



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

“Validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Vitaminas A y D₃ en una solución oral”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PEDRO ANGEL CLEMENTE HERNÁNDEZ

ASESORA: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Imposible es solo una palabra que usan los hombres débiles para vivir fácilmente en el mundo que se les dio, sin atreverse a explorar el poder que tienen para cambiarlo. Imposible NO es un hecho, es una opinión. Imposible no es una declaración, es un reto. Imposible es potencial. Imposible es Temporal, "Imposible is nothing"

- Mohamed Ali-

DEDICATORIAS

A mis padres: Juan Clemente e Ignacia Hernández porque siempre me han dado su apoyo incondicional y porque gracias a su esfuerzo es que he terminado una etapa más en mi vida. Gracias por todo lo que me han brindado.

A mis hermanos: Toña, Petra, Lucí y Pas, que siempre me alentaron a seguir adelante.

A Selene: Porque eres una persona muy especial para mí, siempre dispuesta a escucharme, ayudarme y permanecer conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por darme la oportunidad de conocerte. Te quiero mucho.

A la generación QFB 28 y en especial a mis amigos: Lilitiana, Wendy, Clara, Cristina, Viví, Leslie, Ana, Araceli, Itzel, Olga, Lucía, Hilda, Hellen, Rocío, Gerardo, Néstor, Víctor, Asaf, Bladimir, Arturo. Los estimo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado una familia en quien apoyarme, por haberme dado unos padres ejemplares y porque me permitió terminar mi carrera.

A mis papas porque siempre me han sabido guiar por el buen camino.

A mi asesora de tesis, la Dra. Raquel López Arellano, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo.

A las personas del LEM-Farmacia: Adriana, Claudia, Lupita, Aide, Tere, Oscar y la Dra. Elizabeth. Gracias por su ayuda durante mi estancia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la FES-Cuautitlán por la preparación académica recibida.

A mis sinodales: Elia Granados, Guadalupe Rebolgar, Dra. Raquel López, Eva Molina y José Juan Escobar por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y cuyos puntos de vista ayudaron a mejorar este trabajo.

Agradezco también a Laboratorios Alpharma, SA de CV, por todas las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	5
1. Introducción.....	6
2. Objetivo.....	8
3.- Generalidades.....	10
3.1 Formas farmacéuticas orales.....	10
3.2 Las vitaminas.....	11
3.2.1 Vitaminas Hidrosolubles.....	12
3.2.2 Vitaminas Liposolubles.....	13
3.3 Propiedades fisicoquímicas de vitamina A.....	14
3.3.1 Importancia biológica de la vitamina A.....	15
3.4 Propiedades fisicoquímicas de vitamina D ₃	17
3.4.1 Importancia biológica de la vitamina D ₃	18
3.5 Definición de Validación.....	20
3.6 Importancia de la validación dentro de la industria farmacéutica.....	20
3.7 Características de un método analítico.....	21
3.8 Tipos de procedimientos analíticos a ser validados.....	26
3.9 Generalidades sobre Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	27
3.9.1 Definición de cromatografía.....	27
3.9.2 Formas de separación en Cromatografía Líquida.....	28
3.9.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	30
3.9.4 Aspectos teóricos de CLAR.....	31
3.9.5 Descripción del proceso cromatográfico.....	35
3.10 El pico cromatográfico.....	39
3.11 Tipos de cuantificación.....	40
4.- Reactivos, material y equipo.....	43
5.- Descripción del método.....	44

6.- Metodología para la validación del método analítico.....	47
6.1 Precisión del sistema.....	47
6.2 Adecuabilidad del sistema.....	48
6.3 Linealidad del sistema.....	49
6.4 Especificidad.....	50
6.5 Exactitud y Repetibilidad del método.....	50
6.6 Linealidad del método.....	51
6.7 Precisión intermedia (Reproducibilidad analista y Día).....	52
6.8 Robustez del método (pH 3.0, 4.5 y 6).....	53
6.9 Estabilidad de la muestra analítica.....	53
6.10 Tolerancia del método.....	54
7.- Resultados y Discusión.....	56
7.1 Precisión del sistema.....	58
7.2 Adecuabilidad del sistema.....	60
7.3 Linealidad del sistema.....	63
7.4 Especificidad.....	71
7.5 Exactitud y Repetibilidad del método.....	72
7.6 Linealidad del método.....	76
7.7 Precisión intermedia (Reproducibilidad analista y Día).....	84
7.8 Robustez del método (pH 3.0, 4.5 y 6).....	88
7.9 Tolerancia del método.....	90
7.10 Estabilidad de la muestra analítica.....	92
8.- Conclusiones.....	95
9.- Anexo.....	96
10.- Bibliografía.....	98

INDICE DE FIGURAS

Figura No	Página
1.- Metabolitos activos de la vitamina A.....	15
2.- Cualidades que debe cumplir un método analítico.....	21
3.- Adsorbentes clasificados en orden decreciente de fuerza.....	29
4.- Separación de picos cromatográficos según la resolución de la columna.....	34
5.- Componentes principales de un equipo de CLAR.....	35
6.- Representación de una columna cromatográfica.....	36
7.- Forma de las partículas del empaque de una columna cromatográfica.....	37
8.- Selección del tipo de detector dependiendo de la muestra a analizar.....	38
9.- Representación del fenómeno de retención en un cromatograma.....	39
10.- Representación de una estela.....	40
11.- Esquema de las actividades de la metodología.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

No	Página
1.- Área de los picos para evaluar la precisión del sistema de vitaminas A y D ₃	58
2.- Resultados para evaluar Adecuabilidad del sistema para vitamina D ₃	60
3.- Datos para evaluar Adecuabilidad del sistema para Vitamina A.....	61
4.- Área de pico en función de la concentración de Vitamina D ₃	63
5.- Resultados de regresión para linealidad del sistema de Vitamina D ₃	64
6.- Área de pico en función de la concentración de Vitamina A.....	67
7.- Resultados de regresión para linealidad del sistema de Vitamina A.....	68
8.- Resultados obtenidos de los cromatogramas para evaluar la especificidad del método para Vitaminas D ₃ y A.....	71
9.- Resultados de porcentaje de recobro de Vitamina D ₃	72
10.- Resultados del porcentaje de recobro de Vitamina A.....	74
11.- Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de vitamina D ₃	76
12.- Análisis de regresión para linealidad del sistema de Vitamina D ₃	77
13.- Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de Vitamina A.....	80
14.- Análisis de regresión para linealidad del sistema de Vitamina A.....	81
15.- Porcentaje de recobro de vitamina D ₃ por dos analistas en dos días diferentes.....	84
16.- Porcentaje de recobro de vitamina A por dos analistas en dos días diferentes.....	85
17.- Resultados de % de recobro de vitamina D ₃ para evaluar robustez del método.....	88
18.- Resultados de % de recobro de vitamina A para evaluar robustez del método.....	89
19.- Porcentaje de recobro de vitaminas D ₃ y A para evaluar Tolerancia del método.....	90
20.- Prueba F para la varianza de dos muestras. Vit D ₃	91
21.- Prueba F para la varianza de dos muestras. Vit A.....	91
22.- Porcentaje de recobro de vitamina D ₃ para evaluar estabilidad de la muestra analítica.....	92

23.- Porcentaje de recobro de vitamina A para evaluar estabilidad de la muestra analítica.....	93
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1.- Representación gráfica para precisión del sistema de Vitamina D ₃	59
2.- Representación gráfica para precisión del sistema de Vitamina A.....	59
3.- Representación gráfica de los parámetros cromatográficos por cada inyección de vitamina D ₃	60
4.- Variación en la resolución de Vitamina D ₃	61
5.- Factor de coeio para Vitamina A.....	61
6.- Parámetros por inyección para vitamina A.....	62
7.- Linealidad del sistema para vitamina D ₃	64
8.- Gráfico de residuales para linealidad del sistema, Vit D ₃	66
9.- Gráfico de probabilidad normal para linealidad del sistema, Vit D ₃	66
10.- Linealidad del sistema para vitamina A.....	68
11.- Gráfico de residuales para linealidad del sistema, Vit A.....	70
12.- Gráfico de probabilidad normal para linealidad del sistema, Vit A.....	70
13.- Porcentaje recuperado de Vit D ₃ para evaluar exactitud y repetibilidad.....	73
14.- Porcentaje recuperado de Vit A para evaluar exactitud y repetibilidad.....	75
15.- Linealidad del método para Vitamina D ₃	77
16.- Gráfico de residuales para linealidad del método, Vit D ₃	79
17.- Gráfico de probabilidad normal para linealidad del método, Vit D ₃	79
18.- Linealidad del método para vitamina A.....	81
19.- Gráfico de residuales para linealidad del método, Vit A.....	83
20.- Gráfico de probabilidad normal para linealidad del método, Vit A.....	83
21.- Gráfico de medias. Reproducibilidad del método Vit A.....	87
22.- Comparación de medias para estabilidad de la muestra . Vit D ₃	93
23.- Comparación de medias para estabilidad de la muestra. Vit A.....	94

1.- INTRODUCCIÓN

La validación de métodos es una de las medidas reconocidas como parte necesaria de todo sistema de garantía de calidad en la química analítica. Estos métodos deben tener la habilidad de proporcionar datos precisos y confiables en el menor tiempo posible. En algunos sectores, como la industria farmacéutica y la alimenticia, se encuentra legislado el uso de métodos analíticos validados.

Dentro de la industria farmacéutica el desarrollo y validación de un método analítico es de gran importancia para el desarrollo y manufactura de productos farmacéuticos ya que estos métodos proporcionan información sobre la potencia, pureza y estabilidad de sus productos. (Pharmtech, Año 2005. Green, Año 1996)

Una vez que se ha desarrollado un método analítico, es conveniente validarlo. La validación del método establece que sus características, son adecuadas para el uso que se pretende.

La validación se realiza llevando a cabo una serie de experimentos en los que se emplean las condiciones específicas de la metodología propuesta y usando el mismo tipo de matriz en el que se pretende aplicar el método. Ello implica la determinación de un número de parámetros tales como especificidad, precisión del sistema, linealidad del sistema y del método, exactitud y repetibilidad, reproducibilidad del método, tolerancia, robustez, estabilidad de la muestra analítica, límite de detección y límite de cuantificación. La validación completa de un método es una tarea que puede ser tediosa, pero las consecuencias de no hacerlo es seguro una pérdida de tiempo, dinero y recursos. (Pharmtech, Año 2005)

Las regulaciones actuales de las Buenas Prácticas de Manufactura, descritas en la legislación de la FDA (Food and Drug Administration) dan como requerimiento el proceso de validación y control de productos farmacéuticos.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado es que las normativas nacionales e internacionales exigen a los laboratorios, acciones para asegurar la calidad de la información que suministran. Tales medidas incluyen el uso de métodos de análisis validados, el empleo de procedimientos de control de calidad interno, la participación en ejercicios interlaboratorios de aptitud y la acreditación bajo un estándar internacional como por ejemplo ISO/IEC 17025. Fundamentalmente en este tipo de normas se hace especial hincapié, entre otras cosas, al establecimiento de la confiabilidad en las mediciones, quizás el eje central en la tarea de validar un método de análisis. (IUPAC, 2002)

La validación se aplica a un proceso definido para determinar un analito específico en un tipo de material de prueba particular utilizado para un propósito específico. En general, la validación debe proporcionar la evidencia documentada de que el método se comporta de forma adecuada para la finalidad perseguida en todo el conjunto de concentraciones del analito y de materiales de ensayo a los que se aplica. (Green, 1996. IUPAC, 2002)

El presente trabajo consta de 3 capítulos. En primero de ellos abarca las generalidades sobre las vitaminas, su importancia y algunas de las propiedades fisicoquímicas de la vitamina A y D₃, las cuales son los analitos en cuestión; también se menciona brevemente lo que es la cromatografía y en que consiste la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, al igual que la definición de validación, los parámetros a determinar para validar un método y su importancia dentro de la industria farmacéutica. El siguiente capítulo describe la metodología a seguir dentro del laboratorio de control de calidad de Laboratorios Alparma, SA de CV para evaluar cada uno de los parámetros analíticos del método y el material y equipo necesarios para hacerlo y por último en el tercer capítulo se reportan los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros con su respectivo análisis y la conclusión sobre la metodología validada.

2.- OBJETIVO

Validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Vitaminas A y D₃ en una solución oral siguiendo la normatividad mexicana con la finalidad de demostrar que el método cumple con los criterios de aceptación predeterminados y así asegurar la calidad de la información suministrada por Laboratorios Alparma ante la Secretaría de Salud.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

3.- GENERALIDADES

3.1 Formas Farmacéuticas orales

Las formas farmacéuticas en solución se pueden definir como formas farmacéuticas líquidas constituidas por uno o más fármacos activos disueltos en un vehículo adecuado y que se administran por vía oral, dosificadas volumétricamente. Las soluciones deben ser transparentes, siempre que no contengan medicamentos disueltos en estado coloidal. Se distinguen entre soluciones verdaderas con una distribución de una dispersión iónica o moléculas en las que las partículas son menores de 1 nm, y soluciones coloidales con una distribución de partículas de un orden de magnitud comprendido entre 1 y 100 nm (Voigt, 1982)

En una solución se pueden señalar los siguientes componentes:

- Principio activo
- Coadyuvante
- Vehículo
- Modificadores del pH
- Correctivo del sabor
- Correctivo del olor
- Correctivo del color
- Conservadores
- Secuestrantes
- Antioxidantes

La forma de solución es la indispensable para que el fármaco se absorba en el tracto digestivo. Las soluciones son fáciles de administrar y son formas de dosificación aceptables para uso pediátrico y geriátrico. La estabilidad de los principios activos en solución es menor que en estado sólido además de que proveen un medio adecuado para el crecimiento bacteriano por lo que es necesario el uso de conservadores. Algunos fármacos son inestables en agua o sensibles a la presencia de oxígeno y CO₂.

No todas las sustancias son completamente solubles en agua y pueden precipitarse por lo que se utilizan técnicas para incrementar la solubilidad de estos fármacos. La cosolvencia es un proceso para incrementar la solubilidad de un fármaco usando una combinación de solventes. Algunos cosolventes disponibles son etanol, alcohol isopropílico, sorbitol, glicerol y propilenglicol. Si un fármaco es un ácido o base débil la solubilidad en agua está influenciada por el pH. El pH de máxima solubilidad no precisamente es el de mayor estabilidad del producto. (Swarbrick, 2002)

3.2 Las vitaminas

La palabra vitamina fue acuñada por el bioquímico polaco Casimir Funk, que en 1912 aisló la primera vitamina en Londres, donde estaba investigando. Se trataba de una sustancia presente en la cascarilla de arroz que podía prevenir una enfermedad temida entonces, el beri-beri. Funk creía que esta sustancia era un aminoácido y la llamó vitamina porque consideraba que eran necesarias para la vida (vita) y la terminación amina es porque creía que todas estas sustancias poseían la función Amina. Ahora sabemos que las vitaminas son esenciales para la vida pero no todas son aminas (Tolonen 1995, Tolonen 2000).

Las vitaminas pueden definirse como compuestos orgánicos que el organismo necesita en pequeñas cantidades para los procesos metabólicos. El organismo no puede producir cantidades suficientes de vitaminas para cubrir sus necesidades. Las distintas vitaminas no se correlacionan entre sí, ni química ni funcionalmente. Cada vitamina desempeña en el organismo su propia función y no puede ser sustituida por ninguna otra sustancia. Las vitaminas son nutrientes acalóricos, es decir no generan energía (Tolonen, 1995). Normalmente se utilizan en el interior de las células como precursoras de las coenzimas, a partir de los cuales se elaboran las miles de enzimas que regulan las reacciones químicas de las que viven las células (www.aula21.net, 2005). Las Vitaminas son esenciales en el metabolismo y necesarias para el crecimiento y buen funcionamiento del cuerpo. Solo la Vitamina D es producida por el organismo, el resto se obtiene a través de los alimentos. La carencia de vitaminas se denomina Hipovitaminosis que puede llevarnos a contraer enfermedades graves que podríamos corregir con una alimentación balanceada y el exceso de alguna de ellas puede producir Hipervitaminosis. (Aristizabal, 2005)

El interés por los buenos hábitos de alimentación en humanos y animales han hecho que se incremente el consumo de suplementos vitamínicos, por lo cual es importante que se disponga de preparaciones que repongan la posible deficiencia de vitaminas en la dieta y es por esta razón que los multivitamínicos farmacéuticos están siendo ampliamente utilizados. (Moreno, 2000)

Las vitaminas se dividen en dos clases: *Liposolubles e Hidrosolubles*. La solubilidad de las vitaminas le confiere algunas de sus características como la forma en que son absorbidas y transportadas en el torrente sanguíneo, la manera en que se almacenan en el organismo y cómo son eliminadas. (Sizer, 1997)

3.2.1 Vitaminas Hidrosolubles

Las vitaminas que pertenecen a este grupo son: Vitamina C (ácido ascórbico), Biotina, Vitamina B₁ (tiamina), Vitamina B₂ (riboflavina), Vitamina B₃ (niacina), Vitamina B₅ (ácido pantoténico), Vitamina B₆ (piridoxina) y Vitamina B₁₂ (cianocobalamina). El cuerpo absorbe fácilmente estas vitaminas que se encuentran preferentemente en los líquidos orgánicos, en el suero y en el líquido intersticial. El exceso de estas son eliminadas por la orina por lo que no tienen efecto tóxico. (Sizer, 1997)

La carencia de estas vitaminas se aprecian en primer lugar en los tejidos de rápido crecimiento y activo metabolismo como la piel, los cabellos, las uñas, la sangre, los órganos digestivos y el sistema nervioso. Los síntomas de esta carencia son: anemia, alteraciones gástricas y desordenes en el sistema nervioso. (Tolonen, 1995)

3.2.2 Vitaminas Liposolubles

Las vitaminas liposolubles, A (retinol), D (calciferol), E (tocoferol) y K (antihemorrágica), se consumen junto con alimentos que contienen grasa. Al igual que los lípidos estas vitaminas requieren de la secreción de jugos biliares para su absorción. Una vez absorbidas son almacenadas en el hígado y en el tejido adiposo hasta que el organismo las requiera, por lo que es posible, tras un consumo suficiente, subsistir una época sin su aporte ^(Aristizabal, 2005, Sizer,1997), pero si se consumen en exceso (más de 10 veces las cantidades recomendadas) pueden resultar tóxicas ^(Guía nutricional, 2005).

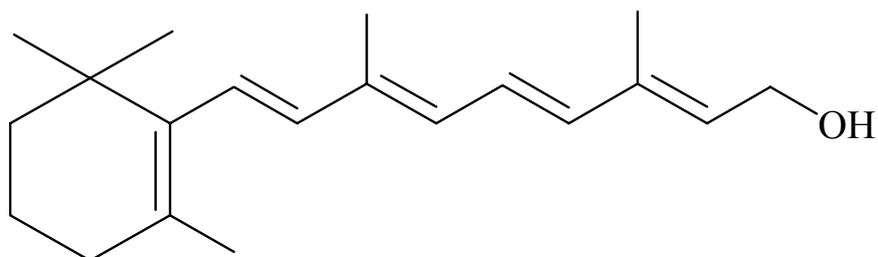
Las fuentes más ricas de estas vitaminas son las grasas y los aceites vegetales, las verduras y los lípidos de la carne, de la mantequilla y de los huevos. Las vitaminas liposolubles participan en el metabolismo de los nutrientes junto con los lípidos. En la sangre se ligan a los quilomicrones y proteínas que las transportan a los distintos tejidos. Generalmente se eliminan con las heces y la bilis. A diferencia de las vitaminas hidrosolubles, no se eliminan por la orina ^(Tolonen, 1995). Las vitaminas liposolubles tienen propiedades comunes:

- Son más estables al calor que las vitaminas hidrosolubles y resisten mejor la acción y los tratamientos industriales.
- Al absorberse al mismo tiempo que los lípidos todo lo que interfiera en la absorción de las grasas tendrá como resultado una mala utilización de estas vitaminas.
- Como no son solubles en agua, estas vitaminas no serán excretadas por la orina. Se mantendrán en reserva en el organismo, principalmente en el hígado, por lo que los síntomas de carencia tardaran mucho en manifestarse.
- Debido a que se mantienen en reserva en el organismo, ingeridas en exceso, especialmente la vitamina A y la D, pueden ser tóxicas. ^(Dominguez, 2005)

Actúan sobre: el crecimiento, la visión, los tejidos epiteliales, el desarrollo óseo, como antioxidantes y en la coagulación sanguínea.

