1.65 \%$	Aceptable
	El intervalo de confianza debe incluir al 100 %	98.43 % - 101.90 %	Aceptable
Linealidad del sistema	R^2 no menor a 0.98	$R^2 = 0.9901$	Aceptable
	CV_r no mayor a 2 %	$CV = 0.77 \%$	Aceptable
	El intervalo de confianza para la pendiente no debe de incluir el valor de cero	0.022 – 0.0379	Aceptable
Precisión intermedia	$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 1.08 \%$	Aceptable

8. Conclusiones

Se realizó el diseño y validación de dos métodos analíticos escalados al 10 % y al 50 %, para la determinación de tamoxifeno citrato materia prima por titulación no acuosa con ácido perclórico, utilizando solución indicadora y utilizando potenciómetro.

Se realizó la intercomparación de métodos empleando ANADEVA, los resultados obtenidos muestran que el método escalado al 10 % con solución indicadora, si presenta diferencia estadísticamente significativa, mientras que el método escalado al 10% con potenciómetro, no muestra diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto se descartaron los métodos al 50% y 10% con solución indicadora y se procedió a validar los métodos al 100% y al 10% utilizando potenciómetro.

Los resultados de la validación muestran que tanto el método al 10% como el método al 100% cumplen con los criterios de aceptación para la precisión, exactitud y linealidad y precisión intermedia.

Por lo tanto, se concluye que el método a microescala del 10% utilizando potenciómetro, es preciso, exacto y lineal; al utilizar este método se puede disminuir la generación de residuos peligrosos al disminuir la cantidad de reactivos utilizados sin que se vea afectado el desempeño del método analítico y por lo tanto el resultado del mismo.

9. REFERENCIAS

1. Center for drug evaluation and research (CDER), Reviewer guidance: validation of chromatographic methods; November 1994.
2. U.S Department of health and human services, food and drug administration (FDA), Guidance for industry: ICH-Q2A Text on validation of analytical procedures March 1995.
3. U.S Department of health and human services, food and drug administration (FDA), Guidance for industry: ICH-Q2B Validation of analytical procedures; methodology November 1996.
4. U.S Department of health and human services, food and drug administration (FDA), Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation; chemistry, manufacturing and controls documentation (DRAFT) August 2000.
5. U.S Department of health and human services, food and drug administration (FDA), Guidance for industry: Bioanalytical method validation May 2001
6. Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la DGCIS SSA, Métodos analíticos validación México 1989.
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7a ed. SSA, México, 2000 pp. 985 - 987
8. The United States Pharmacopoeia (USP) Ed. XXVI 2004
9. Edwart B. Flint, Carrie L. Kortz and Max A. Taylor. "Microscale pH Titrations Using an Automatic Pipet". Journal of Chemical Education vol. 79 No. 6 June 2002.
10. Gaston A. East and Erica C. Nascimento. "Microscale Determination of Vitamin Weight Titrimetry". Journal of Chemical Education vol. 79 No. 1 January 2002.
11. Eric Joling, Martin J. Goedhart, and Bregje van den Berg. "A Low-Cost and Timesaving Microscale Heater" Journal of Chemical Education vol. 79 No. 9 September 2002.
12. Mono M. Singh, Cynthia B. McGowan, and Zvi Szafran. "Precision in Microscale Titration". Journal of Chemical Education vol. 79 No. 8 August 2002.
13. PLM 1997 "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas" México 43ª Edición 1867, 1868.

14. Bubavari, S., The Merk Index, 11 ed. Edit. Merk and Company Inc.: 1989, USA.
15. Esperanza Torres Espinoza y Juan Pedro Castellón Santana. “Minimización del Impacto Ecológico Empleando Microescala en Laboratorios de Enseñanza Química” . Educación Química, Segunda Época Enero, 2000; 11: (2).
16. Jay L. Devore. Probabilidad y Estadística Para Ingeniería y Ciencias. México. Quinta Edición. THOMSON LEARNING, 2001: 399 -451.
17. Ibáñez J.G. Centro Mexicano de Química en microescala, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Iberoamericana. “La química a Microescala en México Hacia un Panorama General”. Educación Química, Segunda Época Enero, 2000; 11: (1).
18. Márquez de cantú María José. Probabilidad y estadística. México 2004. segunda edición. Editorial MacGraw Hill.
19. Wayne W. Daniel. Bioestadística México, 1989. Tercera edición. Editorial Limusa.
20. Kessler Mathieu. Apuntes de Estadística Industrial. Google España. Departamento de matemática aplicada y estadística universidad politécnica de Cartagena, 2003 : 2 – 17.
21. R.A. Day . Química analítica cuantitativa, México 1990. Quinta edición. Editorial Prentice Hall.
22. Ayres Gilbert H. Análisis químico cuantitativo, México 1995. Editorial Harla.
23. Skoog Douglas A. Química analítica, México 1998. Editorial MacGraw Hill.
24. Comisión de validación de métodos analíticos. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. Edición 2003.
25. Química analítica a microescala total. Google.com.mx México D.F. a 31 Enero 2006
<http://www.tuobra.unam.mx/publicaciones/041228110210.html>
26. Paquete estadístico Statgraphics plus 4.0

Apéndice 1

FORMULAS

Precisión

Tabular los resultados

y1, y2, y3 ... yn

Cálculos preliminares

$$\Sigma y = y1 + y2 + y3 + \dots + yn$$

$$\Sigma y^2 = y1^2 + y2^2 + y3^2 + \dots + yn^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$DE = \left| \frac{N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)} \right|^{1/2}$$

