



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

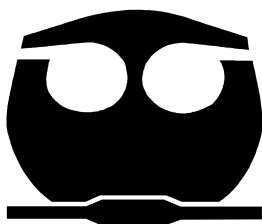
**VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS DE
CEFADROXILO EN TABLETAS POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA EFICIENCIA (CLAE)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA**

PRESENTA

ALIA RENTERÍA ESPINOSA



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Francisco Rojo Callejas
Vocal	Adolfo García Osuna
Secretario	María del Socorro Alpizar Ramos
1^{er}. Suplente	Georgina Artemisa Duarte Lisci
2^o. Suplente	Pedro Salvador Valadez Eslava

Sitio en el que se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica
Edificio "A" Laboratorio 3B y 3F.
Facultad de Química Cd. Universitaria.

Asesor del tema



Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico



Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano

Sustentante



Alia Rentería Espinosa

*La vida no te está esperando en ninguna parte, te está sucediendo.
No se encuentra en el futuro como una meta que has de alcanzar,
está aquí y ahora, en este mismo momento, en tu respirar, en la circulación
de tu sangre, en el latir de tu corazón. Cualquier cosa que seas, es tu vida
y si te pones a buscar significados en otra parte, te la perderás.*

Rajneesh Chandra Mohan (OSHO)

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO:

A Dios por permitirme ser parte de este universo y por haberme dado la oportunidad de comprender un poco de el comportamiento de la naturaleza.

A la esencia de mis padres por haber estado siempre conmigo.

A mi abuelita Esperanza por haberme apoyado siempre en mis estudios.

A mi mamá Viky por guiarme en el camino de la educación.

A mi asesor Adolfo García Osuna por su persistente guía.

A la maestra Silvia Mendoza por sus aportes en la finalización de este trabajo.

A mis hermanos Dilia, Alejandro, Benjamín y Diego por su cariño y comprensión.

A mis sobrinas Yanitzi y Andrea por ser esa luz que ilumina mi vida.

A Peter por su amor y cariño que me brindó durante todo este tiempo.

A mis amigos por su apoyo durante la carrera y por los momentos de felicidad que compartimos.

A la UNAM y profesores que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera.

ÍNDICE

	Página
Introducción	2
Objetivos	3
Capítulo I. Antecedentes	
Cefadroxilo	5
Farmacocinética	
Efectos adversos	
Resistencia de los antibióticos	
Origen de la cromatografía	11
Diferentes tipos de cromatografía	
Validación	
Origen de la cromatografía	
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	13
Instrumentación	
Fase móvil	
Sistema de Bombeo	
Sistema de Inyección	
Sistema de Separación	
Sistema de Detección	
Sistema de Registro	
Validación de métodos analíticos	20
Linealidad de sistema	
Precisión de sistema	
Repetibilidad	
Reproducibilidad	
Estabilidad	
Recobro	
Capítulo II. Desarrollo Experimental	28
Instrumentación y material	
Reactivos	
Validación	31
Sistema	31
Condiciones óptimas de trabajo	
Linealidad de sistema	
Estabilidad de los estándares	
Método	34
Condiciones óptimas de trabajo	
Metodología propuesta	
Repetibilidad	
Muestra sintética con hidroxipropil metil celulosa	39
Tabletas comerciales de Cefadroxilo monohidratado	40

Recobro	40
Capítulo III . Resultados y Análisis de Resultados	41
Sistema	42
Linealidad de sistema	
Precisión de sistema	
Estabilidad de los estándares	
Método	50
Precisión de método	
Muestra sintética con hidroxipropil metil celulosa	
Tabletas comerciales (prueba de precisión de método)	
Recobro	54
Capítulo IV. Conclusiones	56
Capitulo V. Bibliografía	59
Anexo 1	61

INTRODUCCIÓN

Y

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

El cefadroxilo es un antibiótico derivado de las cefalosporinas de primera generación. Las cefalosporinas son química y farmacológicamente similares a las penicilinas, contienen un anillo β -lactámico y un anillo de dihidroxiacina y actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana causando lisis celular rápida, por lo que se utiliza de forma similar tanto para el tratamiento de infecciones de leves a moderadas (infecciones de vías urinarias, piel, tejidos blandos etc.) causadas por bacterias sensibles, tiene acción antimicrobiana, es principalmente bactericida y puede ser bacteriostático. Se administra por vía oral: cápsulas, tabletas y suspensiones. La concentración mínima para cocos grampositivos sensibles se encuentran en el intervalo entre 0.1 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$, para la mayoría de las bacterias gramnegativas sensibles, se requieren normalmente concentraciones de 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$ o más.

En la industria Farmacéutica en México la NOM-059-SSA1-1993 y la NOM-164-SSA1-1998 hacen referencia a la validación pues no hay una norma específica de validación. Estas normas plantean que los métodos se validan para asegurar que un procedimiento, técnica, instrumento, software, analista o método analítico hace apropiadamente para lo que fue diseñado cumpliendo los requerimientos de precisión, exactitud y otros parámetros estadísticos que se establezcan.

La química analítica instrumental es una herramienta muy utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos que se encuentran en muestras farmacéuticas, entre las técnicas de análisis instrumental una de las más utilizadas es la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una técnica que es utilizada para la cuantificación e identificación de sustancias químicas, esta técnica permite el análisis de cefadroxilo en tabletas.

La validación de un método analítico se lleva a cabo según los fines para los cuales se aplicará éste. En general los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son: condiciones óptimas de trabajo de la técnica a utilizar y del método, linealidad de sistema y método, precisión de sistema, repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad de la muestra, exactitud, etc.

Para el caso de esta investigación se determinarán los siguientes parámetros para validar el análisis por la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de cefadroxilo:

- 1) Condiciones del sistema cromatográfico.
- 2) Linealidad del sistema.
- 3) Precisión del sistema.
- 4) Estabilidad de los estándares.
- 5) Condiciones del método.
- 6) Repetibilidad.
- 7) Recobro.

OBJETIVOS

- ▲ Validar la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de cefadroxilo en tabletas.
- ▲ Para esta investigación se determinaron los siguientes parámetros estadísticos que permiten validar parte de la metodología para el análisis cuantitativo de cefadroxilo por la técnica de HPLC:
 - Condiciones del sistema cromatográfico.
 - Linealidad del sistema.
 - Precisión del sistema.
 - Estabilidad de los estándares.
 - Condiciones del método de extracción de cefadroxilo en tabletas.
 - Repetibilidad.
 - Recobro.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

CEFADROXILO ^{1,2}

El cefadroxilo monohidratado es un polvo cristalino que puede ir de color blanco a color hueso, es poco soluble en agua y prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo y éter, sensible a la luz. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{17}N_3O_5S \cdot H_2O$, el P.M. es de 381.4 g/mol.

El cefadroxilo es una cefalosporina de primera generación, un derivado del p-hidroxilado de la cefalexina y se utiliza en el tratamiento de las infecciones por gérmenes sensibles de leves a moderado. Aunque el cefadroxilo presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana similar al de la cefalexina, sin embargo muestra mejor absorción en el tracto gastrointestinal, y produce concentraciones plasmáticas más altas y duraderas que ésta.

Es un antibiótico beta lactámico, es bactericida y actúa similarmente a las bencilpenicilinas.

Su mecanismo de acción es inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, presentando mayor actividad en los cocos gram positivos y una actividad moderada a los bacilos gram negativos. Los cocos gram positivos sensibles son los estafilococos, tanto productores como no productores de penicilinasas y los estafilococos resistentes a la meticilina suelen ser resistentes, el cefadroxilo también tiene actividad contra algunas enterobacterias.

La concentración mínima inhibitoria está en el intervalo de 0.1 a 1 mg/mL, y para la mayoría de las bacterias gram negativas es de 1 a 16 mg/mL.

FARMACOCINÉTICA

Las dosis de 500 a 1,000 mg administradas por vía oral se ha reportado que se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente de 16 y 30 $\mu\text{g/mL}$ a las 1.5 y 2.0 horas respectivamente, pero aumenta cuando los pacientes presentan insuficiencia renal. Se distribuye ampliamente en tejidos y líquidos. Atraviesa la membrana plasmática y es eliminado por medio de la leche materna, aunque el 90% del cefadroxilo monohidratado es eliminado por orina en aproximadamente 24 horas por filtración glomerular y secreción tubular. Se han reportado concentraciones urinarias máximas de más de 1 mg/mL después de una dosis de 500 mg.

EFFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos más comunes que presenta el cefadroxilo son reacciones de hipersensibilidad como exantema cutáneo, urticaria, anafilaxia. Aunque una dosis excesiva puede producir necrosis tubular renal aguda, esto sucede principalmente si se utiliza en pacientes anciano o con disfunción renal preexistente, sucede también si se administra simultáneamente fármacos nefrotóxicos (aminoglucósidos), rara vez se puede presentar náuseas, vómito, como otros antibióticos de amplio espectro puede presentar colitis pseudomembranosa, esta última está asociada a las dosis altas por lo tanto sólo se recomienda administrar estas dosis cuando la infección es grave. Las presentaciones farmacéuticas que existen en el mercado con el principio activo cefadroxilo monohidratado son:

PRESENTACIÓN	DOSIS
Cápsulas: caja con 8 ó 16 cápsulas.	500 mg
Suspensión: frasco con polvo para 100 mL.	Dosificador de 125 mg/5 mL, 250 mg/5 mL y 500 mg/5 mL
Tabletas: caja con 10 tabletas.	1 g

Tabla No. 1. Formas Farmacéuticas comerciales de cefadroxilo monohidratado.

La necesidad de producir más antibióticos de amplio espectro es por la resistencia que ciertos microorganismos han desarrollado a los distintos tipos de penicilinas por tanto esto ha propiciado a realizar nuevas y mejores síntesis de nuevas moléculas más activas y efectivas para el tratamiento a las enfermedades infecciosas. Una de tantas opciones es la creación de las cefalosporinas las cuáles ocupan un papel muy importante similar al que tuvieron hace un tiempo las penicilina.

Los principales sitios en donde pueden interaccionar los antibióticos son:

- Pared bacteriana.
- Membrana bacteriana.
- Síntesis de proteínas.
- Síntesis de ácidos nucleicos.

El siguiente esquema es una estructura bacteriana que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, en donde se describe un breve resumen de los principales mecanismos de acción más comunes de los antimicrobianos que actúan a esos niveles.⁶

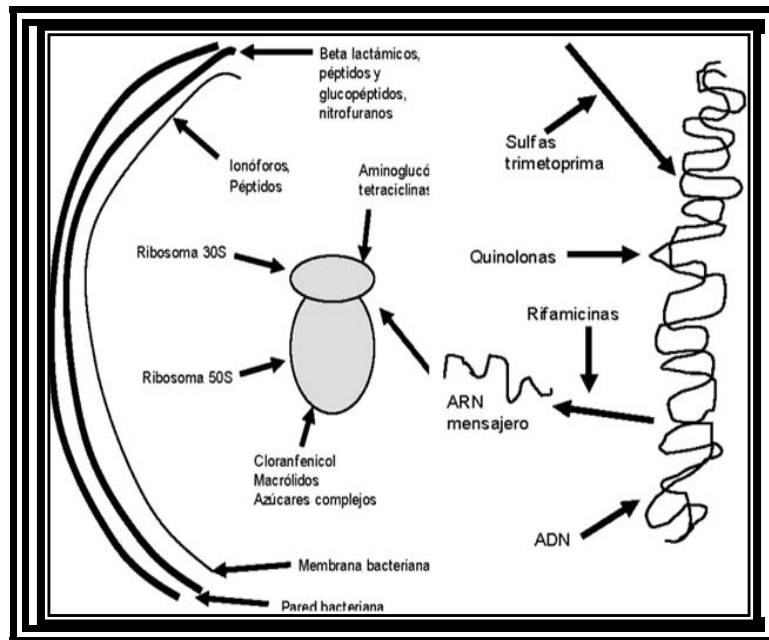


Figura No. 1. Estructura bacteriana representado los principales mecanismos de acción de los antimicrobianos que actúan a estos niveles.³

Grupo representativo en la molécula	Sustancia activa	Mecanismo de acción	Espectro
Beta lactámicos: Penicilinas	-Penicilina G -Penicilina V	Inhiben síntesis de pared	Bacterias G+
	Cloxacilina		Estafilococos productores de penicilinas
	Ampicilina		Bacterias G+ y G-
	Carbenicilina		P. aeruginosa
Beta lactámicos: Cefalosporinas	Cefaloridina		Bacterias G+ y G-
	<u>Cefadroxilo</u>		Bacterias G+ y G-
	Cefalexina		Bacterias G+ y G- , actividad frente a Estafilococos productores de penicilinas
	Cefuroxima		Bacterias G+ y G, con menos actividad frente a G+ y más frente a G-
	Moxalactam		Bacterias G+, Enterobacterias
	Ceftiofur		Bacterias G+, Enterobacterias
	Cefoperazona		Pseudomonas aeruginosa
	Cefepima		Estafilococos y enterobacterias
Beta lactámicos: Inhibidores de la Beta lactamasa	-Ácido clavul. -Sulbactam. -Tazobactam		Se une a la beta lactamasa inactivándola
Beta lactámicos: Carbapenems	Imipenem-cilastatina	Inhiben síntesis de pared	G+ y G- aerobios y anaerobios
Monobactams Aminoglucósidos	-Estreptomina. -Kanamicina -Neomicina -Gentamicina	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Bacterias G-
Rifamicinas	Rifampicina	Inhibe ARN polimerasa	Bacterias Gram positivas micobacterias
Péptidos	-Polimixina β Colistín	Desorganizan membrana	Pseudomonas aeruginosa

Tabla No. 2. Clasificación química de los principales antimicrobianos.³

Grupo representativo en la molécula	Sustancia activa	Mecanismo de acción	Espectro
Glucopéptidos	-Vancomicina -Teicoplanina -Avoparcina	Inhibe síntesis de pared	Bacterias G+ y G-
Estreptograminas	Virginamicina	Inhibe peptidil transferasa	Bacterias G+ aerobias y anaerobias
Macrólidos	-Eritromicina -Oleandomicina -Tilosina -Espiramicina -Tilmicosina	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G-
Fenicoles	-Cloranfenicol -Tianfenicol -Florfenicol	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G- rickettsias y chlamydias
Tetraciclinas	-Oxitetraciclina -Doxiciclina -Minociclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Bacterias G+ y G-, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
Sulfonamidas	-Sulfanilamida -Sulfadiazina -Sulfatiazol -Ftalilsulfatiazol	Interfieren síntesis de ácido fólico	Bacterias G+, G- y coccidios
Diaminopirimidina	-Trimetoprima -Baquiloprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias G+, G- aerobias
Fluoroquinolonas	-Enrofloxacina -Danofloxacina -Marbofloxacina	Inhiben ADN girasa	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Ionóforos	Monensina Salinomycin	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
Nitrofuranos	Nitrofurazona Furazolidona	Previenen traslación mensajero ARN	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
Nitroimidazoles	Metronidazol Dimetridazol	Disrupción del ADN	Anaerobios

Tabla No. 2 cont. Clasificación química de los principales antimicrobianos.³

Como se puede ver en la *tabla No. 2* existe una gran variedad de antimicrobianos, pues la creación tan variada de estos antimicrobianos se deriva por el desarrollo de múltiples enfermedades así como por la resistencia que crean dichos microorganismos.