3.3 Propiedades fisicoquímicas de la vitamina A

Estructura química:

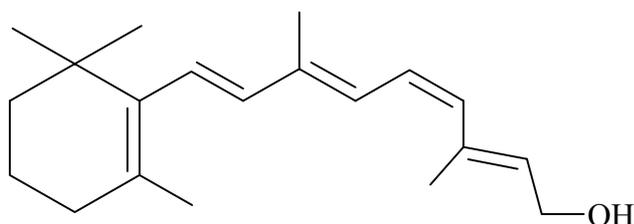


- *Nombre químico:*
3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol
- *Nombre común:* Vitamina A, retinol, axeroftol
- *Fórmula condensada:* C₂₀H₃₀O
- *Peso molecular:* 286.46 g/mol
- *Formas:* Alcohol (vitamina A₁); 9-cis-vitamina A₁, 11-cis-vitamina A₁; 13-cis-vitamina A₁; aldehído de vitamina A (C₂₀H₂₈O); aldehído de 11-cis-vitamina A₁; ácido carboxílico de vitamina A₁ (C₂₀H₂₈O₂) ^(Connors, 1986)
- *Equivalencia:* 1UI Vit. A = 0.3 mcg retinol ^(Mora, 2002)
- *Propiedades físicas:* Son prismas de color amarillo con un punto de fusión de 62 a 64° C y un punto de ebullición a 137-138° C ^(Connors, 1986)

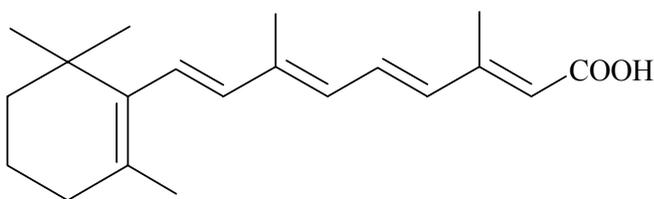
La vitamina A es insoluble en agua. Soluble en alcohol, éter, éter de petróleo, cloroformo, acetona, grasas y aceites. Por su estructura química insaturada esta vitamina sufre de reacciones de oxidación con el oxígeno y peróxidos. Con el oxígeno se forman epóxidos y otros productos de oxidación. El palmitato de retinol es extremadamente sensible a los medios ácidos lo cual causa rearrreglos de los dobles enlaces y deshidratación y eventualmente sigue una isomerización cis-trans. La isomerización ocurre por almacenamiento a pH menor a 4.5, no es afectada por agentes reductores y es relativamente estable en medios alcalinos ^(García, 1995).

3.3.1 Importancia biológica de la vitamina A

El retinol es el alcohol primario derivado de la asociación de 4 unidades de isopreno. Se le considera la forma activa de la vitamina A, debido a que puede oxidarse fácilmente en forma enzimática para dar lugar a otros compuestos metabólicamente activos como el 11-cis-retinal y el ácido retinoico. Se sabe desde hace mucho tiempo que el cis-retinal es necesario para la visión nocturna y que las deficiencias causan ceguera. Más recientemente se ha descubierto que el ácido retinoico estimula la división de las células, y que estas 2 sustancias son mediadoras de la división celular.



11-cis-retinol



Ácido retinoico

Figura 1. Metabolitos activos de la vitamina A^(Robinson, 1991)

La vitamina A es necesaria para un crecimiento normal, una adecuada respuesta inmune, para el desarrollo fetal y es fundamental para que se lleve a cabo correctamente el ciclo visual. El ácido retinoico (forma activa del retinol en la piel) regula la queratogénesis y esto es necesario para mantener la piel siempre tersa, fresca y húmeda.

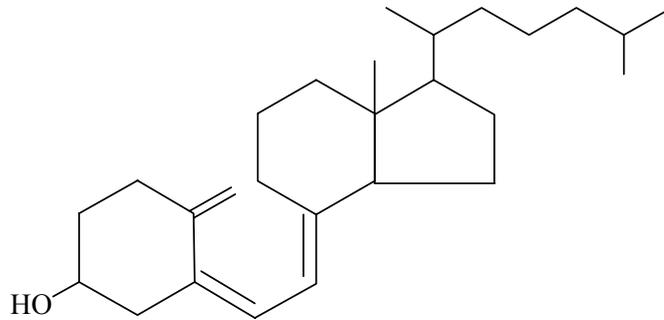
La deficiencia de vitamina A no va acompañada de ningún síndrome como ocurre con otras vitaminas. En animales de laboratorio la carencia de este compuesto origina un cese en el crecimiento (no esquelético), y cornificación de los epitelios en los aparatos digestivo, respiratorio, urinario y en la vagina. La deficiencia extrema de vitamina A en adultos humanos es muy rara debido a la gran capacidad de reserva que posee el hígado humano (hasta 600 días). Los síntomas son, hiperqueratosis folicular y ceguera nocturna que si no se soluciona se puede producir la perforación de la córnea, con la consecuente ceguera irreversible. Esto no sucede comúnmente en adultos pero si en niños menores de 5 años que tienen grandes deficiencias. (Robinson, 1991)

La **deficiencia primaria de vitamina A** suele ser causada por privación dietética prolongada. La **deficiencia secundaria de vitamina A** puede deberse a insuficiencia de conversión de caroteno en vitamina A o a interferencia en su absorción, almacenamiento o transporte. La interferencia con la absorción o el almacenamiento es probable la fibrosis quística, las pancreatopatías, la derivación duodenal, la obstrucción parcial congénita del yeyuno, la obstrucción de las vías biliares y la cirrosis.

El intervalo normal de los niveles plasmáticos de retinol es de 20 a 80 µg/dl; El promedio de la proteína fijadora de retinol (PFR) en plasma es 47 µg/ml en varones adultos y 42 µg/ml en mujeres adultas. Los niveles plasmáticos de vitamina A y PFR descienden en los estados de deficiencia y en las infecciones agudas. En el embarazo y la lactancia, las dosis terapéuticas no deben excederse para evitar posibles daños al feto o lactante. La vitamina A (retinol) es liposoluble y se encuentra principalmente en aceites de hígado de pescado, hígado, yemas de huevo, mantequilla y nata. Las verduras de hojas verdes y las hortalizas amarillas contienen β-caroteno y otros carotenoides provitamínicos que se convierten en retinal en las células de la mucosa del intestino delgado. El retinal es reducido a retinil y posteriormente esterificado. La mayor parte de la vitamina A del organismo se almacena en el hígado en forma de retinilpalmitato. Se libera a la circulación en forma de retinol unido a una proteína fijadora de retinol y a la prealbúmina (transtiretina) (Vademécum, 1999).

3.4 Propiedades fisicoquímicas de vitamina D₃

Estructura química:



- *Nombre científico:* 9,10-secocolestan-5, 7,10(19)-trien-3-ol
- *Nombre común:* Vitamina D₃, 7-dehidrocolesterol activado, colecalciferol.
- *Formula condensada:* C₂₇H₄₄O
- *Peso molecular:* 384.62 g/mol
- *Formas disponibles:* colecalciferol (Connors, 1986)
- *Equivalencia:* 1U= 0.025 mcg (Mora, 2002)

Propiedades físicas: Agujas cristalinas blancas; punto de fusión 84-85° C; insoluble en agua, soluble en alcohol, cloroformo y aceites grasos. Las soluciones en disolventes volátiles son inestables y deben de utilizarse de inmediato. Su isomerización tiene lugar en las soluciones lo que depende del tiempo y de la temperatura (Connors, 1986. Sweetman, 2003).

La estabilidad del colecalciferol se ve afectada por la luz, temperatura, oxígeno y humedad. Es estable a temperatura ambiente pero a 40° C o más y con una humedad relativa mayor al 45 % es muy inestable. Sus formulaciones son estabilizadas con la adición de antioxidantes y solubilizantes; es más estable que el ergocalciferol (Connors, 1986).

3.4.1 Importancia biológica de la vitamina D₃

La vitamina D existe bajo dos formas, calciferol (vitamina D₂) y colecalciferol (vitamina D₃). Están constituidas por una molécula del grupo alcohol. Es estable y resistente al calor y a la oxidación, así como a los ácidos y álcalis. Es sensible a la luz, especialmente las ondas UV. Es el precursor de muchas hormonas y del colesterol. Esta vitamina da la energía suficiente al intestino para la absorción de nutrientes como el calcio y las proteínas. Es necesaria para la formación normal y protección de los huesos y dientes contra los efectos del bajo consumo de calcio. También influye en la función de la glándula paratiroides. (Aristizabal 2005, Domínguez 2005)

El precursor de la vitamina D₃ se encuentra almacenado bajo la piel y en la superficie. Cuando los rayos UV del sol llegan a la piel el precursor se transforma en vitamina D₃ que será distribuida por todo el organismo. (Domínguez, 2005)

En conjunto con calcitonina y la hormona paratiroidea regula el metabolismo del calcio y del fósforo en el intestino, hueso y posiblemente en los riñones. Facilita la absorción intestinal de calcio y también puede iniciar el transporte de fósforo. De esta forma, el aumento del calcio sérico y del fósforo permite una mineralización normal del esqueleto.

La vitamina D también moviliza calcio a partir de los huesos para mantener niveles plasmáticos apropiados.

La vitamina D se deposita en las células del epitelio y estimula la síntesis de RNA, fosfatasa alcalina y una proteína ligadora del calcio. Una vez en el plasma, parte del calcio se une a la albúmina plasmática y la fracción libre se distribuye para almacenarse en el hueso hasta un 99%. El calcio está involucrado en la coagulación sanguínea, en la contracción y la relajación muscular, la transmisión de los impulsos nerviosos y la liberación de neurotransmisores, así como en la actividad de glándulas endocrinas y exógenas.

La vitamina D, administrada por vía oral, se absorbe por el intestino delgado en presencia de bilis. Aparece en la linfa y luego en el plasma, donde viaja unida a una α -globulina específica y es llevada al hígado y riñón. El colecalciferol en el hígado se biotransforma a calcifediol y en el riñón a calcitriol; luego ambos son hidroxilados originando metabolitos menos activos que son excretados por la bilis. La vitamina D desaparece del plasma con una vida media entre 19 a 25 horas, pero se almacena en los depósitos de grasa del organismo. La vía primaria de excreción es la bilis y solo un pequeño porcentaje de la dosis administrada se encuentra en la orina. (Vademécum, 1999)

La carencia de vitamina D produce en los niños malformaciones óseas, caries dental y hasta Raquitismo, una enfermedad que produce malformación de los huesos. En los adultos puede presentarse osteoporosis, reblandecimiento óseo u osteomalacia. Debido a que la vitamina D es soluble en grasa y se almacena en el cuerpo, exceder su consumo produce trastornos digestivos, vómito, diarrea, daños al riñón, hígado, corazón y pérdida de apetito. (Aristizabal, 2005)

Los alimentos que contienen vitamina D son: sardina, atún, quesos grasos, margarina, huevo, leche y yogurt.

3.5 Definición de validación

Una vez que se ha desarrollado un método analítico, es conveniente validarlo. Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra. (Colegio QFB's, 2002)

Tanto la FDA como la Secretaría de Salud en México define la palabra Validación como el “establecer documentalmente una evidencia la cual proporcione un alto grado de seguridad de que un proceso específico será capaz de reproducir consistentemente un producto con sus atributos y especificaciones de calidad preestablecidos.” (Colegio QFB's 2002, FDA 2005)

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. La validación se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. (Fernández, 2002)

3.6 Importancia de la validación dentro de la industria farmacéutica

Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de calidad de una empresa farmacéutica, ya que impacta de manera directa en la calidad del producto. Es por ello que la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993 (Buenas prácticas de fabricación) establece que todos los métodos analíticos deben de ser validados (SSA 1993). Es necesario señalar que los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales son solamente métodos generales. Estos no precisan de validación, aunque deben ser comprobados antes de su uso rutinario para verificar la idoneidad en las condiciones de laboratorio.

Sin embargo, para el caso de las formas farmacéuticas terminadas, que pueden variar su composición cualitativa o cuantitativa según el fabricante, habrá que proceder en cada caso a la validación del método analítico que demuestre su aplicabilidad teniendo en cuenta los posibles excipientes de la forma farmacéutica y demostrar que su especificidad, exactitud y precisión son adecuadas.. (Fernández 2002)

3.7 Características de un método analítico

Como ya se ha mencionado, la validación tiene la finalidad de demostrar que una metodología analítica es exacta, específica y reproducible dentro de un intervalo específico al cual el analito en cuestión va a ser analizado. En México como en otros países, las industrias farmacéuticas deben aprobar sus métodos para cumplir con las regulaciones sanitarias. Para validar un método analítico, según la USP, las cualidades que se deben probar son: (Waters, 2005)

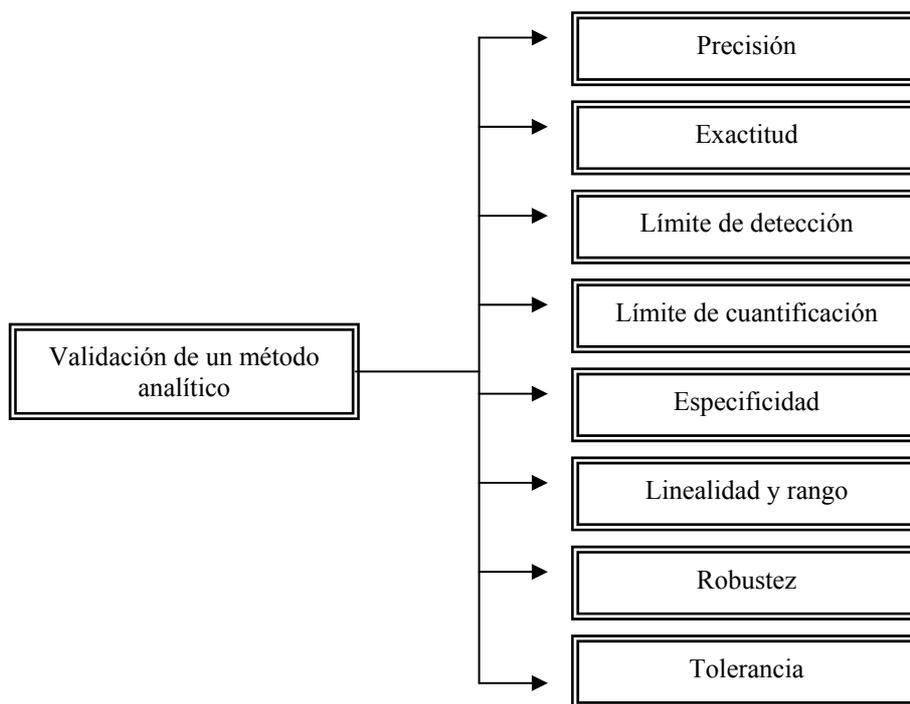


Figura 2. Cualidades que debe cumplir un método analítico (Waters,2005) . Ver especificaciones en la página 51

Además de los parámetros ya descritos la USP menciona que la **adecuabilidad del sistema** es parte integral de los métodos cromatográficos. Aunque se menciona en otro apartado, este parámetro debe ser evaluado durante la validación de un método cromatográfico. (Waters 2005). A continuación se proporciona la definición de cada uno de las cualidades de un método:

3.7.1 Exactitud

La exactitud es la medida del grado de concordancia entre el valor de referencia del analito (también conocido como valor verdadero) y el valor obtenido del analito empleando el método. La exactitud es una medida de los errores sistemáticos que se cometen para obtener un valor. Como el valor verdadero raramente es conocido, la estimación de la exactitud representa un reto analítico. La exactitud se puede estimar de la siguiente forma:

- Adicionando cantidades conocidas de un analito de referencia que este perfectamente caracterizado a la muestra y expresar la exactitud como la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada (recobro) (Tonseth, 1993)

3.7.2 Precisión

Es la medida del grado de dispersión entre una serie de resultados que se obtienen al realizar varias veces el mismo procedimiento a una misma muestra bajo las mismas condiciones establecidas. La precisión se puede considerar en 3 niveles: **Repetibilidad**, **precisión intermedia** y **reproducibilidad**. Este parámetro se puede determinar usando la muestra o por medio de la elaboración de un placebo adicionado (muestra de un placebo al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito) y por lo general se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de la serie de medidas.

La repetibilidad (conocida también como precisión intra-ensayo) expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación dentro de un intervalo corto de tiempo.

La precisión intermedia expresa la concordancia entre las determinaciones realizadas en un mismo laboratorio. Ejemplo: diferentes analistas, diferente equipo, diferentes días de análisis, etc.

La reproducibilidad expresa la precisión del método analítico al llevar a cabo determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (estudios aplicados para la estandarización de metodologías) ^(ICH, 1995)

3.7.3 Especificidad

Es la habilidad de medir con exactitud únicamente al analito de interés en presencia de otros componentes que están presentes en la muestra o matriz. Es una medida del grado de interferencia de muchas sustancias como otros principios activos, excipientes, impurezas, productos de degradación, asegurándose que la respuesta analítica solo se deba al analito de interés. ^(Waters, 2005)

3.7.4 Límite de detección

El límite de detección se define como la concentración del analito mas pequeña en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. En los sistemas analíticos donde el intervalo al que se lleva a cabo la validación no lo incluye o no se aproxima no es necesario que este parámetro forme parte de la validación. ^(Labcompliance 2005, FAO 1997)

3.7.5 Límite de cuantificación

Es la concentración más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con una exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito. (Labcompliance 2005, FAO 1997)

3.7.6 Linealidad y rango

La linealidad de un método analítico es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración de un analito dentro de un intervalo determinado. La linealidad se expresa comúnmente en términos del valor de la pendiente de la regresión que se calcula de acuerdo a relaciones matemáticas establecidas con los resultados obtenidos del análisis de las muestras al variar la concentración del analito. El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración más baja y la concentración más alta del analito dentro de los cuales el método puede considerarse validado ya que se demuestra que estos niveles de concentración son determinados con precisión y exactitud usando el método establecido. (Szepesi, 1990)

3.7.7 Robustez

La robustez de un método analítico es su capacidad de mantener su desempeño cuando se realizan desviaciones menores deliberadas en los parámetros normales de operación del método. La robustez se evalúa al variar algunos parámetros del método como la proporción de solventes orgánicos, pH, concentración de iones, temperatura, etc., y determinar el efecto que tienen sobre los resultados con respecto al método llevado a cabo en condiciones normales. Si las mediciones son susceptibles a las variaciones realizadas estos parámetros deben ser controlados adecuadamente y deberán de estar debidamente documentados. (Waters 2005, Cheng 2004)

3.7.8 Tolerancia

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, diferentes lotes de reactivo, diferentes lapsos de tiempo en el análisis, etc. La tolerancia normalmente se expresa como la falta de influencia de variables operacionales y ambientales en los resultados. (Szepesi, 1990)

3.7.9 Adecuabilidad del sistema

Este procedimiento es para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema son las adecuadas antes de llevar a cabo un análisis o durante su ejecución. La exactitud y precisión de los datos obtenidos dependen en parte del buen funcionamiento del equipo de CLAR. Algunos de los parámetros que deben obtenerse se explican mas adelante y estos son:

- a) Factor de capacidad (k'): Es una medida de donde esta localizado el pico de interés con respecto al volumen muerto. $k' = (t_1 - t_0)/t_0$. se recomienda que este valor sea mayor de 2.
- b) Precisión o repetibilidad en la inyección: La precisión de la inyección expresada como desviación estándar relativa indica la capacidad de mantener constante el desempeño del equipo durante el análisis de la muestra como lo es la bomba, la columna cromatográfica y las condiciones ambientales. La desviación estándar relativa para 5 inyecciones o más no debe ser mayor del 1%.
- c) Retención relativa (α): Es una medida de la posición relativa entre 2 picos. Este parámetro no es tan importante como la resolución. $\alpha = k'_1/k'_2$
- d) Resolución (R): Es la medida de la separación de 2 picos cromatográficos. Para una buena cuantificación es esencial tener bien definidos los picos.
- e) Factor de coleo (T): La exactitud para cuantificar disminuye cuando aumenta el coleo del pico debido a la dificultad que tiene el integrador para determinar donde termina el pico y por lo tanto su área. Es recomendable un valor menor o igual a 2.