Cálculos finales

Coefficiente de variación:

$$CV = (DE / \bar{Y}) * 100$$

Exactitud

Tabular los resultados del porciento recuperado (R)

R1, R2, R3, ..., RN

Cálculos preliminares

$$\Sigma R = R1 + R2 + R3 + \dots + RN$$

$$\Sigma R^2 = R1^2 + R2^2 + R3^2 + \dots + RN^2$$

$$\bar{R} = (\Sigma R) / n$$

$$DE = \left| \frac{N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)} \right|^{1/2}$$

Cálculos finales
 Coeficiente de variación

$$CV = (DE / \bar{R}) 100$$

Cálculos finales para el intervalo de confianza para el recobro

$$LIC(\mu) = \bar{R} - t * DE(N)^{1/2}$$

$$LSC(\mu) = \bar{R} + t * DE(N)^{1/2}$$

Donde:

LIC(μ) = límite inferior de confianza para la media del recobro

LSC(μ) = límite superior de confianza para la media del recobro

t = Valor de la t de Dunnet con una probabilidad del 95% y n-2 grados de libertad

Linealidad del sistema

Cálculos para el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación

Tabular los resultados

Concentración de la dilución de la solución patrón	Propiedad medida (y)		
	x1	y11	y12.....
x2	y21	y22.....	y2n
.	.	.	.
.	.	.	.
Xt	yt1	yt2.....	ytn

t = número de diluciones.

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

Cálculos para la pendiente y la ordenada al origen:

$$M = \left| \frac{Nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2} \right|$$

$$B = \left| \frac{\Sigma y - m(\Sigma x)}{Nt} \right|$$

Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$\Sigma x = (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = (y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

$$\Sigma x^2 = n(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = (y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + \dots + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2)$$

$$\Sigma xy = x_1(y_{11} + y_{12} + y_{1n}) + x_2(y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t(y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

Cálculos finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \left[\frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{Concentración de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F1n = \frac{y11}{x1}$$

$$Ft1 = \frac{y t1}{x t}$$

$$Ft2 = \frac{y t 2}{x t}$$

$$Ft3 = \frac{y t n}{x t}$$

Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F11 + F12 + F1n + \dots + Ft1 + Ft2 + Ft n$$

$$\Sigma F^2 = F11^2 + F12^2 + F1n^2 + \dots + Ft1^2 + Ft2^2 + Ft n^2$$

—

$$F = \frac{\Sigma F}{N}$$

Donde : N = número de puntos de la linearidad del sistema

Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$CV = (DE / \bar{F}) * 100$$

Cálculos para el intervalo de confianza para la pendiente:

$$LIC_M = M - S_M * t$$

$$LSC_M = M + S_M * t$$

Donde

LIC_M = límite inferior de confianza para la pendiente

LSC_M = límite superior de confianza para la pendiente

M = pendiente

S_M = Desviación estándar de la pendiente

t = Valor de la t de Dunnet con una probabilidad del 95% y n-2 grados de libertad

Tabla de andeva

Cálculos para la varianza

$$s^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} = \frac{n\sum (X_i)^2 - (\sum X_i)^2}{n(n-1)}$$

Cálculos para la suma de cuadrados entre los grupos

$$SC_{\text{entre}} = \sum n(\bar{X}_i - \bar{X}_j)^2 = \sum \frac{t^2}{n} - \frac{T^2}{N}$$

Donde

t es la suma de cada grupo de datos

T es la suma total de todos los datos

n es el número de datos de cada grupo

N es el número total de datos

Cálculos para la suma de cuadrados dentro de los grupos

$$SC_{\text{dentro}} = \sum \sum (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 = \sum \sum X^2 - \sum \frac{T^2}{n}$$

Donde X es cada uno de todos los datos

T es la suma de cada grupo de datos

n es el número de datos de cada grupo

Cálculos para el cuadrado medio entre los grupos

$$CM_{\text{entre}} = \frac{n\sum (\bar{X}_i - \bar{X}_j)^2}{k-1} = \frac{SC_{\text{entre}}}{k-1}$$

Donde

k es el número de grupos

Cálculos para el cuadrado medio dentro de los grupos

$$CM_{\text{dentro}} = \frac{\sum \sum (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{N - k} = \frac{SC_{\text{dentro}}}{N - k}$$

Donde

N es el número total de datos

k es el número de grupos

Cálculos para la razón de varianzas

$$RV = \frac{CM_{\text{entre}}}{CM_{\text{dentro}}}$$

Cálculos para los grados de libertad del numerador

gl del numerador = $k - 1$

gl del denominador = $N - k$

Donde

k es el número de grupos

N es el número total de datos

Cálculos para la prueba F

Para realizar la prueba F se tiene que consultar la tabla “percentiles de la distribución F con un nivel de significancia de 0.05 con $k-1$ y $N - k$ grados de libertad, a este número se le conoce como el valor “P”.

Si el valor calculado para la razón de varianzas es más grande que este valor P y el valor de P es menor a 0.05, se dice que las varianzas no son iguales y por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa.

Si el valor calculado para la razón de varianzas es más pequeño que este valor P y el valor P es mayor a 0.05, se dice que las varianzas si son iguales y por lo tanto no existe diferencia estadísticamente significativa.