Desde hace tiempo ha existido una gran variedad de compuestos químicos, (naturales como sintéticos y semisintéticos) capaces de impedir o disminuir el crecimiento de varios tipos de microorganismos. A éstos que tienen dicha actividad se les da el nombre de antibióticos.

A continuación se detalla un poco más sobre el mecanismo de acción y de resistencia de los antibióticos cefalosporínicos ya que el compuesto analizado en esta tesis pertenece a esta familia.

Los antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas, *figura 1*). Fueron los primeros antimicrobianos que se introdujeron para el tratamiento de infecciones comunes. Asimismo, son los antibióticos de mayor empleo y los más conocidos.

Actúan inhibiendo las enzimas D-alanil-D-alanincaroixipeptidasas (PBP's), proteínas que se unen a la penicilina responsables de la síntesis de la pared celular, provocando filamentación y lisis celular.

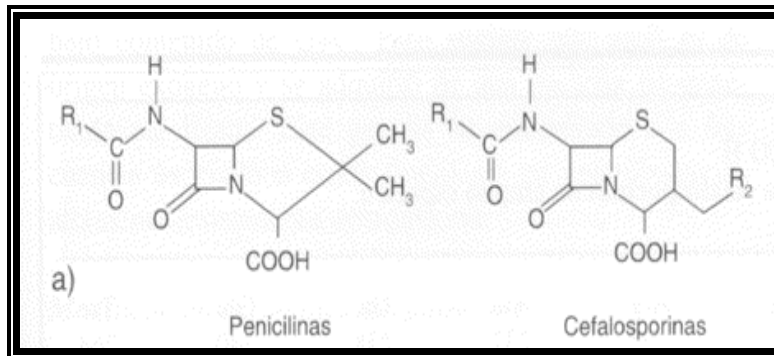


Figura No. 2. Estructura química representativa general de antibióticos β -lactámicos.³

RESISTENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS³

En la naturaleza se existen bacterias que son, por sí mismas resistentes a los antibióticos, y otras que pueden llegar ser resistentes debido a mutaciones en el ADN. Los mecanismos por los cuales las bacterias son resistentes a estas moléculas son:

- a) Inactivación del antibiótico.
- b) Por alteración del sitio blanco del antibiótico.
- c) Por disminución del transporte del antibiótico al interior de la célula.

Puede manifestarse un solo mecanismo para conferir resistencia a los diferentes antibióticos.

En el caso de los antibióticos β -lactámicos penicilínicos y cefalosporínicos se hacen resistentes por la hidrólisis del anillo β -lactámico, o por la alteración del blanco y por la permeabilidad (cambios en las proteínas de membrana externa).

La principal causa de resistencia es por la inactivación de la molécula, donde las enzimas responsables de dicha resistencia a estos antibióticos son las β -lactamasas (*figura 2*) las cuáles hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico, produciendo derivados ácidos, perdiendo así las propiedades antibacterianas.

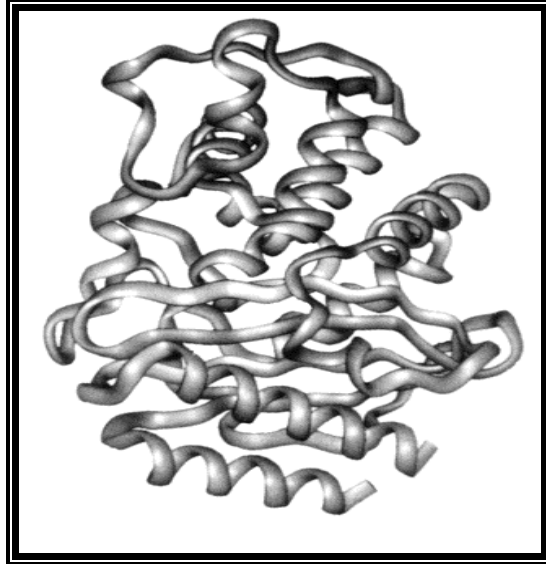


Figura No. 3. Estructura química de la enzima β -lactamas.³

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

ORIGEN DE LA CROMATOGRAFÍA^{4,5}

Originalmente la Cromatografía se definía como una técnica física de separación de compuestos presentes en una mezcla, se le llama así, gracias al británico-ruso “Tswett”, quién en 1903 por primera vez extrajo varios pigmentos de plantas, por esta razón que se le da el nombre de Cromatografía, croma que significa color y grafía escritura, (escritura del color).

Conforme esta técnica fue evolucionando se le han dado diferentes aplicaciones y formas de uso, en la actualidad existen distintos tipos de cromatografía tanto instrumentales como no instrumentales, y aún siguiendo su principal fundamento de separar ahora se pueden identificar y cuantificar los compuestos que se separaron de la mezcla original de manera continua a la separación.

DIFERENTES TIPOS DE CROMATOGRAFÍA^{4,5,6}

Existen diversas técnicas cromatográficas en donde el fundamento primordial del proceso de separación depende de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias a separar (peso molecular, carga eléctrica, grado de ionización, solubilidad, adsorptividad, volatilidad, polaridad etc.). El objetivo primordial de estas técnicas analíticas es alcanzar la selectividad en las detecciones cualitativas y determinaciones cuantitativas.

A continuación se mencionan los diferentes tipos de cromatografía más utilizadas dependiendo de la fase móvil que se utiliza:

Cromatografía de Gases (CG): Consiste en tener una fase móvil que es un gas (generalmente nitrógeno, helio o hidrógeno) el cual acarrea a los componentes de la muestra por el sistema cromatográfico, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Una característica fundamental de los compuestos que pretenden analizar por CG es que sean volátiles.

Cromatografía de Líquidos (CL): Consiste en tener una fase móvil que es un líquido (disolvente sólo o mezcla de éstos) mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido, los compuestos que se introducen al sistema se repartirán entre las 2 fases y dependiendo de las diferencias entre las constantes de equilibrio los compuestos se irán separando en el sistema.

Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFSc's): Se refiere cuando los líquidos de la fase móvil se calientan por arriba de su temperatura crítica y dado a que la densidad aumenta entonces habrá mayor capacidad para disolver las moléculas y así poder ser analizadas por HLPC y por GC. El fluido que comúnmente se utiliza como fase móvil es el dióxido de carbono pues es excelente disolvente para moléculas no polares.

También se tiene una clasificación de las técnicas cromatográficas dependiendo del tipo de fase estacionaria que se utiliza:

Cromatografía Líquido-Líquido (CLL): La fase estacionaria es un líquido que está adsorbido en sílica o alúmina y la fase móvil es un líquido, por consiguiente la retención del analito dependerá

de la solubilidad que tenga en ambas fases. La constante que se maneja es llamada constante de reparto.

Cromatografía Líquido-Sólido (CLS): Es cuando la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil es un líquido, este tipo de cromatografía consiste en que la fase móvil y el analito compiten por los sitios activos de la fase estacionaria. La constante que se maneja es llamada constante de adsorción.

Cromatografía de fases químicamente unidas (CFQU): Consiste en unir químicamente a la fase estacionaria a un soporte (alúmina, sílica, etc.), la fase estacionaria químicamente unida puede ser de grupos de naturaleza polar (-NH₂, -CN, etc.) o de naturaleza no polar (-C₈H₁₇, -C₁₈H₃₇, -C₆H₅, etc.).

Dependiendo del tipo de fase estacionaria que se utilice se puede clasificar en:

Cromatografía de Fase Normal: Cuando la fase estacionaria es de naturaleza polar y la fase móvil es de naturaleza no polar.

Cromatografía de Fase Inversa: Cuando la fase estacionaria es de naturaleza no polar y la fase móvil es de naturaleza polar.

Cromatografía de intercambio iónico (CII): Es cuando la fase estacionaria es una resina intercambiadora de iones y la fase móvil es un líquido con cierta concentración de iones, ya que su mecanismo consiste en que los iones de la fase móvil y el analito compiten por los sitios activos de la fase estacionaria. Al aumentar los iones de la fase móvil el analito se retendrá menos, ya que los iones de la fase móvil predominarán en los sitios activos de la fase estacionaria y viceversa. La constante que se maneja es llamada constante de intercambio iónico.

Cromatografía de pares de iones (CPI): Consiste en que la fase móvil contiene compuestos con una carga distinta a la del analito (conocidos como contraión) para formar una molécula neutra la cuál podrá unirse químicamente a la fase estacionaria. Esta técnica se utiliza cuando por cromatografía de intercambio iónico no hay buena resolución entre los picos. La constante de equilibrio que se emplea es una combinación entre la constante químicamente unida y la constante de intercambio iónico.

Cromatografía por exclusión (CE): También conocida como cromatografía de permeación o filtración, la separación es totalmente física ya que el analito no interacciona con la fase estacionaria por medio de un equilibrio fisicoquímico. Esta técnica consiste en rellenar la columna de un gel en donde los poros son de tamaño similar al de las moléculas a separar y así podrán penetrar en los poros y ser retenidas, mientras que las moléculas grandes eluyen más rápido de la columna ya que no serán retenidas.

Cromatografía de afinidad (CA): Consiste en la unión de un ligando en el soporte de la fase estacionaria en donde se unirán covalentemente las moléculas específicas a este ligando, mientras que las moléculas que no se unieron serán eluidas por la fase móvil. Para eluir a las moléculas que fueron retenidas se modifican las condiciones de la fase móvil para así alterar las características de los sitios activos.

En este trabajo se utilizó sólo una de las técnicas mencionadas de la cual, se dará una explicación mayor de sus características.

INSTRUMENTACIÓN^{4, 5, 6}

Esta técnica cromatográfica es muy empleada tanto en la industria farmacéutica como alimentaria.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) ó también conocida como cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en su clasificación en español, en inglés es conocida como “High Performance Liquid Chromatographic” (HPLC por sus siglas en inglés).

Esta se define como una técnica física o fisicoquímica que se emplea para separar, cuantificar e identificar analitos presentes en una muestra problema.

Básicamente está conformada por una fase móvil y una estacionaria, en donde la fase móvil fluye a través de todo el relleno de la columna, arrastrando con ella los analitos presentes en la muestra y que serán retenidos en la fase estacionaria de acuerdo a sus propiedades químicas. Gracias a que el flujo de la fase móvil se mantiene constante durante el proceso los analitos pueden ser eluidos de la columna como un componente único y puro.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia está constituida por instrumentación muy específica:



Figura No. 4. Sistemas que conforman a un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia.⁹

Fase móvil: Los disolventes empleados como fase móvil en esta técnica deben ser de alta pureza, inertes, presentar baja viscosidad, no tóxicos, ser compatibles con el detector, económicos. Los recipientes para la fase móvil comúnmente son de vidrio o acero inoxidable.

La fase móvil debe ser filtrada con filtros de membrana o con un tamaño de poro de 0.45 µm o menor, esto se hace como una medida de prevención para evitar que se bloqueen o tapen las tuberías o los filtros del equipo.

Otra medida de precaución es desgasificar la fase móvil para eliminar el aire (O₂ y N₂) ya que se pueden formar burbujas y por consiguiente se puede causar problemas en el sistema de bombeo, la columna y el detector. La desgasificación puede realizarse de 3 maneras:

- ❖ Manual, que se realiza filtrando con equipo Millipore, agitando con una barra magnética o con ultrasonido.
- ❖ Burbujeando un gas inerte (He) el cuál desplaza al aire presente en la fase móvil.
- ❖ Por medio de la permeación del aire a través de una membrana de teflón.

La elución de la fase móvil en el sistema puede ser de forma isocrática la cuál consiste en que la fase móvil mantiene su poder de elución constante durante el análisis de la muestra, desde el punto de vista práctico la fase móvil se mantiene constante; mientras que la elución con

gradiente consiste en variar el poder de elución durante el análisis de la muestra (que va siempre de menor a mayor), es decir la composición de la fase móvil va cambiando durante el análisis, este último tipo de elución sólo se puede hacer en equipos que tengan un mezclador incluido.

En el modo de fase inversa al aumentar el porcentaje del disolvente menos polar y disminuir el disolvente más polar el poder de elución aumenta, mientras que en fase normal para que aumente el poder de elución por gradiente es necesario aumentar el porcentaje del disolvente más polar y disminuir el disolvente menos polar.



Figura No. 5. Manager Smart Line 5000 que incluye un desgasificador y mezclador de disolventes el cuál modifica la composición de la fase móvil.