(CDER, 1994)

3.8 Tipos de procedimientos analíticos a ser validados

- ◆ Pruebas de identificación: Se llevan a cabo para asegurar la identidad del analito en la muestra. Se lleva a cabo la mayoría de las veces por comparación de una propiedad (espectro, reactividad química, comportamiento cromatográfico).
- ◆ Prueba para límite de impurezas
- ◆ Prueba para la cuantificación de impurezas: Esta prueba y la anterior intentan detectar la pureza de una muestra. Se requieren de diferentes pruebas para cada una de ellas.
- ◆ Ensayo de contenido de principio activo: Este procedimiento esta encaminado a la cuantificación de un principio activo en una muestra.

Los parámetros de desempeño que debe cumplir un método analítico, dependiendo del uso que se le pretenda dar son: (ICH 1995, Guidance for industry 2000)

<i>Parámetro</i>	<i>Identificación</i>	<i>Prueba para impurezas</i>		<i>Ensayo</i>
		<i>Cuantitativa</i>	<i>Límite</i>	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión-Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	-	-	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+
Robustez	-	+	-	+

NOTA:

- Este parámetro no se evalúa normalmente
- + Este parámetro se evalúa normalmente

3.9 Generalidades sobre cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

3.9.1 Definición de cromatografía

La cromatografía es una familia de técnicas analíticas para la separación de mezclas en base a la diferencia en las velocidades de migración de los compuestos a través de una fase estacionaria cuando son acarreados por una fase móvil. La mezcla puede ser arrastrada por un líquido o por un gas y todos los componentes son separados como resultado de su distribución diferencial entre la fase móvil y la fase estacionaria que puede ser sólida o líquida.

En general la cromatografía es un método de separación que explota la partición, adsorción, intercambio iónico o exclusión de los componentes de una mezcla entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes pueden interactuar con estas fases en base a su solubilidad relativa, adsorción, carga o tamaño de partícula respectivamente. (Szepesi, 1990. Cohen, 1998)

Tswett publicó la primera descripción de un sistema cromatográfico en 1906. Este autor utilizó este método para separar pigmentos coloreados de las plantas. Puso los extractos de la planta en la punta de una columna de vidrio llena de carbonato de calcio y después vertió un disolvente orgánico; los diferentes pigmentos se separaron en función de su afinidad relativa por el carbonato de calcio o el disolvente orgánico. Esta experiencia muestra el principio mismo de la cromatografía que comprende dos fases:

- ✦ Una fase estacionaria fija, ya sea sólida o líquida; en el último caso se fija sobre un soporte sólido inerte. Esta fase puede estar dentro de una columna o recubrir una placa.

-
- ✦ Una fase móvil que se desplaza hacia el interior de esta columna o de una manera más general, hacia el interior de la matriz que forma la fase estacionaria. La fase móvil es siempre fluida: gas o líquido. Conforme se desplaza la fase móvil, las moléculas son arrastradas; la velocidad de migración es función de la diferencia de afinidad entre las fases estacionaria y móvil. La fase móvil migra por gravedad, capilaridad y por presión (bomba en la CLAR, gas a presión en la cromatografía gaseosa) ^(Cohen, 1998)

3.9.2 Formas de separación en cromatografía Líquida

- *Cromatografía de partición:* En la cromatografía de partición ambas fases son líquidos por lo que también se le denomina cromatografía líquido-líquido (CLL). El proceso responsable de la retención (es decir, de las diferentes velocidades de desplazamiento de las zonas) es una distribución líquido-líquido. En el caso que la CLL se efectúe normalmente, la fase estacionaria (fase interna) es la más polar de los dos líquidos. Esta fase se adsorbe en una película muy delgada, a la superficie de un sólido finamente dividido (el soporte). En teoría el único papel del soporte de la CLL es contener a la fase estacionaria. Muy a menudo la fase estacionaria es agua o una solución acuosa y la fase móvil es un solvente orgánico. Cuando la fase estacionaria es un solvente no polar y la fase móvil es polar, esta técnica se conoce como CL en fase inversa. La selectividad se controla generalmente por elección de los solventes, pues estos rigen el coeficiente de partición. ^(Connors, 1981)
- *Cromatografía de adsorción:* En cromatografía de adsorción (cromatografía líquido-sólido), el proceso de distribución es un equilibrio entre la fase móvil y la superficie de la fase estacionaria, donde pueden estar enlazado (no covalentemente) por interacciones entre grupos funcionales sobre la molécula y sobre la superficie.

En la siguiente tabla se muestran algunos de los sólidos que se utilizan ampliamente en esta técnica.

Tierra de Fuller	Carbonato cálcico
Carbón activado	Carbonato potásico
Alúmina activa	Talco
Ácido silícico activo	Almidón
Óxido magnésico	

Figura 3. Adsorbentes clasificados en orden decreciente de fuerza^(Cohen, 1998)

Se aplica más específicamente a la separación de soluciones con grupos funcionales diferentes en número y naturaleza o de isómeros de posición. El adsorbente más usual es el óxido de aluminio (alúmina Al_2O_3) y la sílice. La intensidad del fenómeno de adsorción puede ser muy diferente de un pedazo de sílice a otro debido al estado de su superficie que resulta de los diversos tratamientos de producción: lavado ácido o básico, calentamiento, etc. La superficie de los poros de una partícula de sílice contiene 3 tipos de grupos: grupos silanoles libres (-Si-OH), grupos silanoles contiguos que se unen por puentes de hidrógeno, grupos siloxanos Si-O-Si provenientes de la deshidratación de los silanoles vecinos durante el calentamiento. ^(Cohen, 1998. Connors, 1981)

- *Cromatografía de intercambio iónico:* Cuando el relleno de una columna es una resina de intercambio iónico, se denomina cromatografía iónica y es muy utilizada en química inorgánica, aunque también se utiliza para el análisis de aminoácidos. En cromatografía iónica el disolvente suele ser agua, normalmente se le suele añadir un eluyente según lo que se desee analizar cationes. En el caso de cationes el más utilizado es el HCL (~0.01 M). Para los aniones el más utilizado es el $NaHCO_3$ (~0.002 M). El intercambio iónico es un proceso de intercambio de iones entre una disolución y un sólido insoluble en dicha disolución. Los diferentes iones se separan según su afinidad por la resina empleada como relleno de la columna. ^(Llamas, 2003)

-
- *Cromatografía por exclusión de tamaño molecular*: Esta técnica también se le conoce como filtración o permeación sobre gel, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel. Se rellena la columna con un material que tenga poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. (Connors, 1981. CDER, 1994)

3.9.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) se ha desarrollado en los últimos años como una de las principales técnicas analíticas dentro de la industria farmacéutica. Las razones por las cuales es una herramienta útil dentro de esta industria son:

- La capacidad de esta técnica para analizar prácticamente la mayoría de las muestras farmacéuticas.
- El mejoramiento en la tecnología de las columnas cromatográficas.

Además de los puntos anteriores esta técnica es rápida, exacta, precisa y confiable para los análisis que se realizan dentro de la industria farmacéutica. Como otras técnicas instrumentales, la CLAR primero fue introducida en laboratorios de investigación, pero su campo de aplicación rápidamente se extendió y se incluyó en análisis de rutina y en la actualidad es un procedimiento analítico estándar en el control de calidad. (Szepesi, 1990)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica analítica para la separación y determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos en cualquier muestra, especialmente biológica, farmacéutica, industrial, ambiental, etc. (Waters, 2005. Szepesi, 1990)

3.9.4 Aspectos teóricos de CLAR

Un entendimiento de ciertos aspectos en la separación puede ser necesario para la optimización y caracterización de las separaciones cromatográficas. El análisis cromatográfico involucra la introducción, separación y detección de los analitos en las mezclas. La separación de los componentes se basa en sus propiedades fisicoquímicas e interacciones químicas con la fase móvil y la estacionaria. La diferencia en estas interacciones dará como resultado la separación de los componentes en la columna cromatográfica por lo que se pueden expresar diferentes parámetros que se mencionarán a continuación:

a) Eficiencia de la columna

Se puede expresar como el número de platos teóricos (N) o la altura equivalente al plato teórico (H)

$$N = 16(t_r/W)^2 = 5.5(t_r/W_{1/2})^2$$

Donde t_r es el tiempo de retención del compuesto y W es el ancho del pico. N es directamente proporcional al tiempo que permanece el compuesto en la columna y es inversamente proporcional al ancho de pico del compuesto. El plato teórico se define como la zona de la fase estacionaria donde la concentración promedio de los solutos es igual a la concentración que se obtendría si existiera un equilibrio real. De una parte de la columna a otra existen diferentes concentraciones por lo que se habla de concentraciones promedio. La eficiencia aumenta al aumentar el valor de N . El número de platos teóricos depende de la longitud de la columna, por lo que a mayor longitud es mayor el número de platos teóricos. ^(Szepesi, 1990). El número de platos teóricos depende del tiempo de elusión pero en general debe ser mayor a 2000. ^(CEDER, 1994).

Los fenómenos que contribuyen básicamente a la pérdida de la eficiencia en la separación cromatográfica son:

- ☞ El efecto de trayectoria múltiple, cuando las moléculas del soluto toman diferentes rutas durante su movimiento. El uso de partículas pequeñas con una estrecha distribución y una técnica de empaquetado eficiente puede resultar en un empaque con alto grado de uniformidad, por lo que este efecto puede reducirse.
- ☞ La difusión y la resistencia a la transferencia de masa de las moléculas de una fase a otra y la desviación del equilibrio debido a esta transferencia. Este efecto depende en mayor medida de la velocidad de flujo, se puede reducir al disminuir la velocidad de flujo y usando una fase móvil de baja viscosidad y tamaño molecular pequeño.

b) Selectividad de la columna

El factor de selectividad α de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A:

$$\alpha = (t_{r2} - t_0) / (t_{r1} - t_0) = k_2 / k_1$$

donde K_2 es la constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B, y K_1 es la constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. De acuerdo con esta definición, α siempre es mayor que la unidad. El factor de separación de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de los componentes, la fase móvil, la columna, muestra y el modo en que interaccionan entre sí. (Douglas, 2001. Szepesi, 1990)

c) Factor de capacidad (k')

El factor de capacidad de un compuesto esta en función de su interacción con la fase estacionaria. También conocido como factor de retención, es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para descubrir las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Para un compuesto A, el factor de capacidad se calcula con la siguiente fórmula:

$$k'_A = (t_r - t_M) / t_M$$

En la que k'_A es el factor de capacidad, t_r el tiempo de retención del compuesto y t_M es el tiempo muerto. Cuando el factor de retención para una especie es mucho peor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Cuando el factor de retención es del orden de 20 a 30 o tal vez mayor, los tiempos de elución son excesivamente largos. Idealmente las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de retención para las especies de una mezcla oscilan entre 2 y 10. (Douglas, 2001)

d) Asimetría

Es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación e incluso a oscurecer picos adyacentes.

$$As_{10\%} = b/a$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura. En general no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomado al 10% de altura, o 2.0 tomado al 5% de altura. (Baltasar, 1994)

e) Eficiencia de la separación cromatográfica. Resolución

La resolución de la columna (R_s) constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar 2 analitos. En la siguiente figura se ilustra lo que significa este término.

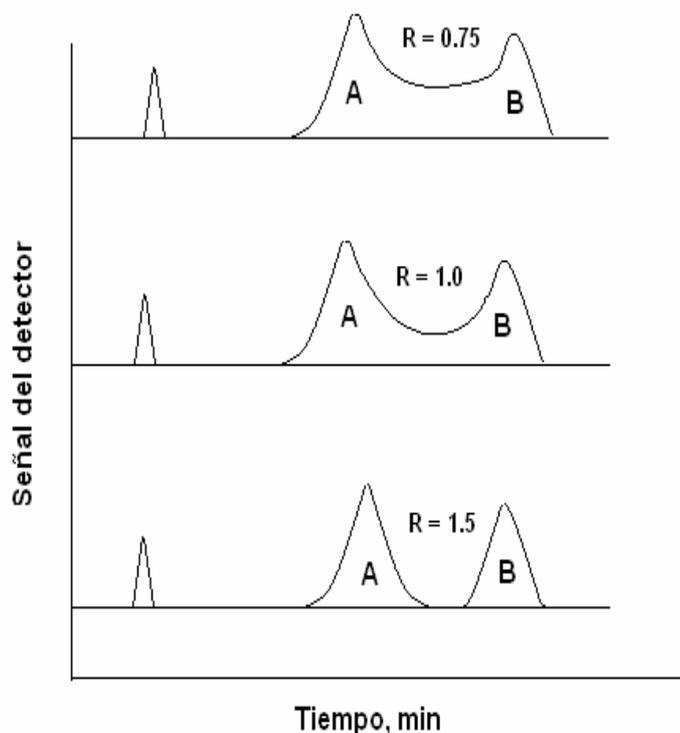


Figura 4. Separación de picos cromatográficos según de la resolución de la columna ^(Douglas, 2005)

La resolución de una columna se define como:

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (W_1 + W_2)$$

Donde R_s es la resolución, t_{r1} y t_{r2} el tiempo de retención del compuesto 1 y 2 y W_1 y W_2 el ancho del pico de compuesto 1 y 2. En la figura 4 resulta evidente que una resolución de 1.5 permite una separación completa de los dos componentes, mientras que a una resolución de 0.75 no es así. Para una fase estacionaria dada la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos teóricos. Una consecuencia negativa del aumento del número de platos teóricos es el incremento del tiempo requerido para la separación. ^(Douglas, 2005)

3.9.5 Descripción del proceso cromatográfico

El la figura se muestra esquemáticamente el principio de un cromatógrafo. ^(Waters)

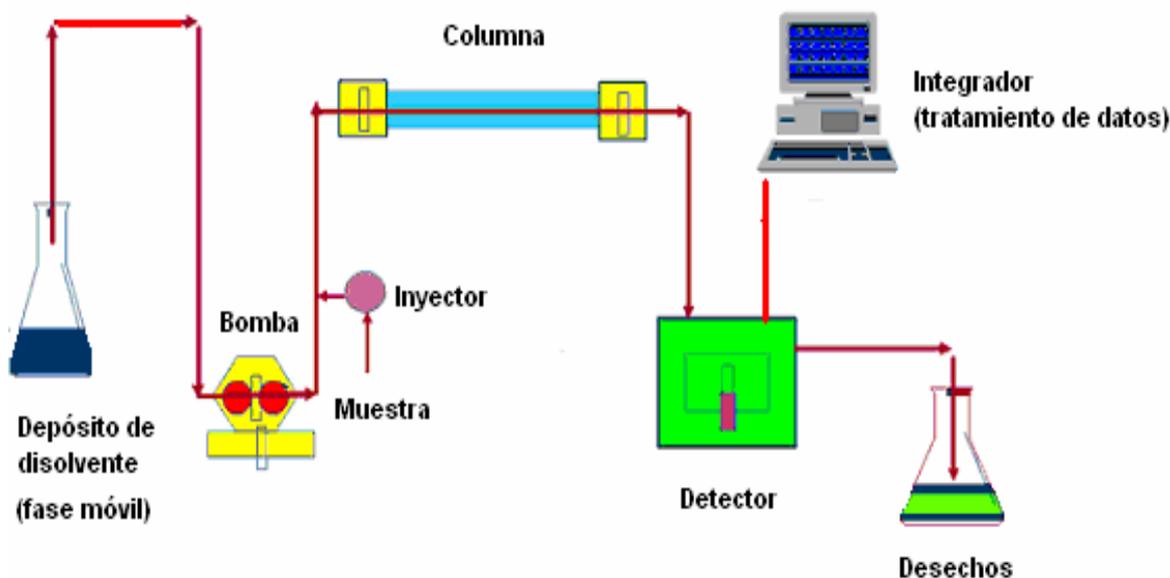


Figura 5. Componentes principales de un equipo de CLAR ^(Waters, 2005)

Las diferentes partes del equipo en contacto con la fase móvil se fabrican con acero inoxidable y son objeto de un recubrimiento especial que da buena resistencia a la corrosión, lo que amplía su campo de aplicación. Los principales elementos del equipo son: ^(Cohen, 1998)

Depósito del disolvente: Debe ser hermético para evitar cualquier modificación de la composición de la fase móvil por evaporación o disolución (vapor de agua). Deben eliminarse previamente los gases de esta (sonicación, filtración, borboteo de helio) lo que impide la liberación del gas al nivel del detector cuando se regresa a la presión atmosférica. ^(Cohen, 1998)

Bombas: Las bombas que mas se emplean son eléctricas con uno o varios pistones, diafragma o de tipo jeringa. Todas pueden surtir un gasto constante, en un intervalo que va de algunas decenas de $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta $9.9 \text{ ml}/\text{min}$. (Cohen, 1998)

Inyector: Actualmente la inyección mediante válvulas de muestreo es la más usada. La muestra se introduce en una argolla de volumen variable (5 a $200 \mu\text{L}$), luego la arrastra la fase móvil después de la rotación de la válvula. Este tipo de inyector es adecuado para las inyecciones de alta presión, para los análisis repetitivos y para su automatización, ya que la argolla define un volumen de inyección constante después del llenado total. Para la CLAR se encuentran en el comercio argollas internas de volumen inferior al microlitro. (Cohen, 1998)

Columna: Constituye la parte esencial del cromatógrafo. Viene en forma de un tubo recto de acero inoxidable (cromo-niquel-molibdeno-acero) o teflón. Como cierre de las columnas se utilizan placas filtrantes de acero, cuya anchura de poro debe ser menor que el tamaño de partícula del relleno de la columna. Para que la separación sea buena, la trayectoria de difusión deberá ser corta. Hoy en día suele utilizarse micropartículas (frecuentemente $5 \mu\text{m}$) (Reinhard, 1992). Por razones científicas y comerciales, las propiedades geométricas y morfológicas de la columna son muy variadas: longitud, diámetros diferentes, presentación en formas de cartuchos adaptables a un soporte o en un estuche que ofrece una compresión radial. (Cohen, 1998. Reinhard, 1992)

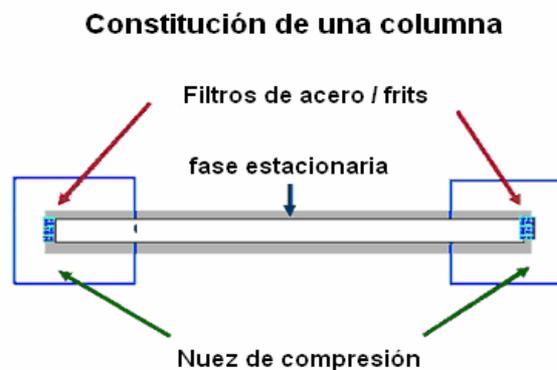


Figura 6. Representación de una columna cromatográfica (Waters, 2005)

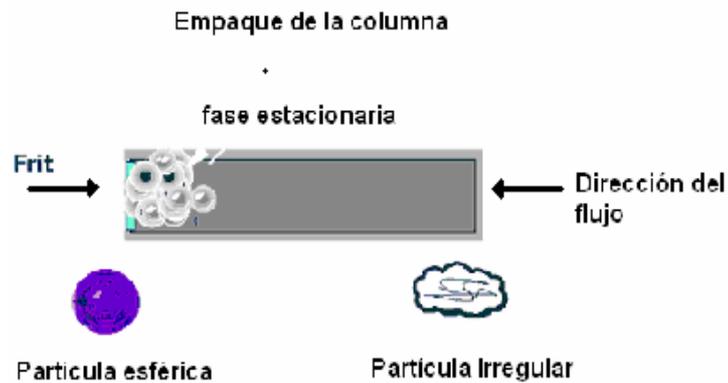


Figura 7. Forma de las partículas del empaque de una columna cromatográfica ^(Waters, 2005)

Detector: Es el instrumento en el sistema cromatográfico el cual detecta la presencia de los compuestos que pasan a través de él y proporciona una señal electrónica a una computadora para procesar los datos; la respuesta analítica son picos a los cuales se le denomina cromatograma. En si el detector permite seguir en forma continua la separación y medir la concentración de las soluciones. La CLAR actualmente no tiene un detector universal práctico. La elección de un detector depende de las características físicas de las especies por separar y de las condiciones de operación.

Las principales características de un detector son:

- Sensibilidad: (relación entre la respuesta del detector y la cantidad de la muestra); suele variar con la naturaleza de la solución y de la fase eluyente.
- Detectabilidad: cantidad mínima detectable que se expresa como múltiplo del ruido de fondo (relación señal sobre ruido > 2)
- Linealidad que expresa el campo de concentración en la cual la respuesta del detector varía de manera lineal con la concentración.
- Volumen muerto de la celda del detector (de 1 a 10 μL)

Los tipos de detectores que más son usados son:

- Espectrofotómetro UV-visible: Son detectores específicos cuya respuesta depende esencialmente de la capacidad de absorción de la solución. En los últimos años la detección puede ser simultánea con varias longitudes de onda que permite aumentar la sensibilidad para compuestos con diferentes coeficientes de extinción molecular.
- Fluorescencia: Los detectores más recientes permiten la medición de cantidades del orden de picogramos. Lo mismo que en el caso de la absorciometría UV-visible, el campo de aplicación de este detector se amplió gracias a las reacciones químicas de derivación pre o poscolumna mediante marcadores fluorescentes.
- Detector electroquímico: Este tipo de detección solo se aplica a sustancias oxidables o reducibles. Con fases móviles suficientemente conductoras, las mediciones se llevan a cabo con potencial constante de dos maneras: por amperimetría y por coulombimetría.
- Refractómetro diferencial: Permite la medición continua de la diferencia de índice de refracción entre la fase móvil que esta en una celda de referencia y el efluente de la columna. Su principal cualidad es de carácter universal. Este detector no es muy sensible (10^{-7} M), su respuesta depende del índice de refracción de las soluciones. Es útil para el análisis de azúcares y productos no absorbentes en UV.
- Espectrómetro de masas: El sistema corresponde a una ionización química común con iones reactivos que se producen por un mecanismo diferente. En si las moléculas que ya existen en estado de iones en la fase móvil son detectables y las moléculas neutras son ionizadas. La mayor parte de los iones positivos y negativos son introducidos al espectrómetro de masas y detectados. (Cohen, 1998)

Para la elección del detector se pueden considerar los siguientes puntos:

	Refracción	UV/VIS	Fluorescencia	Masas
Respuesta	Universal	Selectivo	Selectivo	Selectivo
Sensibilidad	4 µg	5 ng	3 pg	1 pg
Sensible al flujo	Si	No	No	Si
Sensible a temperatura	Si	No	No	No

Figura 8. Selección del tipo de detector dependiendo de la muestra a analizar (Waters, 2005)

3.10 El pico cromatográfico

En general el detector esta unido a un integrador que traza un pico que casi siempre tiene la forma de una campana de Gauss y que representa a la sustancia detectada. El conjunto de las moléculas que se separan dan una sucesión de picos llamada *Cromatograma*; este se inicia a menudo con el frente del disolvente que corresponde a la elución de las sustancias que no se retienen en la fase estacionaria (disolvente de extracción). En un sistema determinado, el tiempo necesario para que una sustancia eluya es una característica que se denomina *tiempo de retención*. La forma del pico es función de:

a) *el tiempo de migración*: entre mas rápido eluye una molécula, mas fino es el pico correspondiente; a la inversas, las sustancias que se retienen en la fase estacionaria se representan por un pico mas ancho. (Fenómeno de difusión)

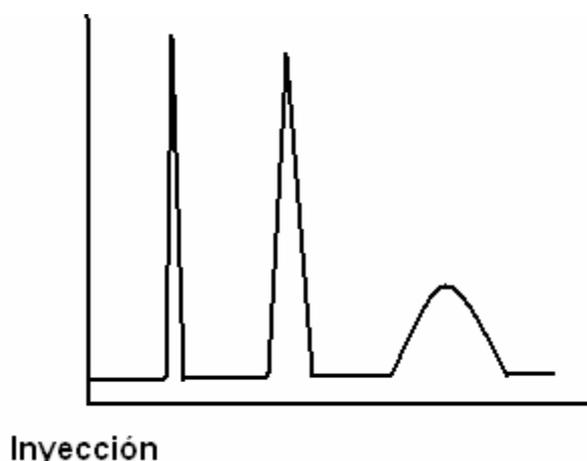


Figura 9. Representación del fenómeno de retención en un cromatograma ^(Cohen, 1998)

Este concepto es importante, un pico ancho al inicio del cromatograma proviene generalmente de la inyección anterior. Así, es importante esperar el tiempo suficiente para que todos los compuestos del extracto que se inyectan eluyan y no interfieran en las inyecciones siguientes.

b) *Del volumen del extracto que se inyecta:* Entre menor sea, los picos serán simétricos y finos.

c) *De la compatibilidad del sistema:* Si las fases estacionarias y móviles son muy afines a las sustancias que se separan, se observan estelas.



Figura 10. Representación de una estela ^(Cohen, 1998)

d) *Del mantenimiento de las columnas:* una cabeza de la columna en mal estado puede inducir estelas o picos desdoblados.

e) *De la calidad del extracto que se inyecta:* Debe ser lo más puro posible según el interés y la necesidad, debe estar en solución en un disolvente que sea compatible con el sistema y el volumen que se inyecta debe ser compatible con la capacidad de retención de la columna. ^(Cohen, 1998)

3.11 Tipos de cuantificación

- ◆ *Cuantificación por estándar externo:* Esta técnica de cuantificación es la más utilizada. Involucra la preparación de una solución estándar cuya concentración se aproxime a la del analito de interés. Se obtienen los cromatogramas de esta solución para obtener las alturas o las áreas en función de la concentración del estándar y se comparan con el de las muestras ^(Cheng, 2004).

Al utilizar este método, la fuente de error más importante es la incertidumbre en el volumen de la muestra; a veces la velocidad de inyección de la muestra es un factor a considerar. A menudo, las muestras son pequeñas ($\sim 1 \mu\text{L}$) y la incertidumbre asociada con la inyección de un volumen reproducible de este tamaño puede significar un cierto porcentaje relativo. (Douglas, 2001)

- ◆ *Cuantificación por estándar interno:* Esta cuantificación proporciona una precisión mayor porque evita la incertidumbre asociada a la inyección de la muestra. En esta técnica de cuantificación se introduce una cantidad conocida de estándar interno en cada muestra y en cada solución estándar. Se obtienen las áreas o alturas de los cromatogramas y la relación entre las áreas o alturas de la muestra y del estándar interno sirven como parámetro analítico. Debido a la presencia del estándar interno, es muy importante asegurar que su pico esté bien separado del pico de la muestra. Para dar una cuantificación confiable la resolución entre los picos debe ser mayor de 1.5. (Cheng, 2004. Douglas, 2001)

CAPÍTULO 2

PARTÉ EXPERIMENTAL

4.- REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

- Estándar de referencia secundario de palmitato de Vitamina A, pureza 91.26 %
- Estándar primario de Vitamina D₃, pureza 100%
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Isopropanol grado reactivo
- Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard Mod. 1100 con detector UV
- Inyector automático
- Columna cromatográfica ZORBAX SB-C8, 5 µm, 4.6 x 150 mm
- Balanza analítica marca Sartorius, modelo LA230S, no. de serie 90706204
- Matraces volumétricos de 100 y 50 ml, Pyrex, bajo actinio
- Pipetas pasteur
- Viales para cromatografía de 2 mL ámbar
- Pipetas volumétrica de 1,2,3,4,5 y 10 mL
- Pipeta graduada de 10 ml
- Tubos para centrífuga
- Una centrifuga
- Sonicador

Muestra: Solución oral de Vitaminas A, D₃ y C en ampolletas de 3 ml. Cada ampolleta contiene:

- 7600 UI de Vitamina A
- 1200 UI de Vitamina D₃
- 600 mg de Vit C

5.- DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Preparación de la solución estándar de Vitamina A y D₃

- 1) En una balanza analítica pesar dentro de un matraz volumétrico de bajo actinio¹ de 100 ml la cantidad de 25 mg de estándar primario de Vitamina D₃, se adicionan 50 ml de isopropanol y agitar hasta que se disuelva el estándar, llevar al volumen de aforo con isopropanol y mezclar. Esta es la solución 1. (Cada mg equivale a 40,000 UI de Vitamina D₃)

- 2) En un matraz de bajo actinio de 100 ml se pesa la cantidad del estándar secundario de palmitato de Vitamina A equivalente a 260,000 UI de Vitamina A, se adicionan 50 ml de isopropanol y se agita manualmente por 10 min. para disolver el estándar, enseguida adicionar con una pipeta volumétrica 4 ml de la solución 1, llevar el volumen de aforo con isopropanol y mezclar. Esta es la solución 2.

- 3) Tomar 5 ml de la solución 2 y depositarlos en un matraz de bajo actinio de 50 ml, llevar al volumen de aforo con una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo-metanol y mezclar.

- 4) Filtrar con un acrodisco y depositar en un vial ámbar de 2 ml para cromatografía de líquidos e inyectar 20 µL usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-metanol-agua (48:48:4) con una velocidad de flujo de 2 ml/min haciendo la detección a una longitud de onda de 280 nm.

Preparación de la muestra

- 1) Tomar una alícuota de 10 ml de la solución oral de Vitaminas A y D3 y depositarla en un matraz volumétrico de bajo actinio¹ de 100 ml, enseguida adicionar 20 ml de isopropanol y sonicar la muestra por 30 minutos.
- 2) Llevar al volumen de aforo con una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo-metanol. Centrifugar una porción de esta solución a 5000 rpm durante 5 min.
- 3) Con un acrodisco filtrar el sobrenadante y depositarlo en un vial para cromatografía, inyectar al cromatógrafo 20 μ L utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-metanol-agua (96:96:8) con una velocidad de flujo de 2 ml/min haciendo la detección a una longitud de onda de 280 nm.
- 4) Se determina el área bajo la curva del pico de interés y se compara contra el área del estándar de referencia.

1

¹ Se usa material de bajo actinio para evitar la degradación de las vitaminas por acción de la luz

Diagrama de flujo

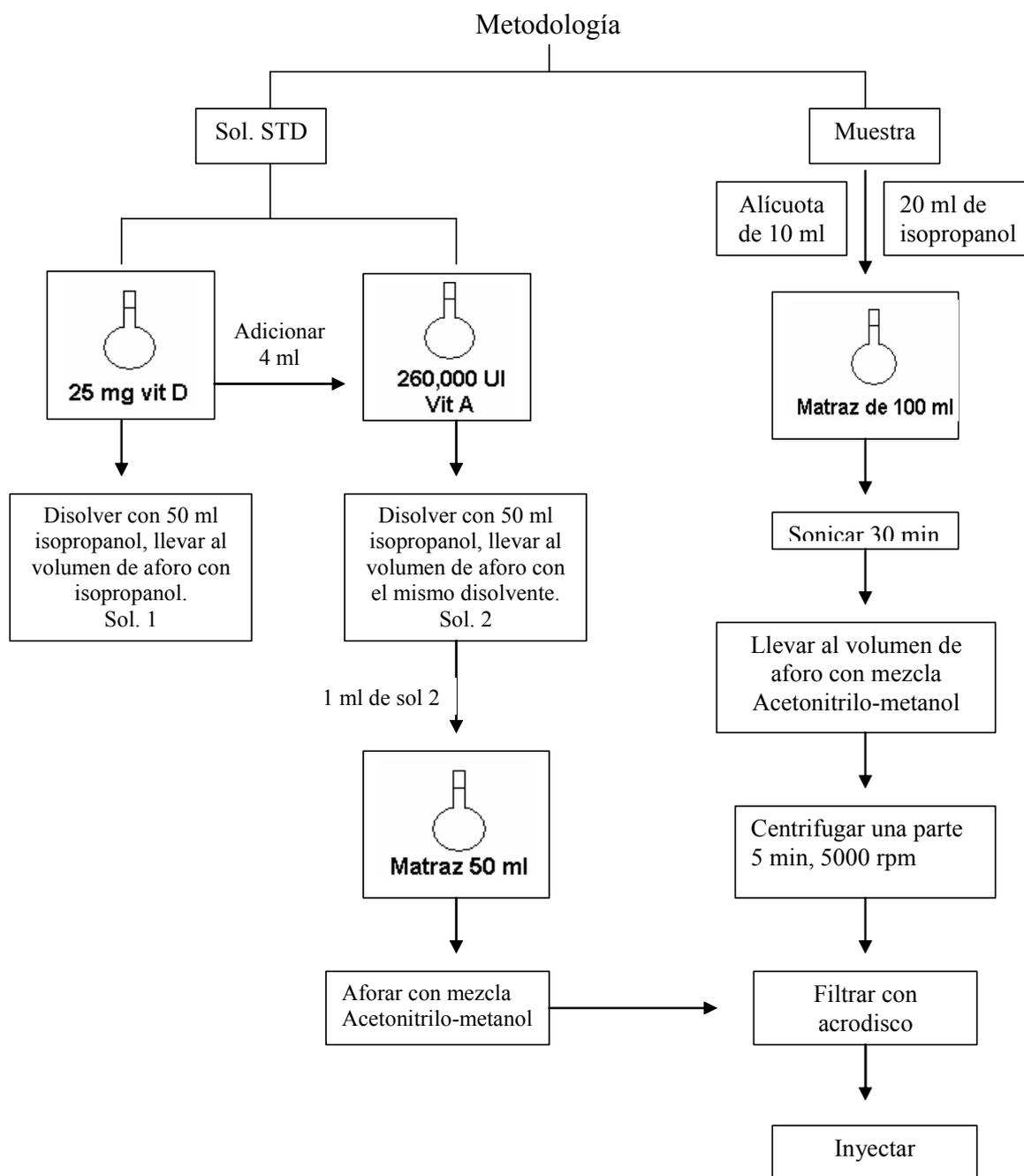


Figura 11. Esquema de actividades de la metodología

6.- METODOLOGIA PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para validar este método analítico se tomó en cuenta el procedimiento y los criterios de aceptación para cada parámetro que se mencionan en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, edición 2002.

6.1 Precisión del sistema:

Procedimiento:

A partir de una misma solución patrón de concentración conocida de vitamina A y D₃ preparar por sextuplicado una solución con la misma concentración, representando así la concentración de las vitaminas a cuantificar. Filtrar y depositar en un vial ámbar de 2 ml para cromatografía de líquidos e inyectar por triplicado 20 µL de cada muestra usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-metanol-agua (96:96:8) con una velocidad de flujo de 2 ml/min y haciendo la detección a una longitud de onda de 280 nm. Registrar el área bajo la curva del pico de interés.

Información de reporte y cálculos:

Reportar el área del pico de palmitato de vitamina A y de Vitamina D₃ de cada solución. Determinar el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación:

El Coeficiente de Variación de las áreas de palmitato de vitamina A y de Vitamina D₃ debe ser $\leq 1.5 \%$

6.2 Adecuabilidad del sistema

Procedimiento:

Preparar a partir de una solución estándar de concentración conocida una solución que represente la concentración de vitaminas A (260 UI/ml) y D₃ (40 UI/ml) que se va a cuantificar. Filtrar y depositar en un vial ámbar de para cromatografía de líquidos e inyectar al cromatógrafo por sextuplicado 20 μ L usando bajo las condiciones ya descritas. Registrar el área bajo la curva del pico de interés.

Información de reporte y cálculos:

Reportar el área del pico del palmitato de vitamina A y de Vitamina D₃ y determinar el coeficiente de variación de la respuesta analítica de las 6 inyecciones al igual que los siguientes parámetros: Factor de Capacidad (K'), tiempo de retención del palmitato de Vitamina A y de Vitamina D₃, el factor de coileo de los picos (T), el número de platos teóricos para ambas vitaminas (N), la resolución entre los picos(R)

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación entre las áreas de los picos de las 2 vitaminas debe ser ≤ 2 %.

Para cada inyección:

K' mayor a 2

R mayor a 2

T menor de 2

6.3 Linealidad del sistema:

Procedimiento:

Este parámetro se determina mediante la elaboración de una curva de calibración a partir de una misma solución patrón de concentración conocida de vitaminas A y D₃ usando cuando menos 5 niveles de concentración. El intervalo de concentraciones incluye el 60, 80, 100, 120 y 140 % con respecto a la concentración que representa el 100 % de la muestra procesada para su medición. Filtrar una porción de cada una de las soluciones y transferirlas a los viales de 2 ml para cromatografía, inyectar 20 µl de cada vial al cromatógrafo utilizando las condiciones ya descritas. Obtener los cromatogramas de cada inyección y registrar el área bajo la curva del pico de palmitato de vitamina A y de vitamina D₃.

Información de reporte y cálculos.

Trazar la gráfica concentración de vitamina A vs área del pico de vitamina A y la gráfica de concentración de vitamina D₃ vs área del pico de vitamina D₃. Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente en ambos gráficos.

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

El intervalo de confianza no debe de incluir el 0

6.4 Especificidad del método:

Procedimiento:

Para ello se debe de preparar un placebo analítico, el cual contiene todos los componentes de la formulación excepto las Vitaminas A y D₃ y con el pH ajustado a 4.5. A este placebo analítico se le realiza por sextuplicado el procedimiento descrito para la muestra en la metodología.

Información de reporte y cálculos:

Reportar la existencia de picos que aparezcan al tiempo de retención de vitamina D₃ y al tiempo de retención del palmitato de Vitamina A.

Criterios de aceptación:

No debe existir respuesta analítica a la longitud de onda de trabajo en el tiempo de retención del palmitato de vitamina A y de la vitamina D₃.