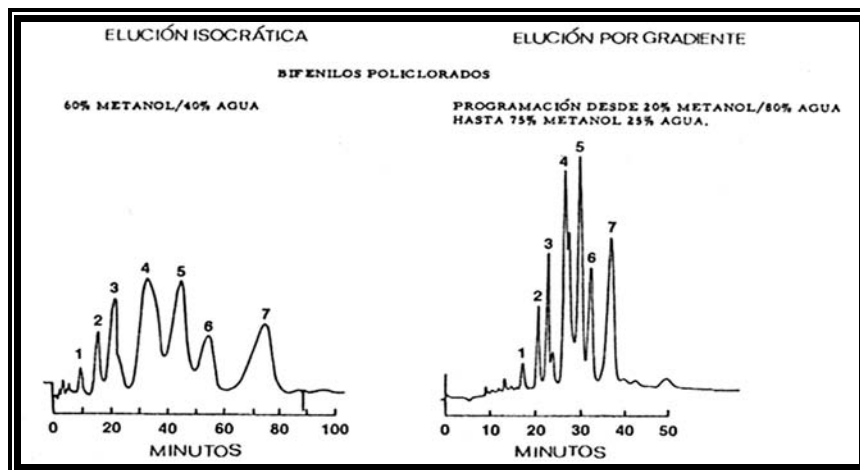


Figura No. 6. Ejemplificación de elución isocrática y elución por gradiente.⁴

Sistema de bombeo: Se encarga de mover a la fase móvil al sistema cromatográfico. Sus principales características es que deben reproducir flujos constantes y no pulsantes, tener la capacidad de vencer presiones altas (presiones superiores a 6,000 psi), el material del que están fabricadas debe ser inerte (de acero inoxidable ó teflón y para muestras biológicas se recomienda que sean de titanio) ya que deben ser resistentes a la corrosión por los disolventes que se emplean.

Existen dos tipos de bombas empleadas en CLAE, las mecánicas y las neumáticas. Las primeras son las conocidas como bombas de pistón recíprocante y las de tornillo.

Las más comunes y que más se utilizan en los equipos son las de pistón recíprocante, como éste es el tipo de bomba que maneja el cromatógrafo que se utilizó en este trabajo se dará una explicación de sus características. Su funcionamiento es mediante el movimiento de un pistón a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, esto hace que se llene y se vacíe de fase móvil la cabeza de la bomba, de modo alternativo. Las ventajas de este tipo de bombas es el control del caudal y presión, el suministro constante de la fase móvil, fácil cambio de disolvente, compatibilidad con sistemas de gradiente de elución y el mantenimiento es simple. Las principales desventajas es que el flujo se obtiene en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme, pero estas pulsaciones son corregidas mediante el movimiento recíprocante de la bomba y un sistema amortiguador.

Todos los cromatógrafos de líquidos tienen un sistema medidor de presión para evitar sobrepresiones que podrían dañar el instrumento. Los manómetros utilizados son generalmente de tipo Bourdon para medir la presión a la cuál está trabajando la bomba, otra ventaja es que estos manómetros ayudan a amortiguar las pulsaciones que se generan durante el análisis.



Figura No. 7. Bomba Smartline 1000 Knauer y cabezales de los pistones de la bomba.

Sistema de inyección: Este sistema consiste en recibir la muestra para posteriormente introducirlo y transportarlo dentro del sistema cromatográfico pasando por la columna donde se llevará a cabo la separación.

Las válvulas de inyección o rotatorias son las más usuales en los equipos modernos de HPLC y se basan en el funcionamiento de una válvula de seis pasos (dos de entrada, dos de salida y dos conectadas entre sí mediante un bucle (“loop” en inglés) de un volumen dado). Esta válvula se coloca en posición de llenado o carga, la muestra es introducida mediante una jeringa y depositada en el bucle o tubería de un volumen fijo (del orden de μL), y al colocar la válvula en posición de inyección, la fase móvil pasa a través del bucle que contiene a la muestra y por consiguiente es arrastrada por la fase móvil hacia el sistema de separación (columna analítica). Las ventajas que presenta una válvula de inyección son: el asegurar el volumen inyectado a través del bucle, no alterar el flujo de la fase móvil y que puede operar a alta presión.

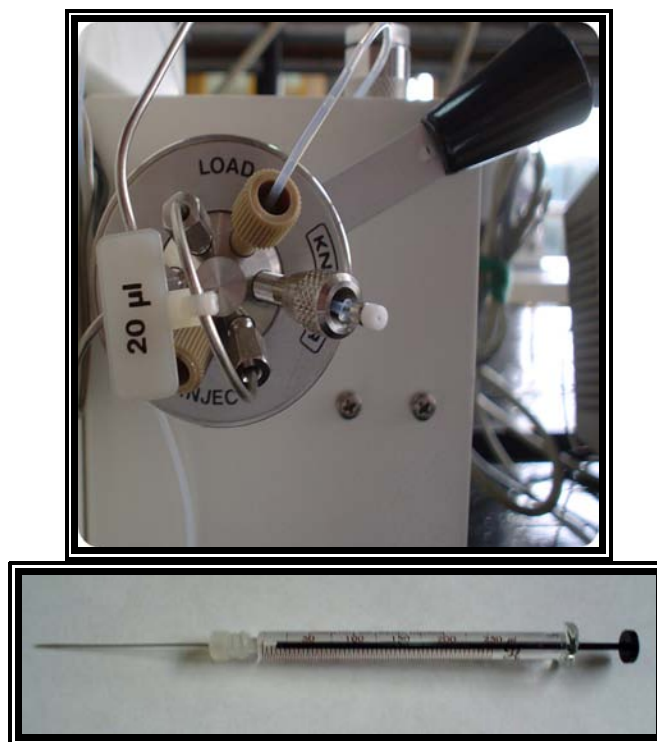


Figura No. 8. Válvula de inyección manual y jeringa de 250 µl.

Sistema de separación: Es la parte esencial de la cromatografía de líquidos, ya que aquí es donde se lleva a cabo el mecanismo de separación de los compuestos que constituyen a la muestra y por consiguiente la identificación y cuantificación de o los analitos presentes.

Este sistema consiste de un tubo de material inerte (normalmente acero inoxidable), capaz de resistir presiones altas, diámetro uniforme con las paredes internas pulidas, dicho tubo contiene la fase estacionaria. En la actualidad las dimensiones más comunes generalmente van de 2 a 8 mm de diámetro interno y de 100 a 250 mm de longitud, tamaños de partícula entre 3 y 5 µm y tamaños de poro entre 100 y 300 Å.

Uno de los tipos de fase estacionaria más utilizada en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia son las fases estacionarias químicamente unidas, que tiene las ventajas de la estabilidad térmica y la resistencia a la hidrólisis, y como desventajas que la cantidad de muestra es pequeña (menor a 1 mg). Las fases químicamente unidas más empleadas son las que contienen un grupo octadecil, octil, nitrilo, fenil, amino (utilizadas en fase inversa) y las fases con grupos CN (utilizadas en fase normal) siendo la cromatografía en modo de fase inversa la de mayor aplicación.



Figura No. 9. Columna de HPLC C₁₈ de 50 mm de long. x 4.6 mm de d.i., 5 µm de tamaño de partícula y 100 Å de porosidad, de marca Luna con guarda columna.

Sistema de detección: Una vez que los compuestos han recorrido las partes antes mencionadas, éstos tienen que ser percibidos, y esto se logra mediante un detector. Un detector es un aparato que se encarga de percibir los componentes presentes en una muestra, por lo que debe de generar un fenómeno físico y convertirlo en algo manejable (propiedad eléctrica) teniendo que realizar esto a través de la fase móvil sin que ésta se detenga.

En la actualidad existen diferentes tipos de detectores para la técnica de CLAE, en general éstos cumplen requisitos como ser altamente sensibles, estables en las lecturas, respuesta universal o selectiva, que dicha señal generada por el detector sea lineal en un intervalo de concentración, etc.

Los detectores empleados en CLAE se pueden clasificar en dos tipos según la propiedad analítica que miden, detectores Espectroscópicos y detectores Electroquímicos.

- ❖ Detectores Espectroscópicos: Espectrofotómetro de UV- Visible, Espectrofotómetro de índice de refracción, Espectrofotómetro de fluorescencia y Espectrómetro de masas.
- ❖ Detectores Electroquímicos: Conductimétrico, Amperométrico, Voltamperométrico y Coulombimétrico.

A continuación se menciona el detector más utilizado en CLAE, el de UV-Visible ya que es el utilizado por el cromatógrafo manejado en este trabajo:

Se basa en la absorción de la radiación electromagnética en la región del ultravioleta cercano y el visible por parte de los analitos presentes en la muestra. Este tipo de detector se considera selectivo ya que solo se detectan los compuestos que absorben a la longitud de onda que opera el detector. Los compuestos orgánicos que absorben radiación ultravioleta son aquellos que presentan dobles ligaduras conjugadas o sistemas aromáticos en su estructura.

Los tipos de detectores de U.V-Vis que se venden en el mercado actualmente son:

- ❖ **De longitud de onda fija:** Es el detector más sencillo, más económico, trabaja sólo a una longitud de onda dada por un filtro, que puede ser de 254, 275 y 284 nm.
- ❖ **De longitud de onda variable:** Es el detector más utilizado. Se puede seleccionar la longitud de onda máxima de absorción del compuesto que se va a analizar ya que este contiene un sistema monocromático que permite variar la longitud de onda.
- ❖ **De Arreglo de Diodos:** Permite hacer lecturas múltiples a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo que el compuesto está pasando a través de la celda del detector ya que un haz de radiación policromática atraviesa la celda y es dispersada posteriormente a un conjunto de diodos que recibe el haz fraccionado y esto permite registrar la totalidad del espectro UV-Visible.



Figura No. 10. Detector Knaauer Smartline UV 2500 de longitud de onda variable.

Sistema de registro: El sistema de registro tiene como función en recibir la señal generada por los componentes eluidos de la columna y que son percibidos por el detector, dicha señal es representada gráficamente ya sea por un integrador o una computadora. La gráfica que se obtiene recibe el nombre de “Cromatograma”. La información que proporciona directamente un cromatograma son el tiempo de retención (t_r), tiempo muerto (t_0), área del pico (A), ancho del pico (W_0), ancho a la mitad de la altura del pico ($W_{1/2h}$), a partir de esta información se pueden determinar los parámetros cromatográficos conocidos como Eficiencia (N o H), Factor de capacidad (k'), Selectividad (α) y Resolución (R_s); que sirven para asegurar una adecuada separación de los compuestos presentes en las muestras de guía en la cuantificación e identificación de un compuesto.

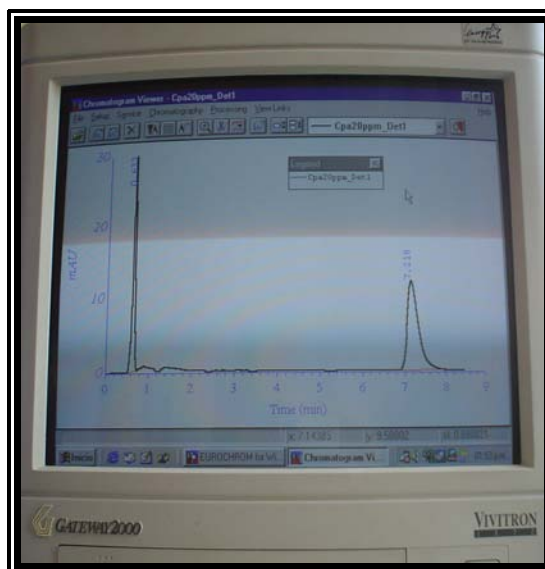
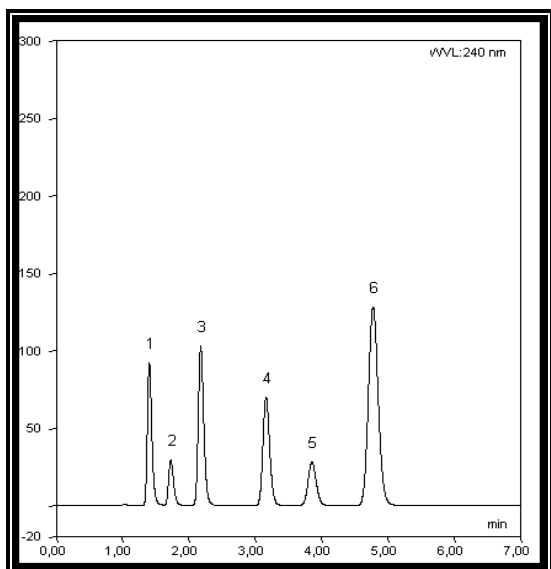


Figura No. 11. Sistema de registro (Computadora) y representación gráfica de un Cromatograma.

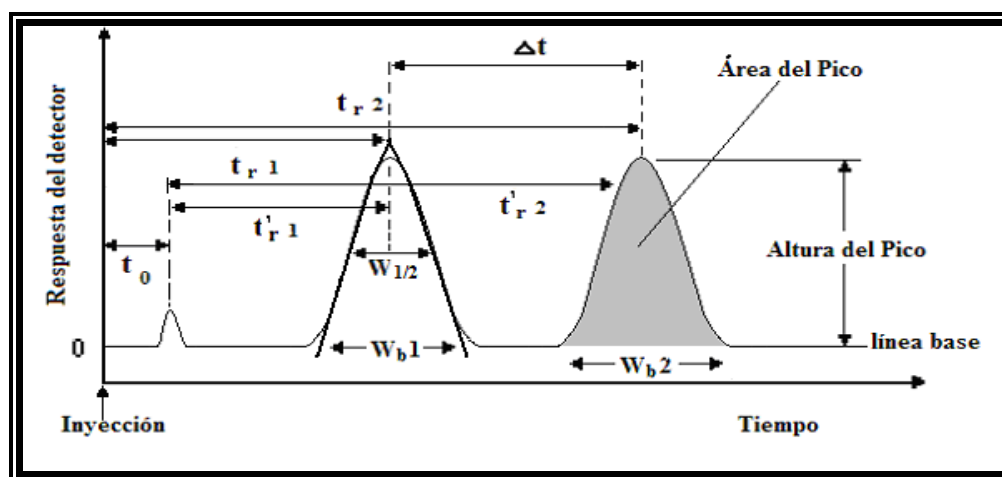


Figura No. 12. Parámetros cromatográficos que proporciona un cromatograma.⁹

El análisis cualitativo en cromatografía se basa en utilizar los tiempos de retención de los picos que se obtienen en los cromatogramas y el análisis cuantitativo basado en las áreas o alturas de éstos.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS^{7,8}

El validar un método analítico consiste en realizar y analizar una serie de pruebas al sistema (técnicas) o metodologías que se emplean durante el proceso de análisis en las distintas etapas de producción y producto terminado. Validación es evidenciar la documentación de las pruebas que se están realizando y que dichas pruebas cumplan con los parámetros farmacopéicos que permitan cuantificar al compuesto de interés de una manera precisa, exacta y específica. Por consiguiente es necesario que la industria farmacéutica cuente con metodologías farmacopéicas o en su defecto con metodologías internas de laboratorio, si fuera el caso que no se tuvieran las primeras. Para validar cualquiera de ellas se requiere primeramente validar al sistema y posteriormente a la metodología, ya que así se asegura que los resultados que se obtengan al validar la metodología son reales y confiables, por consiguiente confiar en los resultados que se obtienen al analizar alguna materia prima o producto, como es el caso de la pureza, concentración, potencia, disponibilidad, etc. De esta manera se puede saber si dichas pruebas cumplen con los aspectos normativos oficiales.