6.5 Exactitud y repetibilidad del método

Procedimiento:

Para ello se prepara por sextuplicado un placebo cargado el cual tiene una concentración conocida de vitamina A y D₃. Cada muestra se analiza conforme a la metodología descrita y también se prepara una solución estándar.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la cantidad recuperada de vitamina A y D₃ y considerando la cantidad adicionada, calcular el porcentaje de recobro de las 2 vitaminas.

Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro de cada vitamina.

Criterios de aceptación:

El intervalo de confianza debe incluir el 100 % o el promedio aritmético del porcentaje de recobro este dentro del intervalo de 98 al 102 %.

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor del 2 %.

6.6 Linealidad del método

Procedimiento:

Se deben preparar placebos analíticos a partir de una solución patrón de vitaminas A y D₃ usando 5 niveles de concentración. El intervalo de concentración incluye el 60, 80, 100, 120 y 140 % con respecto a la concentración que representa el 100 % de la muestra procesada para su medición. Cada muestra se analiza conforme a la metodología descrita y también se prepara una solución estándar.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la cantidad recuperada de vitamina A y D₃ y considerando la cantidad adicionada, calcular el porcentaje de recobro de las 2 vitaminas.

Graficar la cantidad adicionada vs cantidad recuperada de vitamina D₃ y Vitamina A por separado y calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza para la pendiente, el intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión en cada gráfico.

Del porcentaje de recobro para las 2 vitaminas calcular el promedio aritmético, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

Para la relación cantidad adicionada contra cantidad recuperada $r^2 \geq 0.98$, el intervalo de confianza de la pendiente debe de incluir la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen debe de incluir el 0 y el coeficiente de variación de regresión no debe ser mayor del 2 %.

Para el porcentaje de recobro, el intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98-102 % y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no sea mayor del 2 %.

6.7 Precisión intermedia (Reproducibilidad entre día y analista)

Procedimiento:

La muestra del producto debe de analizarse por triplicado con dos analistas diferentes en 2 días diferentes.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del contenido de vitaminas de la muestra.

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación no debe de ser mayor del 2 % para cada vitamina.

6.8 Robustez del método.

Procedimiento:

Para determinar si el pH del producto puede afectar el desempeño del método se prepara un lote del producto con un pH 3.0, y este mismo lote se ajusta a 4.5 y 6.0. Por cada pH analizar la muestra por triplicado.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la media aritmética del contenido de vitaminas para cada valor de pH. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética del contenido a pH de 3 y 6 respecto al pH de 4.5.

Criterios de aceptación:

La diferencia absoluta no debe ser mayor del 2 % para cada vitamina.

6.9 Estabilidad de la muestra analítica

Procedimiento:

Para demostrar el tiempo al cual debe realizarse el análisis sin que la muestra pierda su integridad fisicoquímica y la concentración del analito se debe de analizar esta muestra por triplicado. Dejar las muestras en la charola del cromatógrafo y volver a inyectarlas a las 3, 6, 9 y 12 horas

Información de reporte y cálculos:

Calcular la media aritmética del contenido de vitaminas para cada tiempo de análisis. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada tiempo de análisis con respecto a la muestra del tiempo inicial.

Criterios de aceptación:

La diferencia absoluta no debe ser mayor del 2 % para cada vitamina.

6.10 Tolerancia del método.

Procedimiento:

Para determinar la reproducibilidad de los resultados analíticos entre 2 cromatógrafos se debe de analizar una misma muestra por triplicado en en cromatógrafo 1 y 2 del laboratorio de Control de Calidad.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la media aritmética del contenido de vitaminas obtenido en cada equipo, la desviación estándar y el coeficiente de variación del contenido de las vitaminas. El coeficiente de variación no debe ser mayor del 2 %.

Criterios de aceptación:

La diferencia absoluta no debe ser mayor del 2 % para cada vitamina.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA D₃

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Precisión del sistema	6 soluciones a la concentración que representa el 100 %	$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 1.05$	Conforme
Adecuabilidad del sistema	1 solución que representa el 100% inyectada 6 veces	$CV \leq 2 \%$ $K' > 2$ $R > 2$ $T < 2$	$CV = 1.34$ $K' > 2$ $R > 2$ $T < 2$	Conforme
Linealidad del sistema	5 soluciones a una concentración del 60, 80, 100, 120 y 140 % de Vitamina D ₃ respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.998$ Lim Sup: 0.5916 Lim Inf: 0.5672	Conforme
Especificidad	6 muestras de un placebo analítico	No debe existir respuesta analítica al tiempo de retención	No hay respuesta analítica	Conforme
Exactitud y repetibilidad	6 muestras de un placebo cargado	CV de % de recobro $< 2 \%$ y el IC para la media de % de recobro debe incluir el 100 % o estar dentro del intervalo 98-102 %	$CV = 1.26$ Lim sup = 101.035 Lim Inf = 99.774	Conforme
Linealidad del método	5 soluciones de un placebo cargado a una concentración de 60, 80, 100, 120 y 140% de vitamina D ₃ respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC para m: debe incluir el 1 IC para b: debe incluir el 0 CV de regresión $< 2 \%$ Para % recuperado: $CV < 2 \%$ IC debe incluir el 100% o estar dentro del intervalo de 98-102%	$r^2 = 0.9965$ IC de m = LS = 1.039 LI = 0.9962 IC de b = LS = 0.3030 LI = -1.5878 CV de regresión = 1.61% Para % de recobro : $CV = 1.63\%$ IC de media poblacional : LS = 100.7197 LI = 99.5019	Conforme
Reproducibilidad (Día, analista)	2 analistas diferentes analizando la misma muestra por triplicado en 2 días diferentes	CV global del % de recobro $< 2\%$	CV global = 0.12 %	Conforme
Robustez	3 muestra a pH 3, 4.5 y 6 y cada muestra analizada por triplicado	/d/ de la media de 5 de recobro de pH 3 y 6 con respecto a la media de pH 4.5 debe ser menor del 2%	pH 3 = 0.24 % pH 6 = 0.041 %	Conforme
Tolerancia	La misma muestra analizada por triplicado en 2 cromatógrafos diferentes	CV del % de recobro debe ser menor del 2 %	$CV = 0.87 \%$	Conforme
Estabilidad de la muestra analítica	Analizar una muestra por triplicado e inyectar la misma muestra a las 3, 6, 9 y 12 horas	/d/ de la media aritmética del % de recobro a 3, 6, 9 y 12 hrs con respecto a la media del tiempo inicial no debe ser mayor al 2 %.	/6hrs/ = 0.41 /12hrs/ = 1.98	Conforme

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Precisión del sistema	6 soluciones a la concentración que representa el 100 %	$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 0.18 \%$	Conforme
Adecuabilidad del sistema	1 solución que representa el 100% inyectada 6 veces	$CV \leq 2 \%$ $K' > 2$ $R > 2$ $T < 2$	$CV = 0.24 \%$ $K' > 2$ $R > 2$ $T < 2$	Conforme
Linealidad del sistema	5 soluciones a una concentración del 60, 80, 100, 120 y 140 % de Vitamina D ₃ respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.9998$ Lim Sup: 6.7718 Lim Inf: 6.7101	Conforme
Especificidad	6 muestras de un placebo analítico	No debe existir respuesta analítica al tiempo de retención	No hay respuesta analítica	Conforme
Exactitud y repetibilidad	6 muestras de un placebo cargado	CV de % de recobro $< 2 \%$ y el IC para la media de % de recobro debe incluir el 100 % o estar dentro del intervalo 98-102 %	$CV = 0.62 \%$ Prom % recobro = Lim sup = 99.5633 Lim Inf = 98.9598	Conforme
Linealidad del método	5 soluciones de un placebo cargado a una concentración de 60, 80, 100, 120 y 140% de vitamina D ₃ respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC para m: debe incluir el 1 IC para b: debe incluir el 0 CV de regresión $< 2 \%$ Para % recuperado: $CV < 2 \%$ IC debe incluir el 100% o estar dentro del intervalo de 98-102%	$r^2 = 0.9993$ IC de m : LS = 1.0236 LI = 0.9992 IC de b: LS = 0.0585 LI = -6.7929 CV de regresión = 0.92% Para % de recobro : CV = 0.90% IC de media poblacional : LS = 100.1050 LI = 99.4324	Conforme
Reproducibilidad (Día, analista)	2 analistas diferentes analizando la misma muestra por triplicado en 2 días diferentes	CV global del % de recobro $< 2\%$	CV global = 0.51 %	Conforme
Robustez	3 muestra a pH 3, 4.5 y 6 y cada muestra analizada por triplicado	/d/ de la media de 5 de recobro de pH 3 y 6 con respecto a la media de pH 4.5 debe ser menor del 2%	pH 3 = 0.91 % pH 6 = 0.75 %	Conforme
Tolerancia	La misma muestra analizada por triplicado en 2 cromatógrafos diferentes	CV del % de recobro debe ser menor del 2 %	CV = 1.12%	Conforme
Estabilidad de la muestra analítica	Analizar una muestra por triplicado e inyectar la misma muestra a las 3, 6, 9 y 12 horas	/d/ de la media aritmética del % de recobro a 3, 6, 9 y 12 hrs con respecto a la media del tiempo inicial no debe ser mayor al 2 %.	/6hrs/ = 0.13 /12hrs/ = 1.49	Conforme

7.1 Precisión del sistema

Los datos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Áreas de los picos para evaluar la precisión del sistema de vitaminas A y D₃

Solución estándar	Inyección	Área del pico de Vit D (mAU)	Área del pico de Vit A (mAU)
1	1	20.02	1921.99
	2	20.06	1921.33
	3	19.63	1924.56
2	1	20.28	1928.12
	2	20.23	1923.29
	3	20.12	1922.70
3	1	20.08	1927.26
	2	20.49	1926.15
	3	20.18	1923.88
4	1	20.02	1920.84
	2	19.91	1921.59
	3	20.31	1923.34
5	1	20.07	1930.04
	2	20.11	1930.75
	3	20.38	1932.50
6	1	20.43	1922.93
	2	20.11	1927.00
	3	20.45	1929.22
	promedio	20.16	1925.42
	S	0.21	3.58
	CV	1.05	0.19

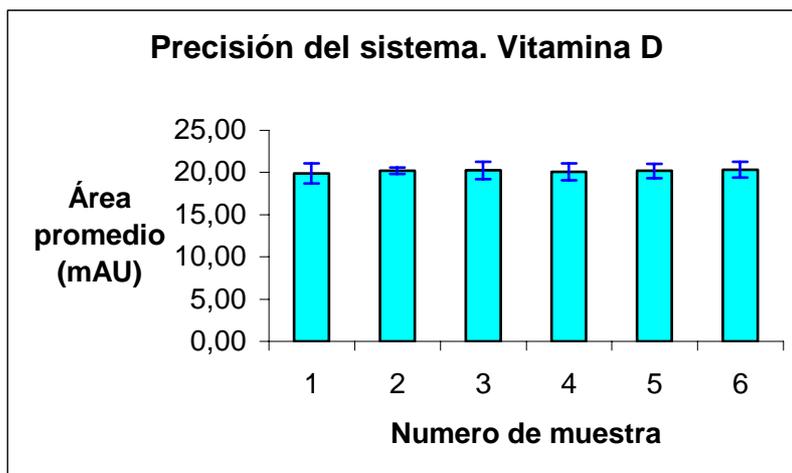


Gráfico 1. Representación gráfica para precisión del sistema de Vitamina D₃

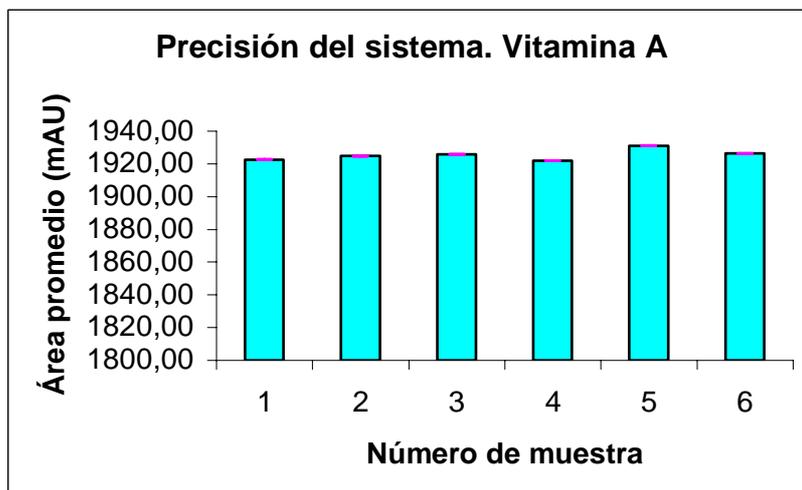


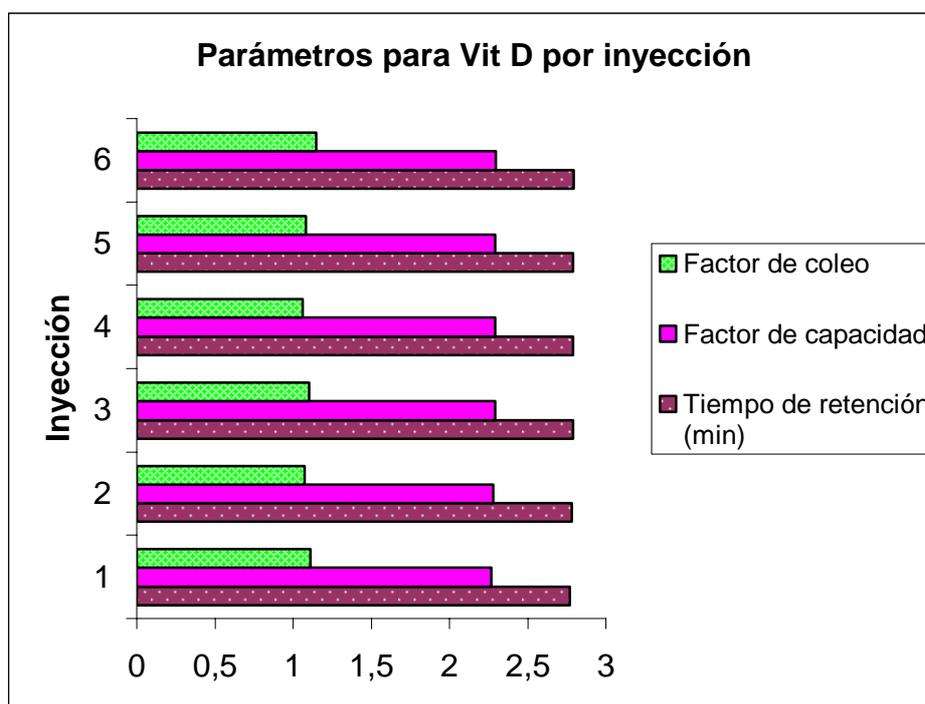
Gráfico 2. Representación gráfica para precisión del sistema de Vitamina A

Para este parámetro analítico la tabla 1 y las gráficas 1 y 2 muestran que las áreas promedio de vitaminas A y D₃ de las 6 muestras de la solución estándar son muy semejantes entre sí. El coeficiente de variación de la respuesta analítica para las 2 vitaminas, en este caso el área del pico, es menor de 1.5 % con lo que se cumple con el criterio de aceptación, y por lo tanto, no hay una variación significativa entre las áreas de vitamina A y vitamina D₃ obtenidas de cada muestra que teóricamente contienen la misma concentración por lo que el sistema para estos dos compuestos es preciso para su medición.

7.2 Adecuabilidad del sistema

Tabla 2. Resultados para evaluar Adecuabilidad del sistema para vitamina D₃

Inyección	Área de Vitamina D (mAU)	Tiempo de retención (min)	Platos teóricos (N)	Factor de capacidad (K')	Resolución (R)	Factor de coleo (T)
1	23.04	2.768	4673	2.266	8.566	1.112
2	23.25	2.781	4533	2.281	8.561	1.074
3	23.02	2.792	4658	2.294	8.705	1.102
4	22.67	2.79	4691	2.292	8.686	1.063
5	22.76	2.79	4742	2.292	8.659	1.083
6	23.51	2.795	4592	2.297	8.595	1.15
Promedio	23.04					
S	0.31					
CV	1.34					



Gráficos 3. Representación gráfica de los parámetros cromatográficos por cada inyección de vitamina D₃

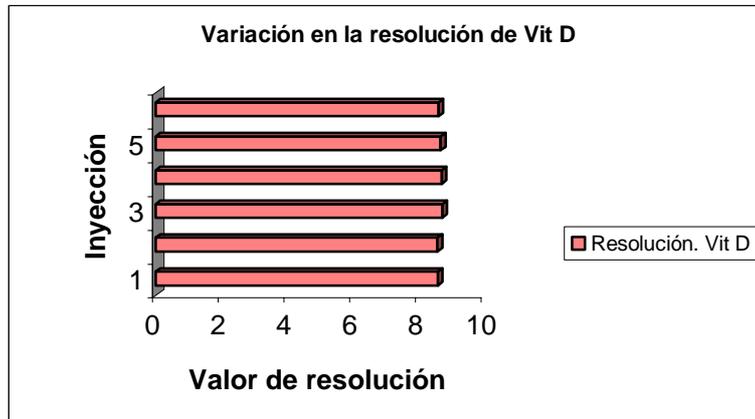


Gráfico 4. Variación en el parámetro de resolución para Vitamina D₃

Tabla 3. Datos para evaluar Adecuabilidad del sistema para vitamina A

Inyección	Área de vitamina A (mAU)	Tiempo de retención (min)	Platos teóricos (N)	Factor de capacidad (K')	Resolución (R)	Factor de coleo (T)
1	1888.65	7.567	4794	7.927	16.019	1.262
2	1894.98	7.606	4708	7.9474	15.858	1.074
3	1890.36	7.625	4805	7.997	16.016	1.264
4	1892.24	7.624	4774	7.995	15.999	1.063
5	1900.70	7.627	4743	7.999	15.99	1.083
6	1897.88	7.641	4763	8.015	15.946	1.265
Promedio	1894.14					
S	4.60					
CV	0.24					

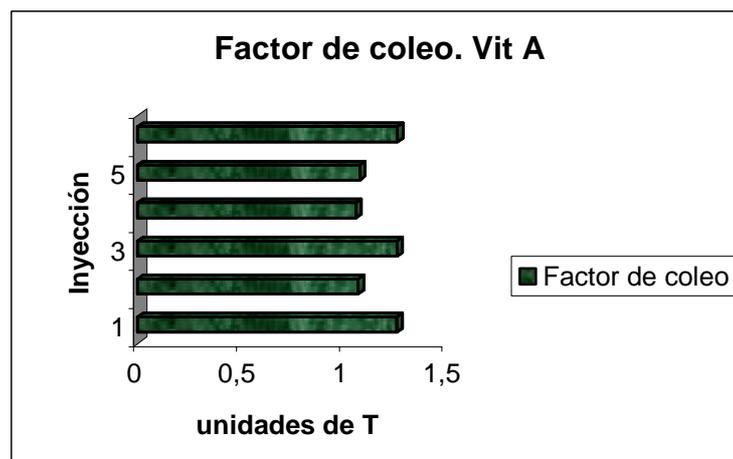


Gráfico 5. Factor de coleo para vitamina A.

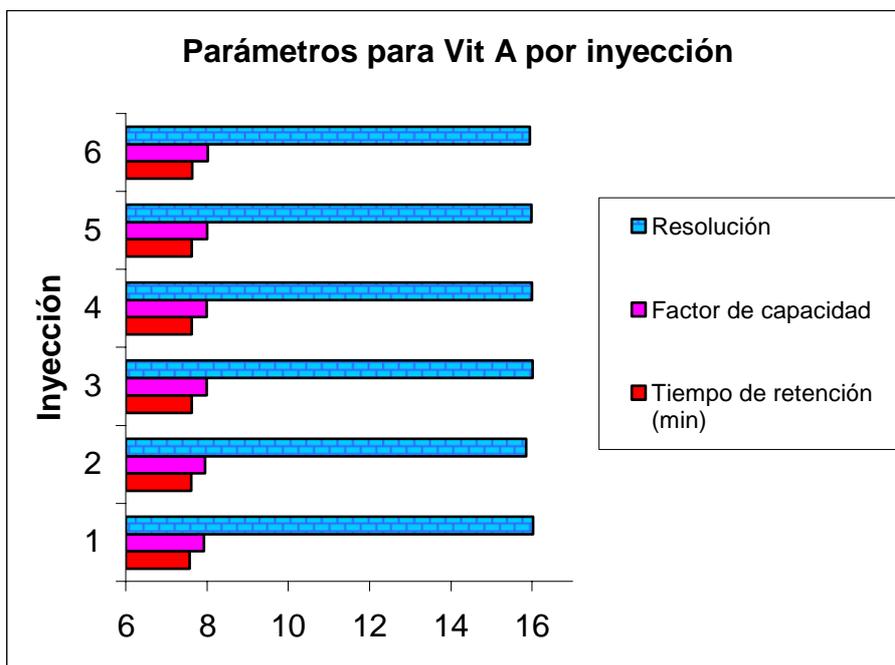


Gráfico 6. Parámetros por inyección para vitamina A

Los dos compuestos cumplen con los criterios de aceptación para adecuabilidad del sistema, ya que tienen un factor de capacidad mayor a 2 lo cual indica que las vitaminas son retenidas en la columna cromatográfica y se encuentran alejadas del volumen muerto; la resolución entre los picos también es mayor a 2 lo que significa que la separación entre ellos es completa; y por último, el factor de coe es menor a 1.5 por lo que el pico cromatográfico de las dos vitaminas no se aleja mucho de la forma gaussiana indicando así que la muestra no se queda retenida dentro de la columna cromatográfica y que se puede determinar el área del pico sin ningún problema.

La reproducibilidad entre cada inyección se ve reflejada en el área tanto de la vitamina A como de la vitamina D₃, ya que el coeficiente de variación es de 0.24 % y 1.34 % respectivamente.

7.3 Linealidad del sistema

Tabla 4. Área del pico en función de la concentración de Vitamina D₃

Solución estándar	Inyección	UI/ml de Vitamina D	Área del pico (mAU)
1.1	1	22.17	11.07
	2	22.17	11.12
1.2	1	22.17	11.06
	2	22.17	10.99
1.3	1	22.17	11.12
	2	22.17	11.16
2.1	1	29.56	16.04
	2	29.56	15.62
2.2	1	29.56	14.93
	2	29.56	15.43
2.3	1	29.56	15.47
	2	29.56	15.39
3.1	1	36.96	19.78
	2	36.96	19.77
3.2	1	36.96	19.54
	2	36.96	19.50
3.3	1	36.96	19.32
	2	36.96	19.28
4.1	1	44.35	23.36
	2	44.35	24.11
4.2	1	44.35	23.99
	2	44.35	24.17
4.3	1	44.35	24.43
	2	44.35	23.60
5.1	1	51.74	27.98
	2	51.74	28.43
5.2	1	51.74	27.99
	2	51.74	28.21
5.3	1	51.74	28.41
	2	51.74	28.65

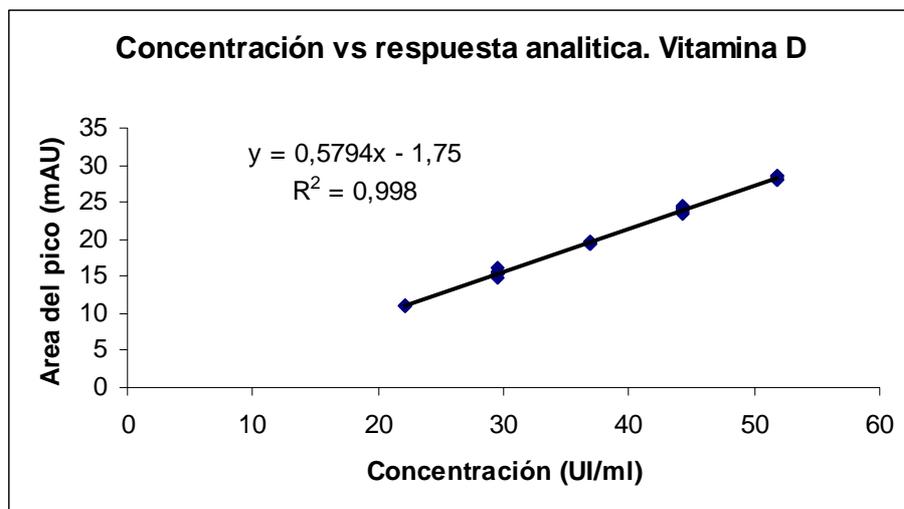


Gráfico 7. Linealidad del sistema para vitamina D₃

Tabla 5. Resultados de regresión para linealidad del sistema de Vitamina D₃

Ordenada al origen (b)	-1.75
Pendiente (m)	0.5794
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998
Desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$)	0.34
Intervalo de confianza para la pendiente $\alpha = 0.025$	Limite superior: 0.5915
	Limite inferior: 0.5672

El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el 0, además el coeficiente de determinación es de 0.998, por lo tanto la Vitamina D₃ cumple con los criterios de aceptación de linealidad del sistema.

Para conocer si la relación concentración-respuesta analítica es lineal se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ junto con las siguientes hipótesis:

H_0 : Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

H_1 : No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

Criterios de aceptación: Si $p\text{-value} < 0.01$ se acepta H_0 , si $p\text{-value} > 0.01$ se acepta H_1

Análisis de Varianza para área de pico Vit D₃

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Concentración Vit D	1101.5	1	1101.5	13963.70	0.0000
Residual	2.20872	28	0.0788828		

Total (corregido) 1103.7 29

Los valores de F están basados en el residual del cuadrado medio del error.

R cuadrada = 99.7999 por ciento

R-cuadrada (ajustada por Gl (Grados de Libertad)) = 99.7927 por ciento

El las tablas de ANADEVa se obtiene un valor de p menor a 0.01 lo que significa que estadísticamente existe una relación lineal entre la concentración de vitamina D₃ y el área del pico con un nivel de confianza del 99 %, por lo tanto se acepta H_0 , además el coeficiente de determinación obtenido en la gráfica 7 nos indica que la regresión lineal explica en un 99.8 % la variación de la respuesta analítica en función de la concentración de vitamina D₃.

En la gráfica 8 se muestra el área esperada del pico contra los residuos. Con esta figura se puede apreciar cuales son los puntos de la recta que más se desvían del modelo y la tabla de residuos inusuales indica que los puntos 7, 9 y 19 son los que presentan una mayor desviación.

Residuales inusuales para Área de pico Vit D₃

Fila	Y	Y Calculada	Residual	Residual estudentizado
7	16.04	15.3776	0.662393	2.67
9	14,93	15,48	-0,55	-2,29
19	23.36	23.9492	-0.589233	-2.31

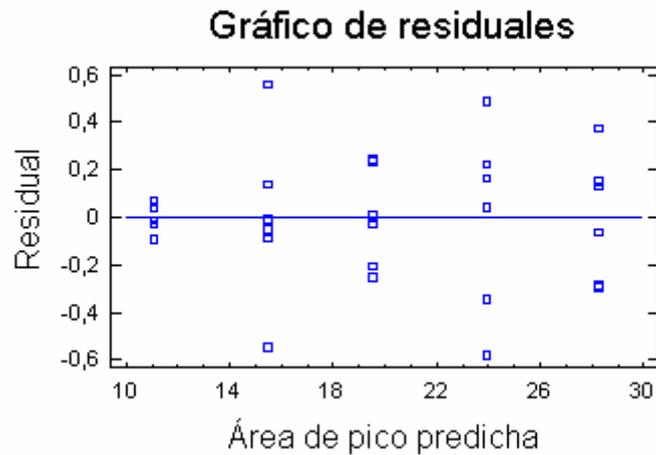


Gráfico 8. Gráfico de residuales para linealidad del sistema, Vit D₃

En la gráfica 9 de probabilidad normal también se observa que los puntos siguen una línea recta lo cual significa que los errores cometidos siguen una distribución normal, y por lo tanto el modelo cumple con los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad. Es por ello que el sistema para vitamina D₃ es lineal.

Gráfico de Probabilidad normal

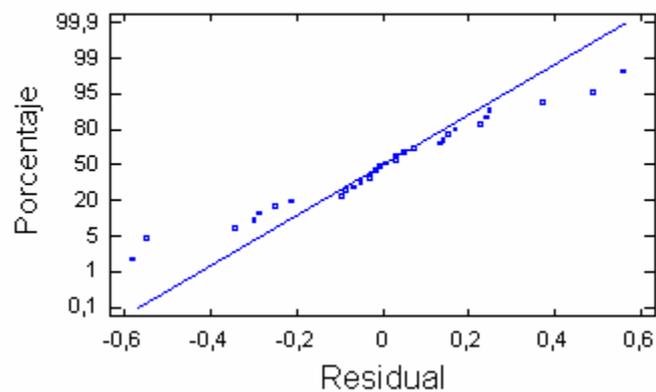


Gráfico 9. Gráfico de probabilidad normal para linealidad del sistema, Vit D₃

Tabla 6. Área de picos en función de la concentración de Vitamina A

Solución estándar	Inyección	UI/ml de Vitamina A	Área de pico (mAU)
1.1	1	172.68	1131.80
	2	172.68	1132.77
1.2	1	172.68	1131.98
	2	172.68	1137.58
1.3	1	172.68	1133.42
	2	172.68	1134.62
2.1	1	230.24	1522.32
	2	230.24	1525.75
2.2	1	230.24	1520.38
	2	230.24	1522.10
2.3	1	230.24	1517.74
	2	230.24	1525.86
3.1	1	287.81	1900.29
	2	287.81	1900.57
3.2	1	287.81	1906.23
	2	287.81	1902.12
3.3	1	287.81	1900.57
	2	287.81	1899.19
4.1	1	345.37	2282.92
	2	345.37	2303.57
4.2	1	345.37	2299.77
	2	345.37	2295.39
4.3	1	345.37	2312.79
	2	345.37	2311.42
5.1	1	402.93	2674.93
	2	402.93	2676.75
5.2	1	402.93	2675.30
	2	402.93	2691.88
5.3	1	402.93	2698.31
	2	402.93	2690.05

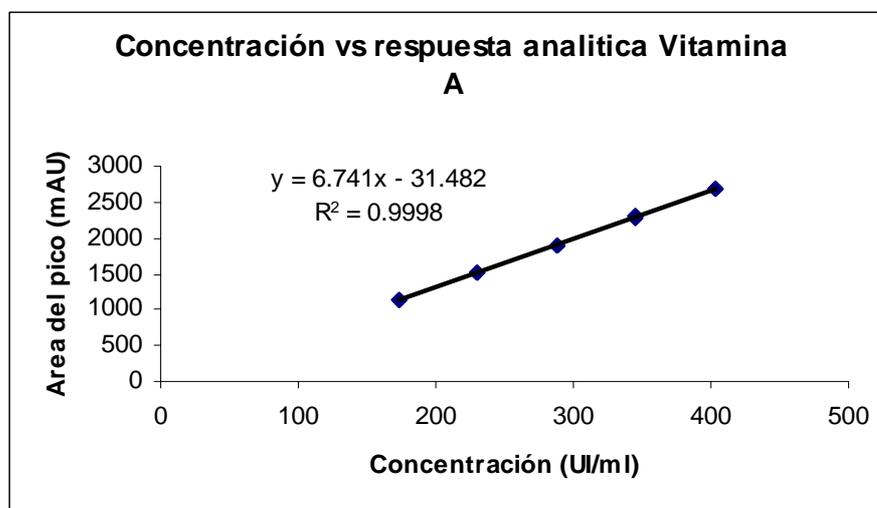


Gráfico 10. Linealidad del sistema para vitamina A

Tabla 7. Resultados de regresión para linealidad del sistema de vitamina A

Ordenada al origen (b)	-31.482
Pendiente (m)	6.741
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9998
Desviación estándar de regresión (Sy/x)	6.72
Intervalo de confianza para la pendiente	Limite superior: 6.7718
	Limite inferior: 6.7101

El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el 0 y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, por lo tanto, la linealidad del sistema para vitamina A cumple con los criterios de aceptación.

Para determinar la linealidad entre estas 2 variables se realizaron las siguientes hipótesis:

H₀: Existe una relación lineal entre la concentración de vitamina A y la respuesta analítica.

H₁ No existe una relación lineal entre la concentración de vitamina A y la respuesta analítica.

Criterios de aceptación: El nivel de significancia de la prueba es $\alpha = 0.01$. Se acepta H₀ si $p\text{-value} < 0.01$, si $p\text{-value} > 0.01$ se acepta H₁

Análisis de Varianza para área de pico Vit A

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Concentración Vit A	9.03404E6	1	9.03404E6	150927.81	0.0000
Residual	1675.99	28	59.8567		
Total (corregido)	9.03572E6	29			

Los valores de F están basados en el residual del cuadrado medio del error.

R cuadrada = 99.9815 por ciento

R-cuadrada (ajustada por Gl (Grados de Libertad) = 99.9808 por ciento

Con este resultado se acepta H₀. El análisis de varianza para vitamina A muestra estadísticamente la relación lineal entre la concentración de vitamina A y el área del pico con un nivel de confianza del 99 % y de acuerdo al coeficiente de determinación obtenido en la regresión lineal el 99.98 % de la variación de la respuesta analítica se explica en función de la concentración de vitamina A.

En la tabla de residuales se obtiene que los puntos 23 y 24 son los que se desvían del modelo y la gráfica demuestra que los datos experimentales no se desvían mucho de los valores estimados por la regresión.

Residuales inusuales para Área de pico Vit A

Fila	Y	Y Calculada	Residual	Residual estudentizado
23	2312.79	2296.65	16.1408	2.30
24	2311.42	2296.65	14.7708	2.07

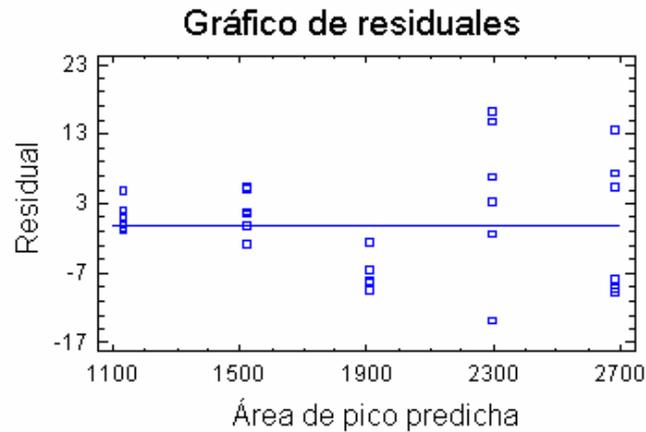


Gráfico 11. Gráfico de residuos para linealidad del sistema, Vit A

En la gráfica 12 de probabilidad normal se aprecia que los puntos siguen una línea recta lo cual significa que los errores cometidos siguen una distribución normal, y por lo tanto el modelo cumple con los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad. Es por ello que el sistema para vitamina A es lineal.

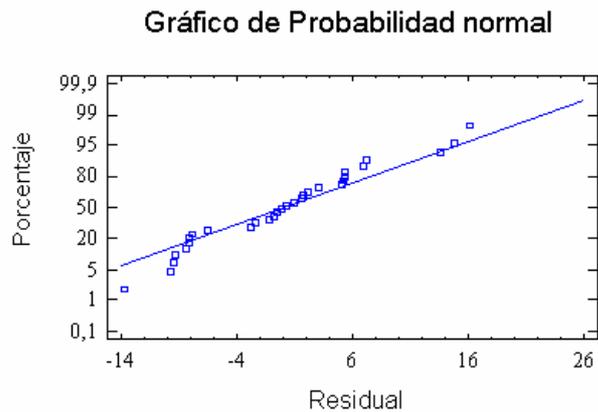


Gráfico 12. Gráfico de probabilidad normal para linealidad del sistema, Vit A

7.4 Especificidad

Tabla 8. Resultados obtenidos de los cromatogramas para evaluar la especificidad del método para Vitaminas D₃ y A

Muestra de placebo analítico	Respuesta analítica al t _r de Vit D ₃	Respuesta analítica al t _r de Vit A
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

No existe respuesta analítica al tiempo de retención de los analitos por lo tanto ningún excipiente de la formulación interfiere en el análisis y el método es específico para vitaminas A y D₃.

7.5 Exactitud y Repetibilidad del método

Tabla 9. Resultados del porcentaje de recobro de Vitamina D₃

Placebo cargado	Inyección	Cantidad adicionada de Vit D ₃ (UI/ml)	Cantidad recuperada de Vit D ₃ (UI/ml)	Porcentaje (%) de recobro
	1	35.15	34.81	99.03
1	2	35.15	36.03	102.51
	3	35.15	35.78	101.78
	1	35.15	34.64	98.55
2	2	35.15	35.55	101.13
	3	35.15	34.80	98.99
	1	35.15	35.32	100.48
3	2	35.15	35.66	101.46
	3	35.15	35.84	101.95
	1	35.15	34.52	98.20
4	2	35.15	35.37	100.63
	3	35.15	35.41	100.75
	1	35.15	35.12	99.90
5	2	35.15	34.88	99.23
	3	35.15	35.20	100.15
	1	35.15	35.02	99.63
6	2	35.15	35.74	101.68
	3	35.15	35.58	101.23
Promedio =				100.40
S =				1.27
CV =				1.26

Intervalo de confianza para la media poblacional	Limite superior	101.035 %
	Limite inferior	99.774 %

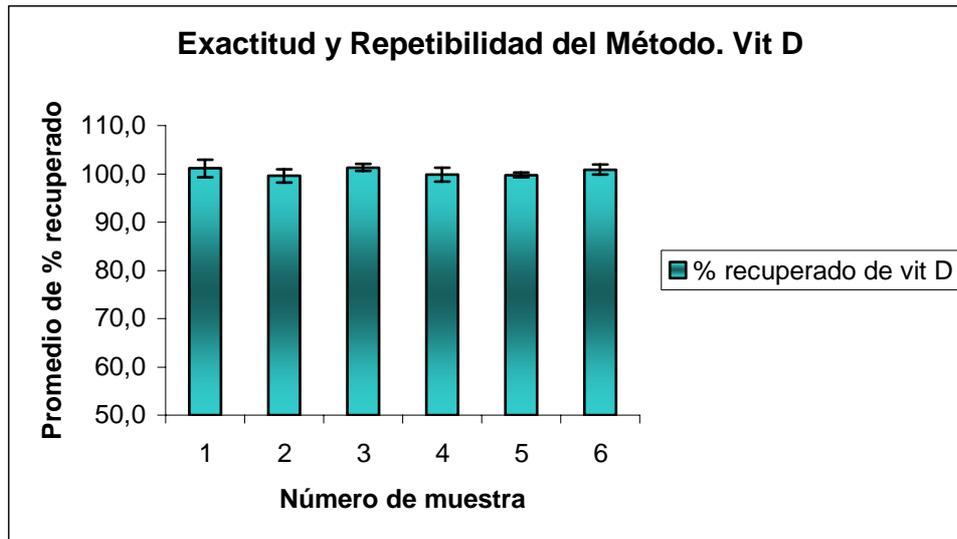


Gráfico 13. Porcentaje recuperado de Vitamina D₃ para evaluar exactitud y repetibilidad

El intervalo incluye el 100 % de recobro y con respecto a la cantidad recuperada el coeficiente de variación es menor al 2 %. Como se puede apreciar en el gráfico 13 el porcentaje recuperado de la vitamina D₃ por cada muestra es muy semejante y no existe diferencia significativa entre las 6 muestras por lo tanto el método es exacto y repetible.