Lo reportado en el área de Control de Calidad es la aprobación o retención del producto terminado. La validación de los métodos analíticos proporciona seguridad, confiabilidad al producto y a la empresa, pues de lo contrario, se puede poner en riesgo tanto la vida del paciente como la integridad de la empresa.

Algunas de las pruebas mínimas necesarias para el proceso de validación de un método analítico son:

- Condiciones óptimas de trabajo.
- Linealidad del sistema y del método.
- Precisión del sistema.
- Precisión de método (Repetibilidad, Reproducibilidad).
- Exactitud de sistema.
- Límite de detección y cuantificación.
- Recobro.
- Estabilidad de la muestra.
- Tolerancia del sistema.
- Etc.

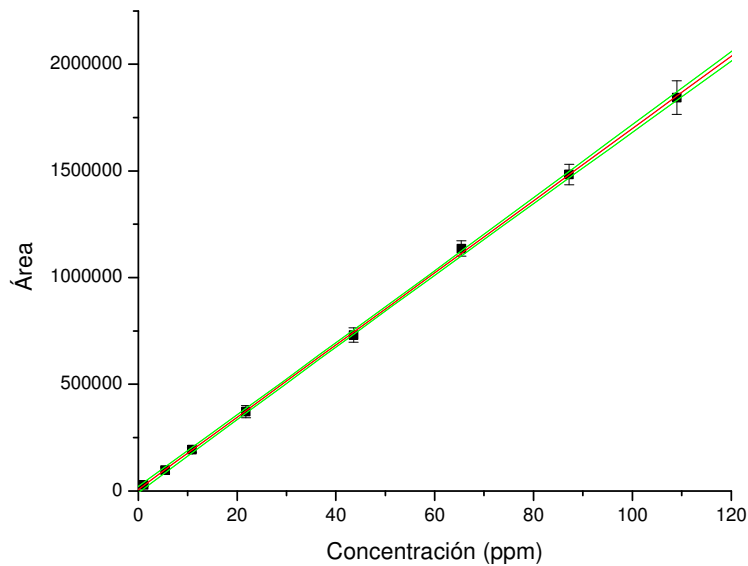
Para este trabajo de tesis se realizaron sólo aquellas pruebas subrayadas, por lo tanto se da una descripción de cada una de estas pruebas a continuación.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO^{10, 11, 12}

Para realizar la validación ya sea del sistema o la metodología es necesario encontrar primero en cualquiera de ellas las condiciones óptimas de trabajo, lo cual implica hacer una investigación bibliográfica de las características generales del analito, diferentes pruebas que nos permita conocer las mejores condiciones para la preparación de estándares, la muestra, estabilidad de la muestra, extracciones, etc.. Partiendo de esta información se realizarán los ajustes de las condiciones de trabajo en los instrumentos, en las extracciones, limpieza, etc., permitiendo como finalidad de obtener los mejores resultados tanto en los análisis cualitativos, cuantitativos, tiempos de análisis cortos, etc..

LINEALIDAD DEL SISTEMA^{7,8}

Se define como la proporcionalidad lineal de la señal obtenida por una técnica instrumental con respecto a la concentración del analito, es decir, demostrar que el sistema origina una respuesta lineal dentro de un intervalo de concentración del analito, para la industria farmacéutica el punto central (centroide) de la curva de calibración debe representar el 100% de la concentración del analito que este presente en la muestra por analizar, lo anterior se comprueba obteniendo el gráfico correspondiente.



En esta gráfica de la respuesta analítica obtenida contra la concentración de los estándares, se debe observar una tendencia lineal, y al realizar la regresión lineal a los datos se espera que el coeficiente de correlación (r o r^2) sea mayor a 0.98 (es la que normalmente plantea la industria farmacéutica).

Si se cumple lo anterior entonces se procede a estudiar si esta tiende o no al origen, lo anterior se hace realizando una prueba de hipótesis a la ordenada al origen, con el objetivo de concluir si se aplican las ecuaciones lineales base de las técnicas instrumentales que normalmente indican una ordenada al origen igual a 0 ($A=FrC$ para el caso de CLAE), o si se usará la ecuación de una línea recta $y=mx+b$ y por lo tanto se tomará en cuenta la ordenada al origen en el cálculo.

La prueba de hipótesis que se aplica para este estudio es:

(Hipótesis nula) $H_0: b=\beta$ donde $\beta=0$

(Hipótesis alterna) $H_1: b\neq\beta$

Se aplica la prueba estadística “t de student”, para esto se realiza el análisis de los datos para obtener una “t” calculada o experimental:

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}}$$

donde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta=0$).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{x} = Media.

El cálculo del error típico de estimación se realiza de la siguiente manera:

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}}$$

donde:

$$Sxx = n \sum_{t=1}^n X_t^2 - \left(\sum_{t=1}^n X_t \right)^2$$

$$Syy = n \sum_{t=1}^n Y_t^2 - \left(\sum_{t=1}^n Y_t \right)^2$$

$$Sxy = n \sum_{t=1}^n X_t Y_t - \left(\sum_{t=1}^n X_t \right) \left(\sum_{t=1}^n Y_t \right)$$

La $t_{cal.}$ se comparará con la “t” de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) y con n-2 grados de libertad, y tomando en cuenta que es una prueba de dos colas.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

$$t_{calc.} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{calc.} > t_{\alpha/2}$$

En caso de que el sistema sea lineal se puede calcular también el intervalo de confianza para la ordenada y la pendiente con el mismo nivel de significancia mencionado anteriormente, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{\text{Ordenada}}{nSxx} + \frac{(n\bar{X})^2}{nSxx}}$$

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{\text{Pendiente}}{Sxx}}$$

PRECISIÓN^{7,8}

Es el grado de concordancia entre los valores obtenidos individuales que provienen de una misma población (disolución o muestra). Esta prueba aplica tanto para precisión de sistema como para precisión de método, para esta última según el procedimiento de cómo se realice el estudio se conoce como repetibilidad y reproducibilidad.

PRECISIÓN DE SISTEMA

Esta prueba da la información de que el sistema analítico (o técnica analítica) tiene la capacidad de detectar siempre al analito con una variación mínima en todas las mediciones. Para esta prueba el mismo analista es quien debe preparar las soluciones y realizar las mediciones bajo las mismas condiciones de trabajo. Para este estudio se buscará que el coeficiente de variación no sea mayor al 5%, aunque para la industria farmacéutica para una técnica cromatográfica no debe ser mayor al 2%.

La prueba de hipótesis que se aplica para este estudio es:

$$\begin{aligned} H_0: s^2 &= \sigma_0^2 \\ H_1: s^2 &> \sigma_0^2 \end{aligned}$$

Debido a que las muestras son aleatorias y provenientes de una misma población normal, el parámetro estadístico de comparación que se utiliza es la χ^2 , por lo que se realiza el análisis de los datos para obtener una χ^2 calculada o experimental:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n - 1) s^2}{\sigma_o^2}$$

donde:

n = Número de determinaciones.

s^2 = Varianza estándar muestral.

σ_0^2 = Varianza estándar máxima aceptada.

La χ^2 calculada se comparará con la χ^2 de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) y con n-1 grados de libertad.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{0.05}^2$$

Hay que dejar claro que la conclusión que llevará la realización de esta prueba es que en caso de aceptarse la hipótesis nula la técnica instrumental de medición (en este trabajo el cromatógrafo de líquidos) se mantiene estable y los valores que reporta para una misma población se encuentran en el intervalo de error establecido para sus mediciones por la instancia administrativa respectiva.

Posteriormente se puede realizar el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar s:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}$$

y tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para s:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}}$$

REPETIBILIDAD ^{7,8}

Es el grado de concordancia entre las mediciones independientes que se efectúan cuando se aplica el método analítico desarrollado a las muestras por el mismo analista y utilizando la misma instrumentación. La prueba de hipótesis así como el procedimiento estadístico a seguir es el mismo que se explicó para precisión del sistema. Pero en este caso se trabajan muestras reales o sintéticas aplicándoles la metodología desarrollada, es decir, esta prueba incluye las diferentes técnicas de preparación de muestra, instrumentales, etc. La conclusión a diferencia de la de precisión del sistema será la indicación en caso de aprobar la hipótesis nula que la metodología aplicada o desarrollada cumple o se encuentra abajo del error planteado por las instancias administradoras que lo hayan establecido, o en caso contrario al rechazarse la hipótesis nula que está arriba de ese error planteado.

REPRODUCIBILIDAD

Es el grado de concordancia entre las mediciones independientes realizadas por la metodología analítica establecida pero en la que se realizan variaciones con respecto a las condiciones originales planteadas en la prueba de repetibilidad y que pueden ser: diferentes analistas, instrumento, etc..

Aunque en este trabajo no se realizó esta prueba se explicará el proceso estadístico que se aplicaría en caso de haberse realizado, y considerando que la variación sería el cambio de analista.

La reproducibilidad del método se determina realizando dos etapas en el estudio estadístico el primero es realizar una prueba de hipótesis a las varianzas obtenidas por la metodología aplicada con la variación respectiva y posteriormente una prueba de hipótesis a las medias obtenidas con la variación respectiva.

Para la prueba de hipótesis sobre las varianzas se plantea que:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de poblaciones iguales, para la comparación de varianzas se utiliza el estadístico F de Fisher o Snedecor, por lo que se realiza el análisis de los datos para obtener la F experimental o calculada con la siguiente ecuación:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

donde:

s_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad.

s_2^2 = es la varianza muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad.

La F calculada se comparará con la F de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) y con grados de libertad n_M-1 , n_m-1 , y tomando en cuenta que es una prueba de dos colas.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

$$F_{cal.} > F_{\alpha/2}$$

Dependiendo del resultado obtenido sobre las varianzas se procede a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias la cual cambiará las ecuaciones que se utilizan para realizar los cálculos experimentales y grados de libertad en la prueba estadística “t de student” que se aplica, para ello la prueba de hipótesis que se establece es:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Si en la prueba de las varianzas se demuestre que las varianzas son semejantes, la ecuación que se utiliza para procesar los datos y obtener la “t” calculada o experimental es:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

y los grados de libertad se calculan como $(n_1 + n_2) - 2$.

En caso de que en la prueba de las varianzas se demuestre que las varianzas no son semejantes, la ecuación que se utiliza para procesar los datos y obtener la “t” calculada o experimental es:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

y los grados de libertad se calculan con la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

En cualquiera de los 2 casos, para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

$$-t_{\text{cal.}} < t_{\alpha/2} \text{ O } t_{\text{cal.}} > t_{\alpha/2}$$

En el caso de que al realizar esta prueba se acepte la hipótesis nula de las medias y por lo tanto se acepte que los datos pertenecen a la misma población sabremos que el método es reproducible a pesar del cambio que se le haya realizado a la metodología, lo que dice que el método es confiable a pesar del cambio. En el caso de rechazarse la hipótesis nula indicará que el cambio que se haya efectuado a la metodología si causa variaciones importantes en la obtención de los datos y que deberá optimizarse éste si se desea que el método sea reproducible.

ESTABILIDAD ^{7, 8}

Esta prueba se efectúa con la finalidad de ver el comportamiento del analito cuando éste es guardado o almacenado ya sea puro o en disolución, interesa conocer si la molécula sufre alguna variación en su estructura conforme pasa el tiempo. Esto permite establecer las condiciones y el tiempo mínimo o máximo para almacenar los estándares y/o muestras.

La prueba de hipótesis así como el procedimiento estadístico a seguir es el mismo que se explicó para precisión del sistema

Para la prueba de estabilidad la prueba de hipótesis así como el procedimiento estadístico a seguir es el mismo que se explicó para la prueba de reproducibilidad, nada más que en este caso al confirmar que los datos provienen de la misma población la prueba indicará que las muestras se mantienen estables a las condiciones de almacenamiento establecidas, en caso de no pasar la prueba se concluirá que no se mantienen estables a dichas condiciones de almacenamiento.

RECOBRO

Este proceso se realiza ya sea fabricando una muestra sintética lo más parecida a la muestra que se va a trabajar en la que se le adicionaron cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará la metodología desarrollada, esto se realiza normalmente en la industria maquiladora (como la farmacéutica) ya que se cuenta con todos los compuestos que se utilizan para fabricar a la muestra, siendo ésta la que se realizó en este trabajo.

El recobro es el resultado expresado en porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar con el método una muestra a la cual se le adiciona una concentración conocida del analito. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación.

$$R = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{experimental}}}{[\text{Concentración}]_{\text{teórica}}} \times 100$$

En el caso de muestras con matrices complejas en las que no se puede realizar una muestra sintética se realiza por medio de lo conocido como “adición a la muestra”, en la cual a una muestra que ya fue analizada con la metodología se le adicionan cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y que se utiliza en aquellas muestras en que no se puede fabricar a la muestra como las muestras de tipo biológico, ambientales, etc.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

Antes de proceder a explicar las condiciones de trabajo realizadas para las diferentes pruebas de validación se describen los aparatos, instrumentos, reactivos, etc., que se utilizaron para realizar el mismo.

MATERIAL

- Vasos de precipitados de 10, 20, 50 y 100 mL.
- Matraces aforados de 250 mL Pyrex, con volumen nominal de 250 mL.
- Matraces aforados de 2 mL Blaubrand, con volumen nominal de 2 mL, valor medio 2,0036 mL, tolerancia $\pm 0,0250$ mL, certificado ISO 1042, No. de lote 03,03.
- Matraces aforados de 10 mL Blaubrand, con volumen nominal de 10 mL, valor medio 10,0054 mL, tolerancia $\pm 0,0400$ mL, certificado ISO 1042, No. de lote 03,04.
- Matraces aforados de 25 mL Blaubrand, con volumen nominal de 25 mL, valor medio 25,0075 mL, tolerancia $\pm 0,0400$ mL, certificado ISO 1042, No. de lote 03,03.
- Micropipetas de desplazamiento de aire:
 - ❖ 1-10 μ L marca Hamilton Soft-Grip con certificado ISO 9001.
 - ❖ 10-100 μ L marca Hamilton Soft-Grip con certificado ISO 9001.
 - ❖ 100-1000 μ L Hamilton Soft-Grip con certificado ISO 9001.
- Filtros desechables de nylon. J. T. Baker con porosidad de 0.45 μ m, 25 mm de diámetro. Lote V50420.
- Jeringa de 10 mL con punta Luer para usar con acrodiscos.
- Embudo de filtración por gravedad.
- Papel filtro desechable.

APARATOS

- Balanza analítica modelo Sartorius BL-120 S, peso máximo 120 g, incertidumbre 0.1 mg.
- Parrilla de calentamiento con agitación marca Barnstead/thermolyne, Modelo SP46615.

EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca “Knauer”, que permite trabajar en forma isocrática, y que cuenta con:
 - ❖ Sistema de Bombeo modelo Smartline Pump 1000 V7603 10/2003.
 - ❖ Válvula de inyección Wellchrom 6-port/3 channel con un “loop” que permite inyectar 20 μ L de muestra.
 - ❖ Columna empacada con fase estacionaria químicamente unida Luna C₁₈ de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μ m con poros de 100 Å.

REACTIVOS

- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC.
- Agua ASTM tipo I.
- Ácido acético glacial, grado RA.

MUESTRAS

Para la validación del sistema:

- Estándar secundario de cefadroxilo monohidratado
 - ◆ No. de Lote: 3334035
 - ◆ Proveedor: Fersinsa G.B
 - ◆ No. de estandarización: STD-021-04
 - ◆ % Base Húmeda: 94.57

Para la validación de la metodología:

- Tabletas de Cefadroxilo monohidratado (DURACEF), No. de lote: EK50313.
Fabricadas por Mead Jonson de México, S. de R.L de C.V. Para Bristol Myers Squibb de México, S. de R.L. de C.V.
 - ◆ Dosis: Cada tableta contiene cefadroxilo monohidratado equivalente a 1 g.
 - ◆ Contenido: 10 tabletas
 - ◆ Clave: 7235-19

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

SISTEMA

Primero se explicarán las pruebas de validación realizadas al sistema que en este trabajo es el sistema cromatográfico de líquidos y que fueron:

- Condiciones óptimas de trabajo.
- Linealidad del sistema.
- Precisión del sistema.

Además de realizar en esta etapa la prueba de:

- Estabilidad de los estándares

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO EN EL SISTEMA (CLAE)

En esta sección se describe el desarrollo experimental de la validación del sistema y de la metodología. Por lo tanto se inicia con una serie de pruebas para encontrar las condiciones óptimas para la validación del sistema, dichas condiciones se emplean en la validación de la metodología y para lograr esto, fue necesario buscar en la bibliografía las propiedades fisicoquímicas del compuesto por analizar, por consiguiente después de realizar la investigación bibliográfica y de llevar a cabo diferentes pruebas experimentales en el laboratorio, se encontraron las mejores condiciones de trabajo en el cromatógrafo de líquidos.^{10, 11, 12}

Hay que indicar que en las formulaciones como tabletas y cápsulas el cefadroxilo es el único principio activo presente, por lo que se buscó tener el tiempo de análisis más corto posible para poder realizar una mayor cantidad de muestras, aquí no es preocupante la resolución por no tenerse otros compuestos que eluyan y sean detectados por el instrumento.

Las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de líquidos a utilizar fueron:

- Fase móvil: ACN 5% / Agua 95% (con 0.1% de ácido acético).
- Flujo: 1mL/min.
- Columna Luna C₁₈ de 50 mm de longitud x 4.6 mm de d.i., con tamaño de partícula 5µm y porosidad de 100 Å.
- Cantidad de muestra inyectada: 20µL.
- Detector UV-Vis. a una $\lambda = 262\text{nm}$.

Por consiguiente, para realizar la linealidad de sistema, precisión de sistema y estabilidad se utilizó el estándar “cefadroxilo monohidratado” indicado.

En el *cromatograma I* se observa el pico del cefadroxilo, en donde se puede ver el tiempo de retención de dicho activo a las condiciones de trabajo descritas arriba.

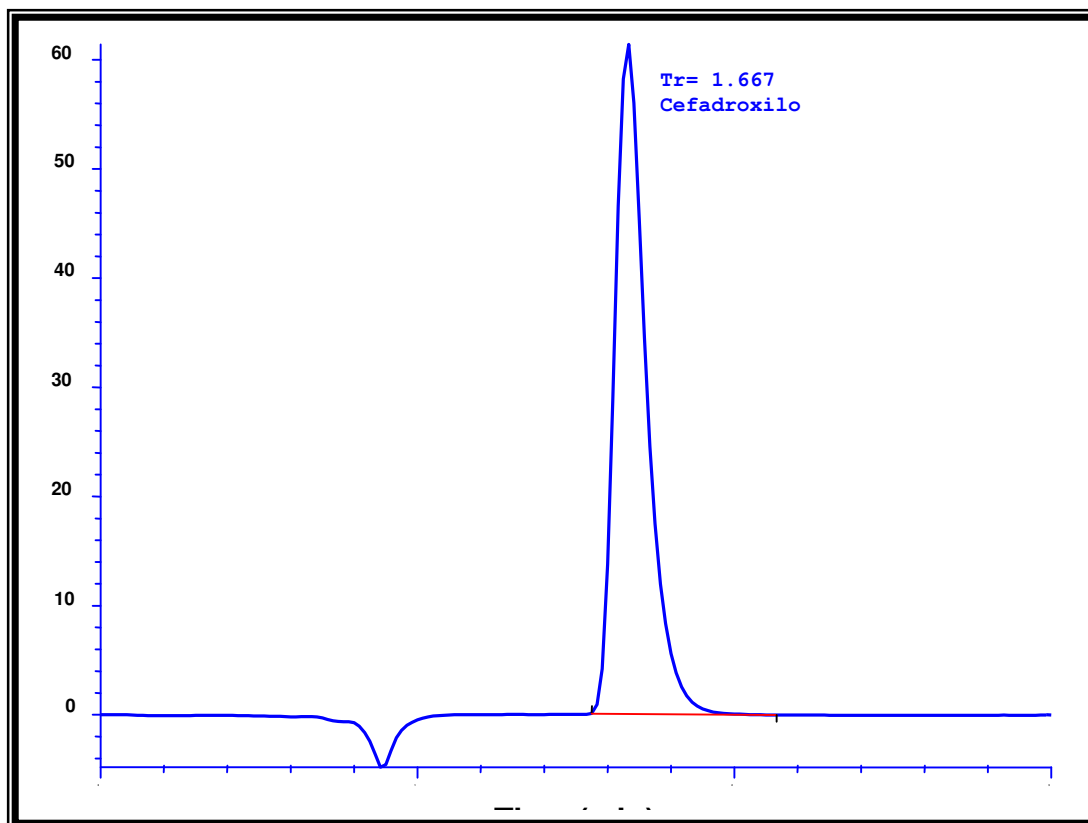


Figura 13. Cromatograma de cefadroxilo monohidratado estándar corrido a condiciones óptimas de trabajo en el Cromatógrafo de Líquidos Knauer.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de líquidos se procedió a realizar las siguientes pruebas de validación del sistema.

- Linealidad de sistema.
- Precisión de sistema.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para la prueba de linealidad se partió de una disolución madre de 1 009,2 ppm de Cefadroxilo, la cuál fue preparada pesando 22,4 mg de Cefadroxilo monohidratado y aforando a un volumen de 20 mL con agua, posteriormente se tomaron alícuotas de 50, 70, 90, 120 y 150 μ L aforando cada disolución a 10 mL con agua para obtener disoluciones estándar de 5,05 , 7,06 , 9,08 , 12,11 , 15,1 ppm. Estas disoluciones estándar se prepararon por duplicado y se inyectaron por triplicado al cromatógrafo.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se preparó una disolución madre de 832,6 ppm de cefadroxilo, pesando 23,1 mg del estándar de cefadroxilo monohidratado y aforando a un volumen de 25 mL con agua. A partir de esta solución madre se prepararon 9 disoluciones estándar a una concentración de 8,33 ppm, dicha concentración se obtuvo tomando una alícuota de 50 μ L y aforando a un volumen de 5 mL con agua. Posteriormente cada disolución se inyectó en el cromatógrafo por triplicado a las condiciones establecidas de trabajo.

Una vez realizado el análisis de resultados de las pruebas anteriores y que se aceptaban sus resultados se procedió a realizar la prueba de:

- Estabilidad de los estándares.

ESTABILIDAD DE LOS ESTÁNDARES

Para esta prueba se utilizan las mismas disoluciones empleadas en la prueba de precisión de sistema, las disoluciones fueron almacenadas bajo refrigeración (4°C), en viales color ámbar selladas con cinta teflón y parafilm, estas disoluciones fueron analizadas nuevamente a los 14 días después de su preparación, manejándose como día 1 los datos obtenidos en la prueba de precisión del sistema.

MÉTODO

Realizadas las pruebas anteriores al sistema y a la estabilidad de los estándares se pasó a realizar las pruebas de validación de método elegidas y que fueron:

- Condiciones óptimas de preparación de la muestra.
- Precisión del método (Repetibilidad).
- Recobro.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se realizaron pruebas de solubilidad, agitación y filtración con las tabletas para buscar condiciones óptimas de trabajo para realizar la extracción del principio activo en las tabletas, las pruebas anteriores llevaron a plantear en este trabajo la siguiente metodología de análisis para las tabletas.

METODOLOGÍA PROPUESTA

1. Obtener el peso promedio de las tabletas comerciales.



2. Moler y mezclar 10 tabletas del lote en un mortero.



3. Pesar el equivalente a una tableta de cefadroxilo (1 000 mg).



4. Someter a agitación a la muestra en un matraz erlenmeyer de 250 mL, colocando el equivalente aproximado a una tableta de cefadroxilo, agregar 100 mL de agua y someter a agitación durante 40 minutos para extraer el principio activo.



5. Filtrar la solución con un embudo de gravedad y papel filtro desechable, recuperar el filtrado en un matraz erlenmeyer de 250 mL.



6. Verter el filtrado a un matraz aforado de 250 mL y aforar a dicho volumen con agua.



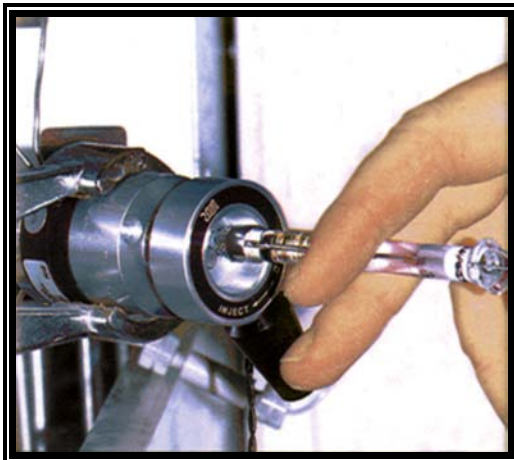
7. Filtrar en membranas de nylon con porosidad de $0.45\ \mu\text{m}$ y 25 mm de diámetro, tomando para esto un volumen de aproximadamente 2 mL, y colocando el filtrado en viales transparentes de 5 mL.



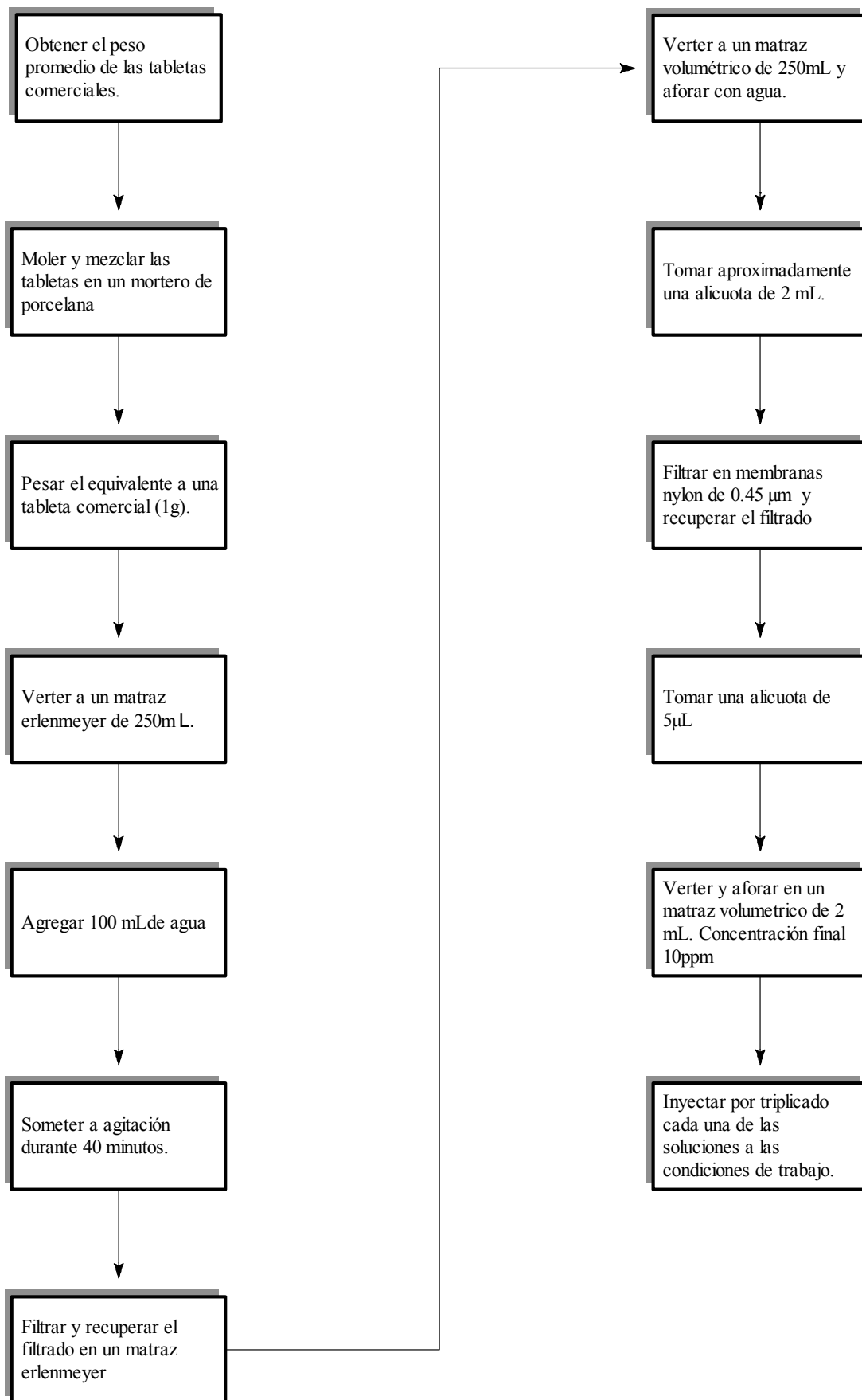
8. De la solución filtrada tomar una alícuota de $5\ \mu\text{L}$ y se deposita en un matraz aforado de 2 mL, aforando con agua. Con esto se trata de obtener una concentración de aproximadamente 10 ppm.