Tabla 10. Resultados del porcentaje de recobro de Vitamina A.

Placebo cargado	Inyección	Cantidad adicionada de Vit A (UI/ml)	Cantidad recuperada de Vit A UI	Porcentaje (%) de recobro
1	1	234.1	233.39	99.69
	2	234.1	233.51	99.75
	3	234.1	231.15	98.74
2	1	234.1	231.68	98.96
	2	234.1	231.92	99.07
	3	234.1	231.24	98.78
3	1	234.1	234.38	100.12
	2	234.1	230.34	98.39
	3	234.1	229.42	98.00
4	1	234.1	233.78	99.86
	2	234.1	233.54	99.76
	3	234.1	231.00	98.67
5	1	234.1	234.43	100.14
	2	234.1	233.12	99.58
	3	234.1	233.28	99.65
6	1	234.1	232.34	99.25
	2	234.1	232.77	99.43
	3	234.1	231.29	98.80
Promedio =				99.26
S =				0.61
CV =				0.62

Intervalo de confianza para la media poblacional	Limite superior	99.5633 %
	Limite inferior	98.9598 %

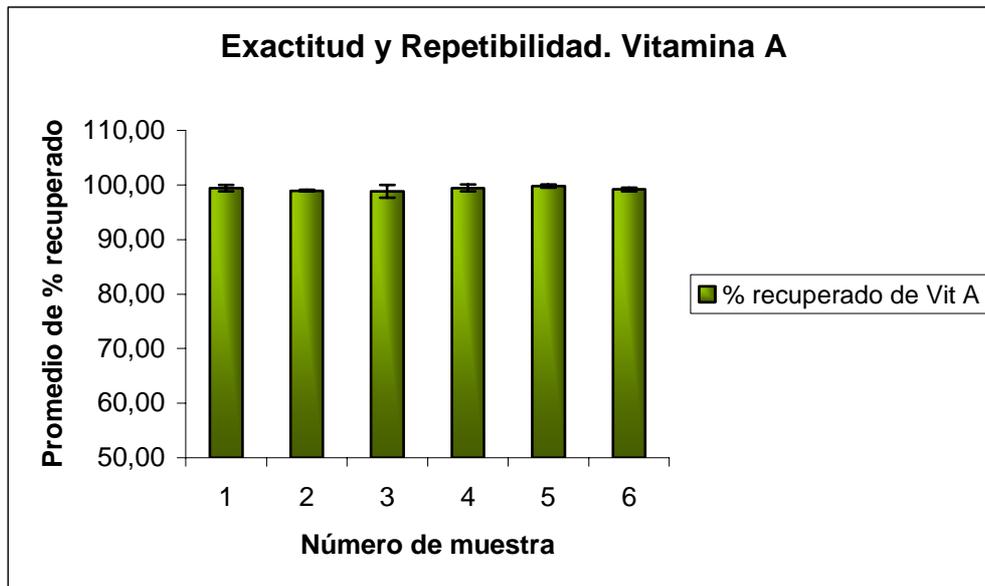


Gráfico 14. Porcentaje recuperado de Vitamina A para evaluar exactitud y repetibilidad

El intervalo de confianza para la media poblacional no incluye el 100 %, pero la media del % de recobro de vitamina A esta dentro del intervalo de 98-102 % y el coeficiente de variación es menor a 2 %. En la gráfica 14 también se observa que el porcentaje recuperado de la vitamina A en cada una de las muestra es muy semejante y no existe diferencia significativa por lo tanto el método es exacto y repetible tanto para vitamina A como para vitamina D₃.

6.- Linealidad del método

Tabla 11. Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de Vitamina D₃

Placebo analítico	Inyección	Cantidad adicionadas de vit D ₃ (UI/ml)	Cantidad recuperadas de Vit D ₃ (UI/ml)	% recuperado de Vit D
1.1	1	25.53	25.556	100.104
	2	25.53	24.939	97.685
1.2	1	25.53	25.657	100.498
	2	25.53	25.178	98.623
1.3	1	25.53	25.745	100.845
	2	25.53	25.562	100.126
2.1	1	34.05	33.229	97.589
	2	34.05	33.663	98.865
2.2	1	34.05	33.701	98.975
	2	34.05	34.331	100.826
2.3	1	34.05	33.655	98.840
	2	34.05	34.197	100.434
3.1	1	42.56	41.827	98.278
	2	42.56	43.459	102.114
3.2	1	42.56	42.759	100.468
	2	42.56	42.959	100.939
3.3	1	42.56	42.590	100.072
	2	42.56	42.146	99.029
4.1	1	51.07	51.108	100.075
	2	51.07	52.182	102.178
4.2	1	51.07	50.825	99.520
	2	51.07	50.642	99.163
4.3	1	51.07	53.904	105.549
	2	51.07	51.030	99.921
5.1	1	59.59	58.794	98.664
	2	59.59	61.271	102.822
5.2	1	59.59	58.990	98.994
	2	59.59	60.394	101.350
5.3	1	59.59	59.906	100.530
	2	59.59	59.730	100.235
Promedio				100.110
S =				1.630
CV =				1.63 %

Intervalo de confianza para la media poblacional del % de recobro	Limite superior	100.719 %
	Limite inferior	99.501 %

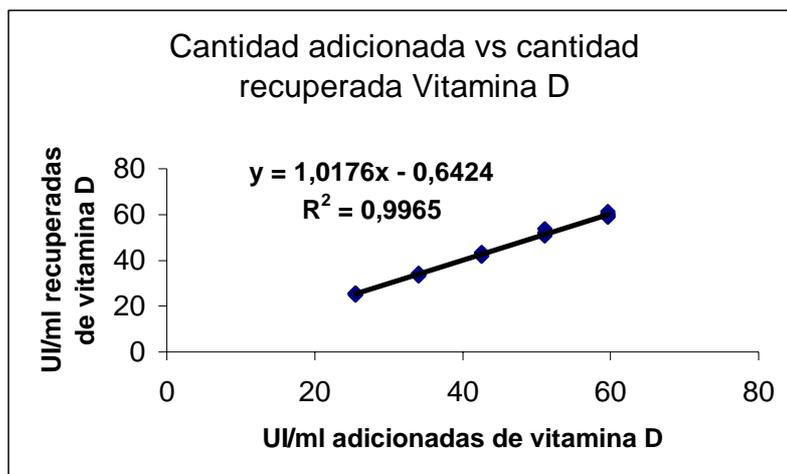


Gráfico 15. Linealidad del método para Vitamina D₃

Tabla 12. Análisis de la regresión lineal para linealidad del método Vitamina D₃

Ordenada al origen (b)	-0.6424 mAU
Pendiente (m)	1.0176
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9965
Coefficiente de variación de regresión	1.61 %
Intervalo de confianza para la pendiente	Limite superior = 1.0390
	Limite inferior = 0.9962
Intervalo de confianza ordenada al origen	Limite superior = 0.3030
	Limite inferior = -1.5878

El coeficiente de variación de regresión, al ser menor del 2 %, indica que la precisión del método es buena para cuantificar esta vitamina y como los intervalos para la pendiente y la ordenada al origen incluyen el 1 y 0 respectivamente, se puede recuperar el 100 % de la cantidad adicionada.

Para determinar si existe una relación entre la cantidad adicionada de vitamina D₃ con la cantidad recuperada se formularon las siguientes hipótesis:

H₀: La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada es lineal.

H₁: La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada no es lineal.

Criterios de aceptación: Si p-value < 0.01 se acepta H₀, de lo contrario se acepta H₁

Modelo Lineal General

Análisis de Varianza para la cantidad recuperada (UI/ml) de Vit D₃

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
UI/ml adicionadas Vit D	4502.65	1	4502.65	7948.50	0.0000
Residual	15.8614	28	0.566478		
Total (corregido)	4518.51	29			

Los valores de F están basados en el residual del cuadrado medio del error.

R cuadrada = 99.649 por ciento

R-cuadrada (ajustada por Gl (Grados de Libertad))= 99.6364 por ciento

De acuerdo con los resultados de las tablas de ANADEVa se acepta Ho, por lo tanto la relación entre estas dos variables es lineal con un nivel de confianza del 99% y el coeficiente de determinación indica que el 99.65 % de la variabilidad de la concentración recuperada esta en función de la cantidad adicionada.

La siguiente tabla de residuales muestra que dato número 23 es el que más se desvía del modelo y la gráfica de residuos número 16 muestra que los datos obtenidos experimentalmente no se desvían mucho de los valores esperados según el modelo.

Residuales inusuales para la cantidad recuperada UI/ml de Vit D₃

Fila	Y	Y Calculada	Residual	Residual estudentizado
23	53.9	51.3237	2.57627	4.61

Gráfico de residuales

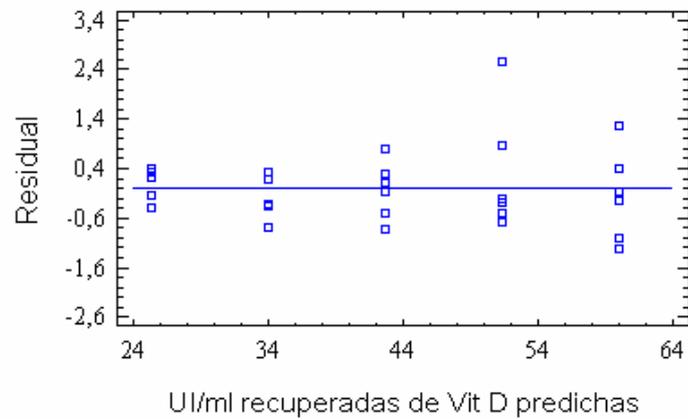


Gráfico 16. Gráfico de residuales para linealidad del método, Vit D₃

En el gráfico 17 se muestra que los residuales tienen una tendencia de línea recta por lo tanto los errores cometidos tienen una distribución normal por lo que el modelo cumple con los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad por lo tanto el método para vitamina D₃ es lineal.

Gráfico de Probabilidad normal

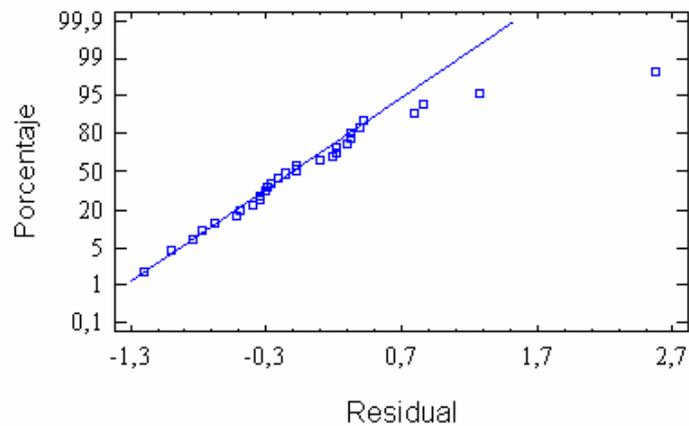


Gráfico 17. Gráfico de probabilidad normal para linealidad del método. Vit D₃

Tabla 13. Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de Vitamina A

Placebo analítico	Inyección	UI/ml de Vit A adicionadas	UI/ml de Vit A recuperadas	% recuperado de Vit A
1.1	1	162.46	160.062	98.524
	2	162.46	162.362	99.940
1.2	1	162.46	160.439	98.756
	2	162.46	159.794	98.359
1.3	1	162.46	159.725	98.316
	2	162.46	159.804	98.365
2.1	1	216.62	217.880	100.581
	2	216.62	216.448	99.920
2.2	1	216.62	214.716	99.121
	2	216.62	217.868	100.576
2.3	1	216.62	213.768	98.683
	2	216.62	217.393	100.356
3.1	1	270.78	269.472	99.517
	2	270.78	271.859	100.398
3.2	1	270.78	271.534	100.278
	2	270.78	267.963	98.959
3.3	1	270.78	271.305	100.194
	2	270.78	270.671	99.959
4.1	1	324.93	321.087	98.817
	2	324.93	322.648	99.297
4.2	1	324.93	330.432	101.693
	2	324.93	326.760	100.563
4.3	1	324.93	329.595	101.435
	2	324.93	324.432	99.846
5.1	1	379.09	381.321	100.588
	2	379.09	379.948	100.226
5.2	1	379.09	381.259	100.572
	2	379.09	377.810	99.662
5.3	1	379.09	379.405	100.083
	2	379.09	377.268	99.519
Promedio				99.7706
S =				0.899
CV =				0.90 %

Intervalo de confianza para la media poblacional del % de recobro	Limite superior	100.105 %
	Limite inferior	99.432 %

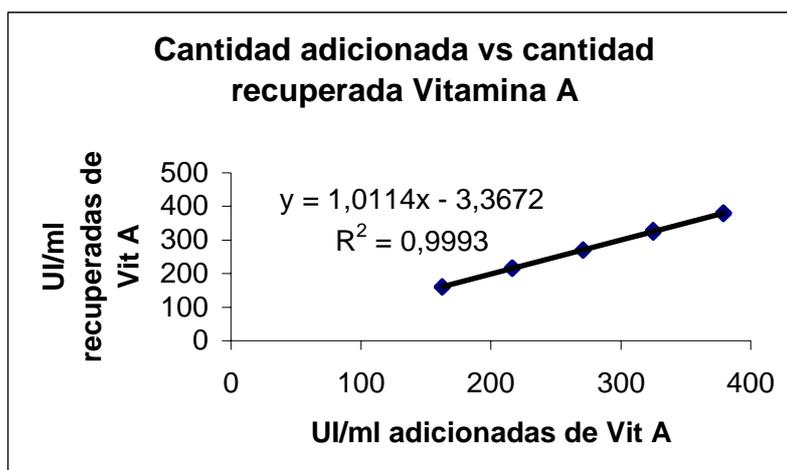


Gráfico 18. Linealidad del método para Vitamina A

Tabla 14. Análisis de la regresión lineal para linealidad del método de Vitamina A

Ordenada al origen (b)	-3.3672
Pendiente (m)	1.0114
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9993
Coefficiente de variación de regresión	0.92 %
Intervalo de confianza para la pendiente $\alpha = 0.025$	Limite superior = 1.0236
	Limite inferior = 0.9992
Intervalo de confianza ordenada al origen $\alpha = 0.025$	Limite superior = 0.0585
	Limite inferior = -6.7929

El método es preciso para cuantificar vitamina A porque el coeficiente de variación de regresión es menor al 2 % y se puede recuperar el 100 % de la cantidad adicionada porque el intervalo de confianza para la ordenada al origen es 0 y para la pendiente es 1. Este modelo también nos indica que el 99.93 % de la variación en la cantidad recuperada de esta vitamina se explica con la cantidad adicionada.

Para este modelo se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 : Existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada de Vitamina A.

H_1 : La relación entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada no es igual.

Criterios de aceptación: Si $p\text{-value} < 0.01$ se acepta H_0 , si $p\text{-value} > 0.01$ se acepta H_1

Modelo General Lineal

Análisis de Varianza para la cantidad recuperada (UI/ml) de Vit A

Origen	Suma de cuadrados	G1	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
UI/ml adicionadas Vit A	180025.0	1	180025.0	40478.98	0.0000
Residual	124.526	28	4.44736		
Total (corregido)	180149.0	29			

Los valores de F están basados en el residual del cuadrado medio del error.

R cuadrada = 99.9309 por ciento

R-cuadrada (ajustada por G1 (Grados de Libertad))= 99.9284 percent

Como el valor obtenido de p-value es menor a 0.01 en ambas tablas se acepta Ho por lo que la relación entre la cantidad adicionada y recuperada es lineal.

Los datos experimentales no se desvían mucho de los valores esperados por el modelo de regresión, solo los datos 19, 21 y 23 son los que desvían del modelo.

Residuales inusuales para cantidad recuperada UI/ml de Vit A

Fila	Y	Y Calculada	Residual	Residual Estudentizado
19	321.09	325.274	-4.1843	-2.17
21	330.43	325.274	5.1557	2.80
23	329.6	325.274	4.3257	2.25

Gráfico de residuales

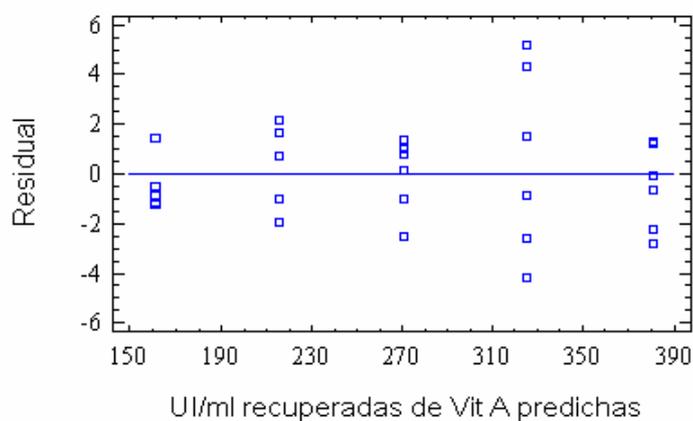


Gráfico 19. Gráfico de residuales para linealidad del método, Vit A

Como los residuales tienen una tendencia lineal en el gráfico 20 de probabilidad normal este modelo cumple con los 3 supuestos que ya se han mencionado por lo tanto se cumple con la linealidad del método para vitamina A.

Gráfico de Probabilidad normal

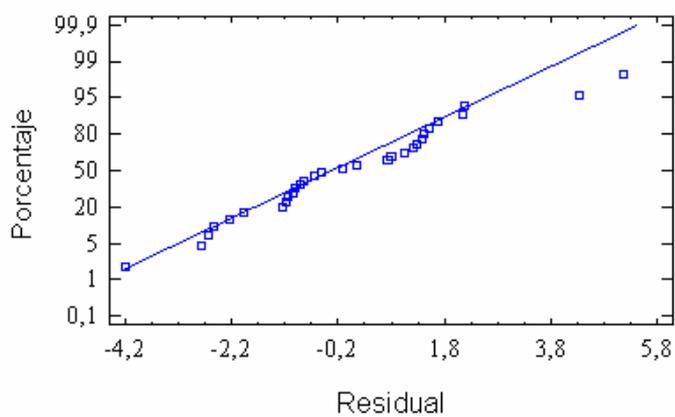


Gráfico 20. Gráfico de probabilidad normal para linealidad del método, Vit A

7.- Reproducibilidad del método

Tabla 15. Porcentaje de recobro de vitamina D₃ por 2 analistas en dos días diferentes

Día	% recuperado Vit D ₃ . Analista 1	% recuperado Vit D ₃ . Analista 2	Promedio y CV
1	108.95	108.26	Promedio = 108.22 CV = 0.65 %
	107.91	109.02	
	108.13	107.1	
2	107.9	109.97	Promedio = 108.54 CV = 0.73 %
	108.63	107.69	
	108.53	108.52	
Promedio y CV	Promedio = 108.34 CV = 0.39 %	Promedio = 108.42 CV = 0.92 %	Prom. _{global} = 108.38 CV _{global} = 0.12 %

Para poder determinar si el día y el analista puede influir en el porcentaje recuperado de vitamina D₃ se llevó a cabo un análisis de varianza anidado con un nivel de significancia de $\alpha = 0.1$ y para ello se formularon las siguientes hipótesis:

H₀: El día y el analista no tienen efecto sobre el porcentaje recuperado de vitamina D₃

H₁: El día y/o el analista sí afectan el porcentaje de recobro de vitamina D₃

Criterios de aceptación: Si $p\text{-value} > 0.1$ se acepta H₀, de lo contrario se rechaza H₀

Análisis de Varianza para % Vit D₃

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Modelo	0.562492	3	0.187497	0.28	0.8417
Residual	5.4472	8	0.6809		
Total (Corr.)	6.00969	11			

Suma de cuadrados Tipo III

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Analista	0.021675	1	0.021675	0.08	0.8037
Día(Analista)	0.540817	2	0.270408	0.40	0.6848
Residual	5.4472	8	0.6809		
Total (corregido)	6.00969	11			

Este análisis de varianza muestra que el analista y el día no afectan el porcentaje recuperado de vitamina D₃, por lo tanto se acepta H₀. Este parámetro analítico cumple con el criterio establecido por la guía de validación usada al tener un CV global menor al 2 % de la cantidad recuperada por lo tanto el método es reproducible entre analistas y días para la cuantificación de vitamina D₃.