9. Inyectar por triplicado cada disolución en el cromatógrafo de líquidos a las condiciones de trabajo establecidas.



A continuación se resume la metodología en un diagrama de flujo:



REPETIBILIDAD

Para esta parte de la validación la metodología explicada en el punto anterior se realizó en dos etapas, la primera fue realizando este estudio con una muestra sintética preparada en el laboratorio y la segunda fue realizándola con muestras comerciales.

Lo anterior permite visualizar la importancia que tiene el excipiente en la muestra comercial ya que debido a que no se cuenta con la información por parte de la empresa de que tipo de excipiente utilizan en su formulación se trabajó con una de las opciones de excipiente que es muy común en formulaciones de este tipo de antibióticos.

MUESTRA SINTÉTICA CON HIDROXIPROPIL METIL CELULOSA COMO EXCIPIENTE

Se realizó una muestra sintética de tabletas fabricado en el laboratorio para ello se pesó el equivalente en peso de principio activo y el equivalente en peso de excipiente para 10 tabletas de cefadroxilo monohidratado que es la formulación de uso común.

PESO DE PRINCIPIO ACTIVO (g)	PESO DE EXCIPIENTE (g)	PESO TOTAL DE LA MUESTRA (g)
10,134 Esto equivale a 9,13 g de Cefradroxilo	2,523	12,657 (tomando el peso promedio de 1 tableta como 1,247 g) Esto equivale a 10.14 tabletas

CONCENTRACIÓN DE CEFRADROXILO (g/tabletas)
0,900

De esta muestra sintética se tomaron 7 muestreos representativos a las que se les aplicó la metodología descrita en la preparación de la muestra a excepción del punto 1. Los pesos tomados y equivalentes a una tableta fueron:

NO. DE MUESTREO	PESO DE LA MUESTRA EN POLVO (g)	EQUIVALENTE A TABLETA (g)
1	1,2486	1,000
2	1,2470	0,999
3	1,2486	1,000
4	1,2472	0,999
5	1,2478	0,999
6	1,2416	0,995
7	1,2394	0,993

Tabla No. 4. Pesos reportados para la prueba de repetibilidad usando muestra sintética.

TABLETAS COMERCIALES DE CEFADROXILO MONOHIDRATADO

Para realizar la precisión de método se tomaron 7 muestreos de la homogeneización de las tabletas comerciales DURACEF con No. de lote EK50313, y se le aplicó a cada muestreo la metodología descrita.

No. DE TABLETA	PESO DE LA TABLETA (g)
1	1,2718
2	1,2525
3	1,2663
4	1,2655
5	1,2169
6	1,2543
7	1,2551
8	1,2289
9	1,2082
10	1,2596
Peso Promedio:	1,2479

Tabla No. 5. Pesos de las tabletas comerciales de cefadroxilo monohidratado para determinar peso promedio.

No. DE MUESTREO	PESO DE LA MUESTRA EN POLVO (g)	EQUIVALENTE A TABLETA (g)
1	1,2487	1,000
2	1,2495	1,000
3	1,2482	1,000
4	1,2485	1,000
5	1,2477	1,000
6	1,2483	1,000
7	1,2477	0,998

Tabla No. 6. Pesos reportados para la preparación de muestra en repetibilidad usando tabletas comerciales.

RECOBRO

Este proceso se realizó fabricando una muestra sintética lo más parecida a la muestra y que se analiza con la metodología planteada en este trabajo, para esta parte se trabajo con la misma muestra sintética que se utilizó en la parte de repetibilidad con muestra sintética. Los datos y explicación de la preparación de la muestra se encuentran en la parte de repetibilidad en este capítulo de metodología.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Y

ANÁLISIS

DE

RESULTADOS

En el anexo 1 de la presente tesis están las hojas excel con los datos y resultados de manera completa obtenidos en este trabajo. Dichos resultados permiten analizar y concluir sobre cada una de las pruebas realizadas. A continuación se presentan tanto los resultados como el análisis de éstos ya que con ello se entenderán mejor los resultados obtenidos en este trabajo.

SISTEMA

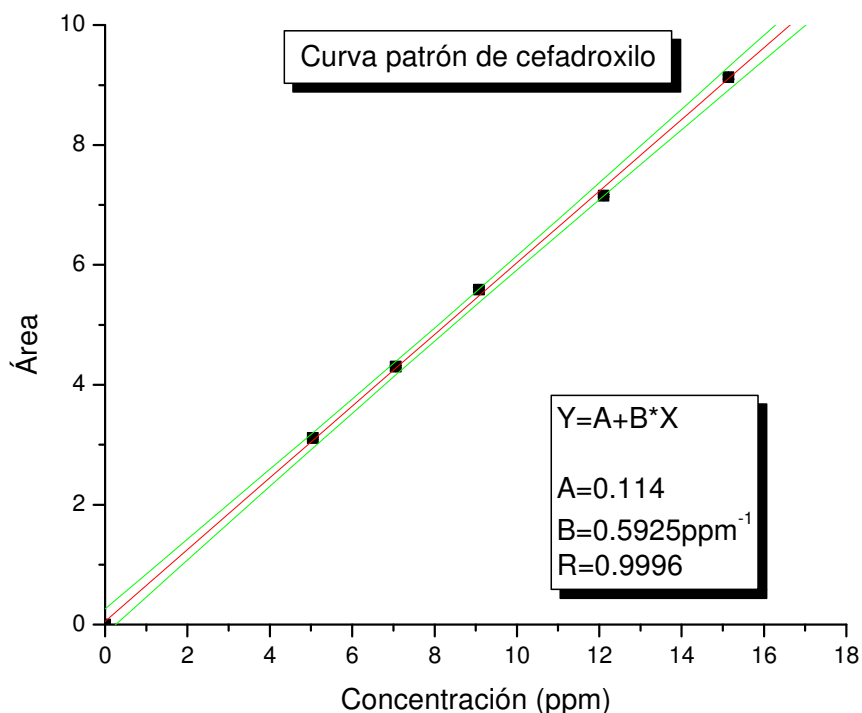
CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO EN EL SISTEMA (CLAE)

Como ya se explicó en la parte experimental las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de líquidos utilizadas fueron:

- Fase móvil: ACN 5% / Agua 95% (con 0.1% de ácido acético).
- Flujo: 1mL/min.
- Columna Luna C₁₈ de 50 mm de longitud x 4,6 mm de d.i., con tamaño de partícula 5µm y porosidad de 100 Å.
- Cantidad de muestra inyectada: 20µL.
- Detector UV-Vis. a una $\lambda = 262\text{nm}$.

LINEALIDAD DE SISTEMA

Al graficar la concentración del analito contra las áreas obtenidas para cada una de las concentraciones trabajadas se puede observar que dicha gráfica tiene una tendencia lineal por consiguiente se puede decir que es proporcional la relación entre las áreas y la concentración. A continuación se presenta la gráfica de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad de sistema, junto con sus datos en la tabla No. 9.



Gráfica No. 1. Curva patrón de Cefadroxilo monohidratado en agua destilada en un intervalo de 5 a 15 ppm aproximadamente.

Concentración (ppm)	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5,046	3,107	3,105	3,122	3,033	3,162	3,147
7,060	4,268	4,244	4,315	4,319	4,318	4,356
9,080	5,657	5,653	5,701	5,514	5,548	5,448
12,110	7,068	7,136	7,169	7,168	7,223	7,151
15,140	9,114	9,218	9,174	9,022	9,222	9,046

Tabla No. 9. Datos de las disoluciones estándar para la regresión Lineal.

Se obtienen los siguientes datos de la regresión lineal:

Pendiente (m)	0,5925 ppm ⁻¹
Ordenada al origen (b)	0,114
Coefficiente de correlación (r)	0,9996

Al realizar la regresión lineal se comprueba que la curva patrón tiene también una tendencia lineal ya que presenta un coeficiente de correlación mayor al 0,98 como lo plantea la industria farmacéutica.

También podemos observar que parece tener tendencia al origen, pero para ello se realizó la prueba de hipótesis a la ordenada al origen para saber si esto se cumple o no y por lo tanto conocer la ecuación que se va a utilizar para cuantificar.

La prueba de hipótesis planteada es:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0$$

$$H_1: b \neq \beta$$

El parámetro estadístico de comparación que se emplea para esta prueba es la “t de student” tomando un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$) y n-2 grados de libertad (29 g.l.).

Se obtiene la $t_{cal.}$:

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}}$$

donde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta = 0$).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{x} = Media.

Los datos obtenidos son los siguientes:

$$\bar{x} = 9,375$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 14796,370$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 5204,226$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 8767,106$$

$$See = \sqrt{\frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)n S_{xx}}} = 0,103$$

Por lo que la $t_{cal.} = 2,376$

Se busca la t en tablas obteniéndose que para una $t_{\alpha/2(0,025,29g.l.)} = 2,045$

El criterio para rechazar la H_0 es que:

$$t_{cal.} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal.} > t_{\alpha/2}$$

Como $t_{cal.} > t_{\alpha/2}$ ($2,376 > 2,045$) se rechaza a la hipótesis nula y por consiguiente se concluye que la ordenada al origen es diferente de cero ($b \neq \beta$), por lo tanto la ecuación que se va a aplicar para realizar el análisis cuantitativo del cefadroxilo en el sistema cromatográfico es la ecuación de una línea recta ($y = mx + b$), por lo que se tiene:

$$y(\text{Área}) = 0,5897 * x(\text{conc.}) + 0,145$$

Se realizó el cálculo para la determinación del intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia para la ordenada al origen y para la pendiente:

Para la ordenada:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{n S_{xx}}}$$

$$IC = 0,114 \pm 2,045(0,103) \sqrt{\frac{14796,370 + (290,616)^2}{458687,480}}$$

$$IC = 0,114 \pm 0,0980$$

$$0,016 < 0,114 < 0,212$$

Para la pendiente:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$IC = 0,5925 \pm (2,045)(0,103) \sqrt{\frac{31}{14796,370}}$$

$$IC = 0,5925 \pm 0,0960$$

$$0,583 < 0,5925 < 0,602$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se realizó el análisis estadístico para la precisión del sistema con la finalidad de conocer el grado de concordancia de los resultados obtenidos de las diferentes soluciones estándar de concentración de 8,33 ppm.

<u>Concentración (ppm)</u>	<u>Área</u>	<u>Concentración (ppm)</u>	<u>Área</u>
8,33	5,20336	8,33	5,08700
8,33	5,16116	8,33	5,06001
8,33	5,14435	8,33	5,17662
8,33	5,20744	8,33	5,04731
8,33	5,23536	8,33	5,12762
8,33	5,17592	8,33	5,16609
8,33	5,36161	8,33	5,11405
8,33	5,11944	8,33	5,19120
8,33	5,11257	8,33	5,06956
8,33	5,21800	8,33	4,98618
8,33	5,15137	8,33	5,17321
8,33	5,27463	8,33	5,24825
8,33	5,03088	8,33	5,28200
8,33	5,00622		

n	27
media	5,153
S_{exp.}	0,089
s²_{exp.}	0,008
%CV_{exp.}	1,720
%CV_{teórico}	5
σ_{teórica}	0,258
σ²_{teórica}	0,066

Tabla No. 10. Resultados obtenidos de la disolución para precisión de sistema.

Se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2 \text{ (donde } \sigma_0^2 \text{ se obtiene de despejar del C.V. al 5 \%)}$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

$$\sigma_0 = \frac{(x)(C.V.5\%)}{100}$$

donde:

x = Media poblacional.

n = Número de determinaciones.

σ₀ = Desviación estándar máxima aceptada.

Se aplica el parámetro estadístico de χ^2 con n-1 grados de libertad. Para ello se obtiene la:

$$\chi_{cal.}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2}$$

donde:

n = Número de determinaciones = 27

s^2 = Varianza experimental = 0,008

σ_o^2 = Varianza contra la que se va a comparar = 0,066

$$\chi_{cal.}^2 = \frac{(27-1)(0,008)}{0,066}$$

$$\chi_{cal.}^2 = 3,075$$

De tablas obtenemos que para $\chi_{\alpha, n-1}^2 = \chi_{0,05,26}^2 = 38,885$

El criterio de rechazo para la H_0 es:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{\alpha, n-1}^2$$

Al realizar los cálculos se observa que $\chi_{cal}^2 < \chi_{tablas}^2$ ($3,075 < 38,885$), por lo que se acepta la hipótesis nula, lo cuál indica el sistema tiene una precisión mayor al 95 % y se cumple lo planteado de no tener una precisión con error mayor al 5 %.

Si se realiza considerando el valor planteado por la industria farmacéutica que es con un C.V. < 2 %, también se cumple como se puede observar en el anexo 1.

Posteriormente se realizó el cálculo para la determinación del intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia para la desviación estándar:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}$$

Al realizar un arreglo algebraico se obtiene la siguiente fórmula para el intervalo de confianza para la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}}$$

$$\chi_{(1-\alpha/2)}^2 = \chi_{0,975,26}^2 = 13,844$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0,025,26}^2 = 41,923$$

$$\sqrt{\frac{(27-1)(0,008)}{41,923}} < s < \sqrt{\frac{(27-1)(0,008)}{13,844}}$$

$$0,07 < 0,089 < 0,122$$

ESTABILIDAD DE LOS ESTÁNDARES

Los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad de los estándares fueron los siguientes:

Concentración (ppm)	Áreas día 1	Áreas día 14
8,33	5,20336	4,80737
8,33	5,16116	4,81771
8,33	5,14435	4,83564
8,33	5,20744	5,17441
8,33	5,23536	5,19610
8,33	5,17592	4,95706
8,33	5,36161	5,37203
8,33	5,11944	5,37366
8,33	5,11257	5,33905
8,33	5,21800	5,22236
8,33	5,15137	5,37135
8,33	5,27463	5,12007
8,33	5,03088	5,32442
8,33	5,00622	5,20979
8,33	5,08700	5,20563
8,33	5,06001	5,02030
8,33	5,17662	4,95048
8,33	5,04731	5,17563
8,33	5,12762	5,10023
8,33	5,16609	5,08548
8,33	5,11405	5,15760
8,33	5,19120	5,25750
8,33	5,06956	5,22065
8,33	4,98618	5,19047
8,33	5,17321	5,09764
8,33	5,24825	5,15137
8,33	5,28200	5,17359

Tabla No. 11. Resultados obtenidos para la prueba de estabilidad de estándares monitoreados a los días 1 y 14.

Se procedió a realizar la prueba de hipótesis sobre las varianzas para los datos de los días 1 y 14:

$$H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Para este estudio el parámetro estadístico de comparación que se emplea es la “F de Snedecor” con $n_M - 1$ y $n_m - 1$ grados de libertad. Por lo que se obtiene el valor de la:

$$F_{cal} = \frac{S_M^2}{S_m^2} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

donde:

s_1^2 = Varianza muestral mayor con n_{M-1} grados de libertad = 27-1=26

s_2^2 = Varianza muestral menor con n_{m-1} grados de libertad =27-1=26

$$F_{cal} = \frac{0,025}{0,008} = 3,324$$

Considerando una región bilateral, con $\alpha=0.05$ y 26 grados de libertad para n_M-1 , n_m-1 , se obtiene de tablas el parámetro estadístico $F_{\alpha/2} = 2,194$.

El criterio de rechazo para la hipótesis nula es:

$$F_{cal.} > F_{\alpha/2} \text{ con g.l } (n_M - 1, n_m - 1)$$

Por lo tanto se obtiene que $F_{cal.} > F_{\alpha/2}$ ($3,324 > 2,194$) por lo que se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que las varianzas no fueron iguales el día 1 y el 14, por consiguiente la prueba de hipótesis sobre las medias se debe realizar como la comparación entre dos medias con varianzas diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las medias fue:

$$H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

Se determina el valor experimental de la $t_{cal.}$ aplicando la siguiente fórmula:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

$$t_{cal} = \frac{5,153 - 5,145}{\sqrt{\frac{0,026}{27} + \frac{0,008}{27}}} = 0,234$$

La $t_{\alpha/2}$ se busca en las tablas correspondientes, calculando los grados de libertad con la siguiente fórmula:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

$$\varphi = \frac{\left(\frac{0,026}{27} + \frac{0,008}{27} \right)^2}{\frac{(0,026/27)^2}{26} + \frac{(0,008/27)^2}{26}} = 40,345$$

Considerando 40 g.l. se obtiene que $t_{\alpha/2(0.025, 40)}$ es igual a 2,021.
El criterio de rechazo para la hipótesis nula es:

$$t_{\text{cal.}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal.}} > t_{\alpha/2}$$

Por lo que se se obtiene que $t_{\text{cal.}} < t_{\alpha/2}$ ($0,234 < 2,021$), por lo tanto se acepta la hipótesis nula, lo cuál indica que las medias pertenecen a la misma población y por consiguiente los estándares se mantuvieron estables a las condiciones de almacenamiento establecidas por lo menos 14 días.

MÉTODO

PRECISIÓN DE MÉTODO (REPETIBILIDAD)

MUESTRA SINTÉTICA CON HIDROXIPROPIL METIL CELULOSA COMO EXCIPIENTE

No.muestra	Áreas	g/tableta
1	6,24519	1,034
	6,15138	1,019
	6,22216	1,031
2	6,14706	1,019
	6,80273	1,130
	6,02563	0,998
3	6,37035	1,056
	6,49942	1,078
	6,26215	1,037
4	6,46105	1,072
	5,88849	0,975
	6,14168	1,018
5	5,63223	0,931
	5,86116	0,970
	5,43456	0,898
6	5,87545	0,977
	5,64864	0,938
	5,76894	0,958
7	5,9120	0,985
	5,94138	0,990
	5,97281	0,995

n	21
media	1,005
S exp.	0,054
S² exp.	0,003
% CV_{exp.}	5,373
% CV_{teórica}	5
σ_{teórica}	0,050
σ² teórica	0,003

Tabla No. 12. Resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad empleando muestra sintética.

Se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2 \text{ (donde } \sigma_0^2 \text{ se obtiene de despejar del C.V. al 5 \%)}$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

$$\sigma_0 = \frac{(x)(C.V.5\%)}{100}$$

donde:

x = Media poblacional.

n = Número de determinaciones.

σ_0 = Desviación estándar máxima aceptada.

Se aplica el parámetro estadístico de χ^2 con n-1 grados de libertad. Para ello se obtiene la:

$$\chi_{cal.}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

donde:

n = Número de determinaciones = 21

s^2 = Varianza experimental = 0,003

σ_0^2 = Varianza contra la que se va a comparar = 0,003

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(21-1)(0,003)}{0,003} = 23,093$$

De tablas obtenemos que para $\chi_{\alpha, n-1}^2 = \chi_{0.05, 20}^2 = 31,41$

El criterio de rechazo para la H_0 es:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{\alpha, n-1}^2$$

Al realizar los cálculos se observa que $\chi_{cal}^2 < \chi_{tablas}^2$ ($23,093 < 31,41$), por lo que se acepta la hipótesis nula, lo cual indica el método tiene una repetibilidad mayor al 95 % y se cumple lo planteado de no tener una repetibilidad con error mayor al 5 %.

Posteriormente se realizó el cálculo para la determinación del intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia para la desviación estándar:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}$$

Al realizar un arreglo algebraico se obtiene la siguiente fórmula para el intervalo de confianza para la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}}$$

$$\chi_{(1-\alpha/2)}^2 = \chi_{0.975, 20}^2 = 9,59$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 20}^2 = 34,17$$

$$\sqrt{\frac{(20)(0,003)}{34,17}} < s < \sqrt{\frac{(20)(0,003)}{9,59}}$$

$$0,041 < 0,054 < 0,078$$

TABLETAS COMERCIALES DE CEFADROXILO MONOHIDRATADO

Resultados para la prueba de Precisión de método.

No.muestra	Áreas	g/tableta
1	5,795	0,958
	5,806	0,960
	6,042	1,000
2	5,881	0,973
	5,939	0,982
	5,931	0,981
3	5,888	0,974
	5,814	0,961
	5,713	0,944
4	5,524	0,912
	5,596	0,924
	5,613	0,927
5	5,501	0,909
	5,697	0,943
	5,699	0,943
6	5,531	0,913
	5,536	0,914
	5,579	0,921
7	5,980	0,990
	5,715	0,946
	5,920	0,980

n	21
media	0,950
s_{exp.}	0,029
s²_{exp.}	0,001
% CV_{exp.}	3,007
% CV_{teórica}	5
σ_{teórica}	0,048
σ²_{teórica}	0,002

Tabla No. 13. Resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad con muestra real de tabletas de 1 g.

El manejo estadístico es el mismo que se maneja para el caso de la muestra sintética por lo que sólo pondremos la parte de resultados.

$$\chi^2_{cal} = \frac{(21-1)(0,001)}{0,002} = 7,233$$

De tablas obtenemos que para $\chi^2_{\alpha, n-1} = \chi^2_{0,05,26} = 31,41$

El criterio de rechazo para la H_0 es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha, n-1}$$

Al realizar los cálculos se observa que $\chi^2_{cal} < \chi^2_{tablas}$ ($7,233 < 31,41$), por lo que se acepta la hipótesis nula, lo cuál indica el método tiene una repetibilidad mayor al 95 % y se cumple lo planteado de no tener una repetibilidad con error mayor al 5 %.

Posteriormente se realizó el cálculo para la determinación del intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia para la desviación estándar:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Al realizar un arreglo algebraico se obtiene la siguiente fórmula para el intervalo de confianza para la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

$$\chi^2_{(1-\alpha/2)} = \chi^2_{0,975,26} = 9,59$$

$$\chi^2_{\alpha/2} = \chi^2_{0,025,26} = 34,17$$

$$\sqrt{\frac{(20)(0,001)}{34,17}} < s < \sqrt{\frac{(20)(0,001)}{9,59}}$$

$$0,022 < 0,029 < 0,041$$

RECOBRO

No.muestra	g/tableta	% Recobro
1	1,034	114,940
	1,019	113,172
	1,031	114,506
2	1,019	113,204
	1,130	125,570
	0,998	110,914
3	1,056	117,298
	1,078	119,730
	1,037	115,259
4	1,072	119,126
	0,975	108,327
	1,018	113,102
5	0,931	103,494
	0,970	107,812
	0,898	99,766
6	0,977	108,516
	0,938	104,221
	0,958	106,499
7	0,985	109,428
	0,990	109,985
	0,995	110,581

n	21
media	111,688
S exp.	6,001
% CV_{exp.}	5,373

Tabla No. 14. Resultados obtenidos para el cálculo de recobro empleando muestra sintética.

Como se puede observar con estos resultados se está obteniendo un recobro arriba del 100% lo que nos indica que el método tiene una tendencia hacia dar un resultado mayor que el real que se tiene en la muestra.

Considerando que el valor del recobro fuera real, entonces los resultados obtenidos para la muestra sintética y las tabletas sería el siguiente tomando en cuenta el intervalo de confianza:

$$I.C = \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Muestra sintética:

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0,025, 20} = 2,086$$
$$0,899 \pm 2,086 \frac{0,054}{\sqrt{21}}$$

$$\mathbf{0,899 \pm 0,024 \text{ g/tableta}}$$

con un nivel de confianza del 95%

$$\mathbf{0,875 < 0,899 < 0,923}$$

Muestra comercial:

$$0,852 \pm 2,086 \frac{0,029}{\sqrt{21}}$$

$$\mathbf{0,852 \pm 0,013 \text{ g/tableta}}$$

con un nivel de confianza del 95%

$$\mathbf{0,839 < 0,852 < 0,865}$$

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y tomando en cuenta los objetivos planteados se tienen las siguientes conclusiones:

- Las condiciones de trabajo que se establecieron para el sistema son óptimas para realizar el análisis cuantitativo de cefadroxilo.
- Para el análisis de cefadroxilo se determinó que su longitud de onda de máxima absorción en el detector del cromatógrafo de líquidos es de 262 nm lo que concuerda con lo establecido en la bibliografía.
- El sistema es lineal en un intervalo de concentraciones de 5 a 15 ppm, obteniéndose un coeficiente de correlación igual a 0,9996 , ordenada igual a 0,145 y pendiente de 0,5897 ppm⁻¹. Siendo el coeficiente de correlación mayor a 0,98 que es el mínimo requerido para linealidad de sistema por la Industria Farmacéutica.
- Después de la realización del estudio estadístico para la ordenada al origen se obtiene que no tiende al origen, por lo que la ecuación utilizada para la cuantificación del cefadroxilo fue la ecuación de la recta $y = mx + b$.
- Para el caso de la prueba de precisión del sistema se tuvo que el coeficiente de variación experimental obtenido era de 1,72%, siendo menor al 5% planteado por el laboratorio donde se realizó este trabajo y también menor del 2% que es lo requerido por la Industria Farmacéutica para técnicas cromatográficas.
- En cuanto a la evaluación de la estabilidad de estándares se tiene que las soluciones estándar de cefadroxilo fueron estables por un periodo de 14 días a las condiciones de almacenaje establecidas. Esto se puede extrapolar a las disoluciones de las muestras.
- Se desarrolló una metodología de preparación con la cual se puede extraer de manera adecuada al cefadroxilo de las tabletas con agua y de manera rápida.
- El método propuesto para el tratamiento de las muestras analizadas (tanto las tabletas comerciales como los placebos analíticos o muestras sintéticas) es repetible, por lo que se puede decir que el método desarrollado es repetible por lo menos un 95%. Hay que indicar que la metodología puede hacerse más repetible conforme se obtiene una mayor práctica con la metodología por parte del analista que es lo normal que se plantea en sistemas de calidad.
- Con respecto a la prueba de recobro se obtuvieron siempre valores mayores al 100% (un promedio de 111,69%). El conocimiento de los recobros lleva a que se considere en los cálculos finales de cefadroxilo en las muestras.