Tabla 16. Porcentaje de recobro de vitamina A por 2 analistas en dos días diferentes

Día	% recuperado Vit A. Analista 1	% recuperado Vit A. Analista 2	Promedio y CV
1	105.49	104.41	Promedio = 104.626 CV = 0.82 %
	105.27	104.43	
	105.06	103.1	
2	105.67	105.77	Promedio = 105.776 CV = 0.16 %
	105.65	105.67	
	106.1	105.8	
Promedio y CV	Promedio = 105.54 CV = 0.34 %	Promedio = 104.863 CV = 1.03 %	Prom. global = 105.20 CV _{global} = 0.51 %

Para saber si estas dos variables de estudio afectan la cantidad recuperada de vitamina A se realizó un análisis de varianza anidado con un nivel de significancia $\alpha = 0.1$ junto con las siguientes hipótesis:

H_0 : No hay efecto del analista y el día en el porcentaje de recuperación de vitamina A

H_1 : Existe un efecto de día y/o analista en el porcentaje recuperado de vitamina A

Criterios de aceptación: Si $p\text{-value} > 0.1$ se acepta H_0 , si $p\text{-value} < 0.1$ se acepta H_1

Análisis de Varianza para % Vit A

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Modelo	5.18723	3	1.72908	5.84	0.0206
Residual	2.37047	8	0.296308		
Total (Corr.)	7.55769	11			

Suma de cuadrados Tipo III

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Analista	1.30021	1	1.30021	0.67	0.4993
Día(Analista)	3.88702	2	1.94351	6.56	0.0206
Residual	2.37047	8	0.296308		
Total (corregido)	7.55769	11			

En la tabla de ANADEVIA se observa que el día si afecta la cantidad recuperada de vitamina A con un nivel de confianza de 90 %. Como se muestra en el gráfico 21, el intervalo de confianza de las medias para día se traslapan a una significancia del 99 % por lo tanto estos valores son iguales.

Gráfico de medias con un intervalo de 99.0 %
de diferencia mínima significativa

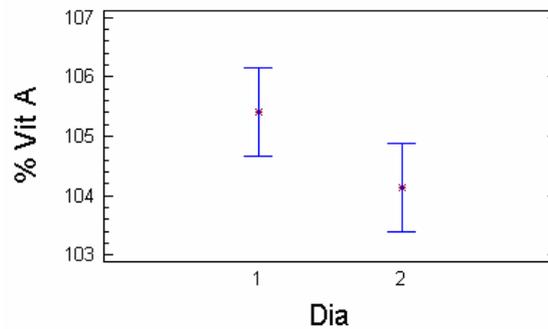


Gráfico 21. Gráfico de medias. Reproducibilidad del método Vit A

Una posible explicación a la diferencia entre días para cuantificar vitamina A es la solución estándar utilizada por el analista 2, que fue la misma que preparó el analista 1 horas después que había llevado a cabo su análisis. Esto debido a que el estándar secundario de vitamina A usado para la validación se había agotado ese día y las muestras del analista 2 ya estaban preparadas

Aun así la guía de validación establece que el porcentaje de recobro de vitamina debe tener un coeficiente de variación menor al 2 %, para este caso se obtuvo un valor de 0.51 %, por lo tanto el método es reproducible para cuantificar vitamina A.

8.- Robustez del método analítico

Tabla 17. Resultados de % de recobro de vitamina D₃ para evaluar la robustez del método.

pH	% recuperado de Vitamina D ₃	Diferencia absoluta
3.05	110.7186	0.24
4.58	110.9878	
6.09	111.0336	0.041

Como la diferencia absoluta es menor para pH 3.05 y 6.09, entonces se cumple con el criterio de aceptación. Otro análisis realizado es la comparación de medias usando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ realizando las siguientes hipótesis:

H₀: La media del % de recobro de vitamina D₃ es la misma para los 3 valores de pH

H₁: Al menos un par de medias es diferente

Criterios de aceptación: Se acepta H₀ si p-value > 0.05, si es menor que este valor se acepta H₁

Tabla de ANADEVIA

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Entre grupos	0.528496	2	0.264248	0.25	0.7774
Dentro los grupos	24.9267	24	1.03861		
Total (Corr.)	25.4552	26			

Como el valor obtenido de p es mayor a 0.05, entonces, se acepta H₀ por lo tanto el pH de la muestra no afecta el porcentaje de recobro de la vitamina D₃ y se puede decir que el método es robusto a estos valores de pH.

Tabla 18. Resultados de % de recobro de vitamina A para evaluar la robustez del método.

pH	% recuperado de Vitamina A	Diferencia absoluta
3.05	103.8685	0.91
4.58	104.7834	
6.09	104.0311	0.75

Para determinar si existe una diferencia entre el valor medio de porcentaje de recobro de esta vitamina a los diferentes valores de pH se realizaron las siguientes hipótesis:

H₀: La media de porcentaje de recobro de vitamina A es igual en los 3 valores de pH

H₁: Al menos un par de medias es diferente

Criterios de aceptación: se acepta H₀ si p-value es mayor a 0.05, si es menor que 0.05 se acepta H₁. El nivel de significancia usado en la prueba es $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Entre grupos	4,3034	2	2,1517	3,10	0,0635
Dentro los grupos	16,6611	24	0,694211		
Total (Corr.)	20,9645	26			

Se acepta H₀ por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los promedios del % de recobro de vitamina A a los valores de pH de estudio con un nivel de significancia del 95 %, además la diferencia absoluta de la muestra con el valor de referencia, es menor al 2 % cumpliendo así con el criterio de aceptación para decir que el desempeño del método para cuantificar vitaminas A y D₃ no es afectado por el pH de la muestra.

9.- Tolerancia del método analítico

Tabla 19 Porcentaje de recobro de Vitaminas D₃ y A para evaluar tolerancia del método.

Equipos	Muestra	% de recobro de Vitamina D	% de recobro de Vitamina A
HPLC 1	1	110.3351	105.1065
	2	110.9199	105.2703
	3	111.6883	104.8411
HPLC 2	1	111.3474	107.9878
	2	109.5232	106.6755
	3	109.3602	106.0678
	Promedio	110.5290	105.9915
	S	0.9573	1.1904
	CV =	0.87 %	1.12 %

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro para cada vitamina es menor del 2 %, por lo tanto se cumple con el criterio de aceptación para este parámetro analítico, por lo que el método es reproducible entre los dos cromatógrafos. Para conocer la varianza entre un cromatógrafo y otro se realizó la prueba de F para la varianza de 2 muestras junto con las siguientes hipótesis:

H₀: No existe diferencia entre los cromatógrafos para cuantificar las vitaminas A y D₃

H₁: Existe diferencia entre los cromatógrafos para cuantificar estas vitaminas

Criterios de aceptación: El valor de F crítico debe ser mayor que F calculado. El nivel de significancia de la prueba es $\alpha = 0.01$.

Tabla 20. Prueba F para la varianza de 2 muestras. Vit D₃

Prueba F para varianzas de dos muestras. Vit D

	HPLC 2	HPLC 1
Media	110.0769	110.9811
Varianza	1.2172	0.4606
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	2.6424	
P(F<=f) una cola	0.2745	
Valor crítico para F (una cola)	99.0003	

Tabla 21 Prueba F para la varianza de 2 muestras. Vit A

Prueba F para varianzas de dos muestras. Vit A

	HPLC 2	HPLC 1
Media	106.9103	105.0726
Varianza	0.9630	0.0469
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	20.5252	
P(F<=f) una cola	0.0465	
Valor crítico para F (una cola)	99.0003	

Como se muestra en las tablas 20 y 21 el valor crítico de F es mayor al de F calculado se acepta H₀ para las dos vitaminas, por lo tanto el método si es reproducible entre los cromatógrafos con un nivel de significancia del $\alpha = 0.01$ %.

10.- Estabilidad de la muestra analítica

Tabla 22. Porcentaje de recobro de vitamina D₃ para evaluar estabilidad de la muestra analítica.

Tiempo de análisis	% de recobro de Vitamina D	Diferencia absoluta
Inicio	107.11	
6 horas	106.71	0.41
12 horas	109.10	1.98

Para determinar si existe diferencia entre la media de las muestras leídas al inicio, 6 y 12 hrs se realizaron las hipótesis siguientes:

H₀: Las medias del porcentaje de recobro son iguales a los 3 tiempos de análisis

H₁: Por lo menos un par de medias es diferente

Criterios de aceptación: Si p-value > 0.05 se acepta H₀, si es menor a 0.05 se rechaza H₀

El nivel de significancia para esta prueba es de $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza					
Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Entre grupos	29.4788	2	14.7394	3.20	0.0587
Dentro los grupos	110.613	24	4.60887		
Total (Corr.)	140.092	26			

Como el valor de p es mayor de 0.05 se acepta H₀; con un nivel de confianza del 95 % no hay diferencia entre las medias de las variables. En el gráfico 22 se aprecia que la media obtenida a las 12 hrs de análisis es la que más se aleja de la de inicio y 6 hrs.

Gráfico de medias con un intervalo de 95.0 % de diferencia mínima significativa

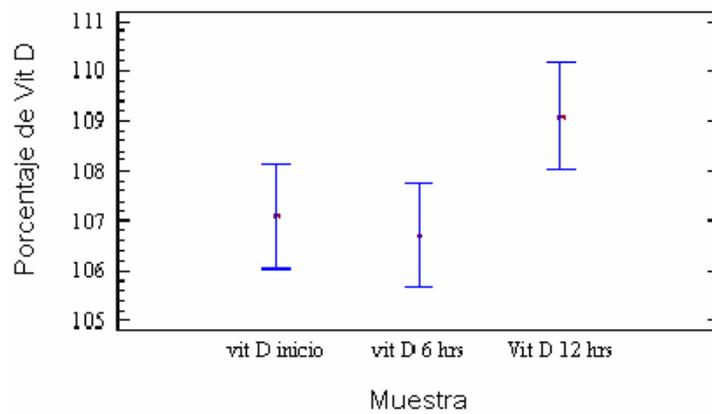


Gráfico 22. Comparación de medias para estabilidad de la muestra. Vit A

Tabla 23. Porcentaje de recobro de vitamina A para evaluar estabilidad de la muestra analítica.

Tiempo de análisis	% de recobro de Vitamina A	Diferencia absoluta
Inicio	105.80	
6 horas	105.67	0.13
12 horas	104.31	1.49

Para conocer la similitud entre los promedios del % recuperado de vitamina A en cada tiempo de análisis se hicieron las siguientes hipótesis:

Ho: Las medias de porcentaje de recobro son iguales a los 3 tiempos de análisis

H₁: Al menos un par de medias es diferente

Criterios de aceptación: Se acepta Ho si p-value > 0.05, de lo contrario de acepta H₁

Análisis de Varianza

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de p
Entre grupos	10.4799	2	5.23993	19.97	0.0000
Dentro los grupos	5.50893	21	0.26233		
Total (Corr.)	15.9888	23			

Se rechaza H_0 , por lo tanto hay diferencia entre las medias. Con la gráfica 23 se puede apreciar que al tiempo inicio y 6 horas la media es semejante, en tanto que el porcentaje de recobro a las 12 hrs es el más bajo.

Gráfico de medias con un intervalo de 95.0 % de diferencia mínima significativa

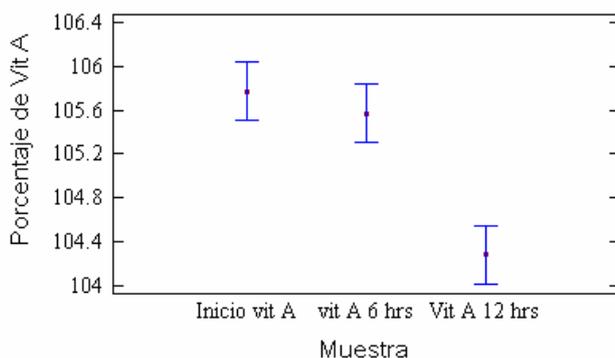


Gráfico 23. Comparación de medias para estabilidad de la muestra, Vit A

Conforme a lo establecido por la Guía de validación de QFB's de México, la muestra es estable hasta las 12 hrs para las 2 vitaminas porque se observa un valor absoluto cercano al 2 %. Sin embargo, al analizar los gráficos 22 y 23 se observa que a las 6 hrs la media es muy semejante a la del tiempo inicial y la media de las 12 hrs es la más alejada. Por lo tanto lo recomendable es que las muestras se analicen 6 horas después de que hayan sido preparadas como máximo.

8.- CONCLUSIONES

La validación de un método analítico es muy importante dentro de la industria farmacéutica, ya que los resultados obtenidos deben ser reproducibles y lo más exactos posibles para asegurar la calidad del producto que se elabora.

Las características que presenta este método para la cuantificación de Vitaminas A y D₃ en una solución oral son:

- ◆ La técnica de preparación de la muestra es sencilla, además de que el tiempo de análisis es corto, aproximadamente 9 minutos por inyección.

- ◆ Una vez que se ha preparado la muestra debe analizarse antes de las 6 horas ya que a este tiempo la muestra aún es estable y no hay variación significativa en el porcentaje de recobro de las vitaminas.

- ◆ Al cumplir con todos los criterios de aceptación en cada uno de los parámetros de desempeño de un método analítico que establece la guía de Validación de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México y que está avalado por la Secretaría de de Salud, se puede concluir que este método es preciso, exacto y reproducible para llevar a cabo la cuantificación de vitaminas A y D₃ en las ampolletas de 3 ml en cuestión.

9. – ANEXO I

Formulas utilizadas para el cálculo de los parámetros analíticos

Media aritmética de y:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Media aritmética de x =

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Pendiente:

$$m = \frac{n\sum xy - \sum x\sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{(n\sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente poblacional:

$$IC(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

Desviación estándar de la pendiente:

$$s_{b1} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Desviación estándar de regresión:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

Intervalo de confianza para la media poblacional:

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC(\beta_{b0}) = b \pm t_{0.975, n-2} s_b$$

Desviación estándar de la ordenada al origen:

$$s_b = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Coefficiente de variación de regresión:

$$CV_{y/x} = \frac{s_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

Diferencia absoluta de una condición con respecto a la condición inicial:

$$|d| = \left| \bar{y}_1 - \bar{y}_0 \right|$$

10. - BIBLIOGRAFIA

A Report of a Joint FAO/IAAE Expert Consultation. Validation of analytical Methods for Food Control. 2-4 December 1997, Vienna, Austria.

Aristizabal Giraldo, Claudia et-al.

<http://www.monografias.com/trabajos11/lasvitam/lasvitam.shtml> Año 2005

Baltasar Montes de Oca Beatriz. Desarrollo y validación del método por CLAR para determinar albendazol en suspensión. Tesis Profesional, FESC UNAM, México, 1994, pp. 20

Carl Peter Tonseth and Jo Dohl. Guidelines for validation of analytical methods. Analytical Sciences R&D, 1 edition, 1993, pp 38.

CDER. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. November 1994.

Chung Chow Chan, et-al. Analytical method validation and instrument performance verification. A John Wiley and sons publication, USA, 2004, pp. 13-14,20

Cohen, Yves. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Editorial Limusa, México, 1998, pp. 505-513

Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos Biólogos. Guía de validación de métodos analíticos. Edición 2002

Connors, Kennet A, et-al. Chemical stability of pharmaceuticals, a handbook of pharmacists. 2nd edition, John Willey and sons, USA, 1986, pp. 351,791-792

Connors, Kenneth A. Curso de análisis farmacéutico. Ed. Reverte, Barcelona, España, 1981, pp 422-436

Domínguez, Carlos Martín. <http://personal.redestb.es/martin/vit.htm> Año 2005

Douglas A. Skoog. Principios de análisis instrumental. 5^a edición, tr de Ma. del Carmen Martín, Editorial McGraw-Hill, España, 2001, pp. 736, 745-746.

FDA. www.fda.gov Año 2005

Fernández Serret, Alfredo, et-al. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación de dextrometorfano en jarabe. Rev. Cubana Farm; 36(1), Año 2002, pp. 28-34

García Morales, Angélica. Desarrollo y validación de un método analítico por CLAR para cuantificar vitamina A en una forma farmacéutica de solución oral., Tesis licenciatura, Cuautitlán Izcalli, México: UNAM, Año 1995, pp. 14-26

Green, Mark. A Practical Guide to Analytical Method Validation, *Analytical Chemistry*, (68), 1996, 305A-309A

Guía nutricional. www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guianutr/compo42.htm
Año 2005

Guidance for Industry. Analytical Procedures and Method Validation. Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. August 2000.

<http://personal.redestb.es/martin/vit.htm> Año 2005

ICH Topic Q2A. Note for guidance on validation of analytical methods. Definitions and terminology, 1 June 1995.

Labcompliance. www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm Año 2005

Llamas Borrajo, J.F., et-al. Quimiometría y métodos instrumentales de análisis, Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Ingeniería y Combustibles, E.T.S.I de Minas, España, 2003, pp. 116

Mora, Rafael J. Soporte nutricional especial. Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Colombia. 2002. pp 66

Moreno, P and Salvado V. Determination of eight water and fat soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) pp. 207-215.

Pharmtech. www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/102003/48314/article.pdf . Año 2005

Reinhard, Matissek, et-al. Análisis de los alimentos. Fundamentos-Métodos-Aplicaciones. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1992, pp. 346-347

Robinson, David S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1991, pp. 309-320.

Sizer, Frances and Eleanor Whitney. Nutrition. Concepts and Controversies. 7th. ed. West/Wadsworth. USA. 1997. pp. 227,240

SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Año 1993

Swarbrick, James, Boylan James C. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Second edition. Vol 1. Marcel Dekker, Inc. USA. 2002. Pág. 754

Sweetman, Sean C. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 1ª edición, Pharma Editores, Barcelona, España, 2003, pp 1590

Szepesi, Gabor. HPLC in pharmaceutical análisis. Vol 1. Editorial CRC Press, USA, 1990, pp. 1-4, 191-193

Tolonen, Matti. Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición. Editorial Acribia, S.A, Zaragoza, España, 1995, pp. 126-143

Tolonen, Smolin Lori A., Nutrition, science and applications. 3ª. ed, Saunders College Publishing. USA. 2000. pp. 245

UIPAC technical report, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem. Vol. 74, No. 5, 2002, pp. 835-855

Vademecum Farmacéutico Digital. Información Profesional Especializada, 8ª edición, Rezza Editores, 1999

Voigt Rudolf and Manfred Bornschein. Tratado de Tecnología Farmacéutica, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1982, 769 pp. P. 361.

Waters. www.waters.com Año 2005

www.aula21.net/Nutriweb/vitaminas.htm Año 2005