- El obtener un recobro arriba del 100% indica que el método tiene una tendencia hacia dar un resultado mayor que el real que se tiene en la muestra. Esto no se puede extrapolar de manera tan directa con las tabletas comerciales que se utilizaron en este trabajo, debido a que el excipiente que se utilizó en esta prueba no se puede asegurar que sea el que utiliza el fabricante de las tabletas. En el caso de que así fuera podemos concluir lo indicado en la parte inicial de este párrafo y por lo tanto aplicarlo a las tabletas comerciales.
- También hay que considerar que la variación del recobro mencionado en el párrafo anterior indicaría que se necesita optimizar los siguientes parámetros:
 - ❖ Utilizar el o los excipientes utilizados por el laboratorio fabricante de las tabletas.
 - ❖ Conocimiento del tamaño de partícula de los excipientes para poder utilizar el papel filtro adecuado para retener con mayor eficiencia al excipiente.

De manera general se puede concluir que:

El equipo utilizado (Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia Knauer) es adecuado para realizar la cuantificación de cefadroxilo y que aplicando la metodología desarrollada tanto en muestras comerciales como para muestras sintéticas, se puede analizar el cefadroxilo en tabletas con una precisión y repetibilidad mayor al 95%.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Martindale, William Harris.** Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Barcelona, España ; México :Pharma, c2006.
- 2.- **Por Emilio Rosenstein Ster ; editor Jose Antonio Solis Sanchez.** Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM). Edición 49. Edit. Thomson/PLM, México, (2003). 3117 p.
- 3.- **Salud Publica de México,** Departamento de Biología Molecular, Mecanismos Moleculares de la resistencia bacteriana, / julio-agosto de 1994, vol 36, No. 4,
- 4.- **McNair,H.M.** Cromatografía de líquidos de alta presión. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10, Washington,D.C.,1973.
- 5.- **Valcarcel Cases, Manuel.** Técnicas Analíticas de Separación; Barcelona, México Reverte, 1988.
- 6.- **Skoog, D. Holler,F.J. Nieman,** Principios de Análisis Instrumental. Ed. Mc.Graw-Hill, España 2001., 5ª edición.
- 7.- NOM-059-SSA1-1993. Buenas Practicas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- 8.- **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.** Guía de Validación de Métodos Analíticos. 2002.
- 9.- **Susana Ivett Martínez Sámano.** Tesis sobre Validación de un Método de análisis de Vitamina A en Hígado de Res por HPLC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, 2005.
- 10.- The United States Pharmacopeia NF28. (2005). The National Formulary.By authority of the United States Pharmacopeial, meeting at Washington, D.C., Marzo 9-13, 2005.
- 11.- British Pharmacopoeia. c2004
- 12.- European Pharmacopoeia. (1997).

ANEXO

LINEALIDAD DEL SISTEMA

No. Muestra	Conc. (X)	Áreas (Y)	X ²	Y ²	X*Y	n	31
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n-2	29
1	5,046	3,107	25,462	9,656	15,680	nΣX²	99254,030
	5,046	3,105	25,462	9,644	15,670	(ΣX)²	84457,659
	5,046	3,122	25,462	9,744	15,752	Sxx	14796,370
	5,046	3,033	25,462	9,202	15,307	nΣY²	36084,950
	5,046	3,162	25,462	10,000	15,957	(ΣY)²	30880,724
	5,046	3,147	25,462	9,906	15,881	Syy	5204,226
2	7,060	4,268	49,844	18,214	30,131	ΣXY	1930,219
	7,060	4,244	49,844	18,012	29,963	ΣX	290,616
	7,060	4,315	49,844	18,615	30,461	ΣY	175,729
	7,060	4,319	49,844	18,651	30,490	Sxy	8767,106
	7,060	4,318	49,844	18,646	30,486	Sxx*Syy	77003657,153
	7,060	4,356	49,844	18,974	30,753	(Sxy)²	76862149,150
3	9,080	5,657	82,446	32,000	51,364	(n-2) nSxx	13301936,918
	9,080	5,653	82,446	31,956	51,329	See	0,103
	9,080	5,701	82,446	32,503	51,767	b	0,114
	9,080	5,514	82,446	30,403	50,066	m	0,593
	9,080	5,548	82,446	30,785	50,380	b-β/Se	1,105
	9,080	5,448	82,446	29,680	49,467	nSxx	458687,480
4	12,110	7,068	146,652	49,958	85,595	X	9,375
	12,110	7,136	146,652	50,916	86,412	nx	290,616
	12,110	7,169	146,652	51,393	86,815	(nX)²	84457,659
	12,110	7,168	146,652	51,383	86,807	t_{cal}	2,376
	12,110	7,223	146,652	52,177	87,475	t_{a/2, (29,0,025)}	2,045
	12,110	7,151	146,652	51,131	86,593	Prueba de hipótesis para la ordenada	
5	15,140	9,114	229,220	83,064	137,985	H ₀ = b = β donde	β = 0
	15,140	9,218	229,220	84,974	139,562	H ₁ = b ≠ β	
	15,140	9,174	229,220	84,157	138,890	Criterio de rechazo	t_{cal} < -t_{a/2} o que t_{cal} > t_{a/2}
	15,140	9,022	229,220	81,393	136,590	Conclusión: Como	
	15,140	9,222	229,220	85,054	139,628	2,376 > 2,045	
	15,140	9,046	229,220	81,839	136,964	Rechazo Ho, por lo tanto b ≠ β	
Suma (S)	290,616	17,729	3201,743	1164,031	1930,219		

A1. Tabla para el cálculo de linealidad del sistema.

Intervalos de confianza

Para la ordenada	
b	0,114
t_{a/2, (29,0,025)}	2,045
Se	0,103
Sxx	14796,370
(nX)²	84457,659
n*Sxx	458687,480
Máximo	0,212
Mínimo	0,016

Para la pendiente	
m	0,5925
Se	0,103
n	31,000
Sxx	14796,370
Máximo	0,602
Mínimo	0,583

PRECISIÓN DEL SISTEMA

**Precisión de Sistema
(5 % de error máximo)**

Solución	Áreas	n	27
1	5,20336	\bar{X}	5,153
1	5,16116	S_{exp}	0,089
1	5,14435	S_{exp}^2	0,008
2	5,20744	$C.V._{exp}$	1,720
2	5,23536	$C.V._{Teó}$	5
2	5,17592	$\sigma_{Teó}$	0,258
3	5,36161	$\sigma_{Teó}^2$	0,066
3	5,11944	α	0,05
3	5,11257	$g.l^{*(n-1)}$	26
4	5,218	χ^2_{cal}	3,075
4	5,15137	$\chi^2_{tablas (0,05,26)}$	38,885
4	5,27463	$\chi^2_{(0,025,26)}$	41,923
5	5,03088	$\chi^2_{(0,975,26)}$	13,844
5	5,00622		
5	5,087	Prueba de hipótesis:	
6	5,06001	$H_0 = s^2 = \sigma^2$ donde $\sigma^2 = 5\%$ de error máximo	
6	5,17662	$H_1 = s^2 > \sigma^2$	
6	5,04731		
7	5,12762	Criterio de rechazo de H_0:	
7	5,16609	$\chi^2_{cal} > \chi^2_{tablas}$	
7	5,11405		
8	5,1912	Conclusión:	
8	5,06956	Como $\chi^2_{cal} < \chi^2_{tablas}$	
8	4,98618	Se acepta la H_0 lo cual quiere decir que el sistema es	
9	5,17321	preciso con un error máximo del 5 %	
9	5,24825		
9	5,282		

A1. Tabla para el cálculo de precisión de sistema para concentraciones de 8,33 ppm.

**Precisión de Sistema
(2 % de error máximo)**

Solución	Áreas	n	27
1	5,20336	\bar{x}	5,153
1	5,16116	s_{exp}	0,089
1	5,14435	s^2_{exp}	0,008
2	5,20744	C.V. $_{exp}$	1,720
2	5,23536	C.V. $_{Teó}$	2
2	5,17592	$\sigma_{Teó}$	0,103
3	5,36161	$\sigma^2_{Teó}$	0,011
3	5,11944	α	0,05
3	5,11257	g. l *(n-1)	26
4	5,218	χ^2_{cal}	19,220
4	5,15137	$\chi^2_{tablas (0,05,26)}$	38,885
4	5,27463	$\chi^2_{(0,025,26)}$	41,923
5	5,03088	$\chi^2_{(0,975,26)}$	13,844
5	5,00622		
5	5,087	Prueba de hipótesis:	
6	5,06001	$H_0 = s^2 = \sigma^2$ donde: $\sigma^2 = 2\%$ de error máximo $H_1 = s^2 > \sigma^2$	
6	5,17662		
6	5,04731		
7	5,12762	Criterio de rechazo de H_0:	
7	5,16609	$\chi^2_{cal} > \chi^2_{tablas}$	
7	5,11405		
8	5,1912	Conclusión:	
8	5,06956	Como $\chi^2_{cal} < \chi^2_{tablas}$ Se acepta la H_0 lo cual quiere decir que el sistema es preciso con un error máximo del 2 %	
8	4,98618		
9	5,17321		
9	5,24825		
9	5,282		

A1. Tabla para el cálculo de precisión de sistema para concentraciones de 8,33 ppm.

Intervalo de confianza para la desviación estándar	
n-1	26
S²_{exp}	0,008
s²*(n-1)	0,204
S_{exp}	0,089
$\chi^2_{(0.025,26)}$	41,923
$\chi^2_{(0.975,26)}$	13,844
Mínimo	0,070
Máximo	0,122

Estabilidad de las muestras

Concentración (ppm)	Áreas Día 1	Áreas Día 14
8,33	5,20336	4,80737
8,33	5,16116	4,81771
8,33	5,14435	4,83564
8,33	5,20744	5,17441
8,33	5,23536	5,1961
8,33	5,17592	4,95706
8,33	5,36161	5,37203
8,33	5,11944	5,37366
8,33	5,11257	5,33905
8,33	5,218	5,22236
8,33	5,15137	5,37135
8,33	5,27463	5,12007
8,33	5,03088	5,32442
8,33	5,00622	5,20979
8,33	5,087	5,20563
8,33	5,06001	5,0203
8,33	5,17662	4,95048
8,33	5,04731	5,17563
8,33	5,12762	5,10023
8,33	5,16609	5,08548
8,33	5,11405	5,1576
8,33	5,1912	5,2575
8,33	5,06956	5,22065
8,33	4,98618	5,19047
8,33	5,17321	5,09764
8,33	5,24825	5,15137
8,33	5,282	5,17359

A1. Tabla para el cálculo de estabilidad de las muestras.

Prueba sobre las Varianzas para día 1 y 14	
n	28
s₁²	0,025
s₂²	0,008
g.l (nM - 1)	26
g.l (nm- 1)	26
F_{cal.}	3,324
α/2	0,025
F_{tab.(0,025,26,26)}	2,194
Prueba de hipótesis:	Ho = σ ₁₂ = σ ₂₂
	H ₁ = σ ₁₂ ≠ σ ₂₂
Criterio de rechazo para Ho:	F _{cal} > F _{α/2}
Conclusión: Como F _{cal} > F _{α/2} Se rechaza la Ho lo cual quiere decir que las varianzas son diferentes y por lo tanto se realiza la prueba sobre las medias considerando varianzas diferentes	

Prueba sobre las Medias considerando varianzas diferentes	
\bar{x}_1	5,153
\bar{x}_2	5,145
n₁	27
n₂	27
s²₁	0,026
s²₂	0,008
s²₁/n₁	0,001
s²₂/n₂	0,0003
(s²₁/n₁+s²₂/n₂)	0,001
(s²₁/n₁+s²₂/n₂)^{1/2}	0,035
(s²₁/n₁ + s²₂/n₂)²	1,581E-06
(s²₁/n₁)² / n₁ - 1 + (s²₂/n₂)²/ n₂ - 1	3,919E-08
t_{exp.}	0,234
Ø	40,345
t_{α/2(0,025, 40)}	2,021
Prueba de hipótesis	H ₀ = $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$
	H ₁ = $\bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$
Criterio de rechazo para Ho. t _{exp.} < -t _{α/2} ó t _{exp} > t _{α/2}	
Conclusión: Como la t _{exp.} < t _{α/2} entonces se acepta la Ho lo cuál significa que las medias son iguales y por lo tanto la muestra es estable por 14 días	

PRECISIÓN DEL MÉTODO

REPETIBILIDAD MUESTRA SINTÉTICA

No.muestra	Área	μ g/ml	g/tab.	\bar{X}	1,006
1	6,24519	10,348	1,035	n	21,000
	6,15138	10,190	1,019	S_{exp}	0,054
	6,22216	10,309	1,031	S^2_{exp}	0,003
2	6,14706	10,182	1,019	CV_{exp}	5,344
	6,80273	11,289	1,130	$C.V_{teo}$	5,000
	6,02563	9,977	0,999	σ_{teo}	0,050
3	6,37035	10,559	1,056	σ^2_{teo}	0,003
	6,49942	10,777	1,078	α	0,050
	6,26215	10,377	1,038	$g \cdot I_{(n-1)}$	20
4	6,46105	10,712	1,072	$\chi^2_{tab. \alpha (0.05,20)}$	31,410
	5,88849	9,746	0,976	$\chi^2_{cal.}$	22,848
	6,14168	10,173	1,018	Prueba de hipótesis:	
5	5,63223	9,313	0,932	$H_0: s^2 = \sigma_0^2$ (donde σ_0^2 se obtiene de despejar del C.V. al 5 %)	
	5,86116	9,700	0,971	$H_1: s^2 > \sigma_0^2$	
	5,43456	8,980	0,899	Criterio de rechazo para H_0	
6	5,87545	9,724	0,977	$\chi^2_{cal.} > \chi^2_{tab.}$	
	5,64864	9,341	0,939	Conclusión:	
	5,76894	9,544	0,959	Como la $\chi^2_{cal.} < \chi^2_{tab.}$ Se acepta la hipótesis nula Lo cuál quiere decir que el método es preciso con un error que cuando mucho es del 5%	
5,912	9,786	0,985			
5,94138	9,835	0,990			
7	5,97281	9,888	0,996		

A1. Tabla para el cálculo de precisión de método (repetibilidad) muestra sintética.

INTERVALOS DE CONFINZA

PARA LA MEDIA	
n	21
\bar{x}	1,005
$t_{\alpha/2}$	2,086
$s^2_{exp.}$	0,054
Raíz cuadrada de n	4,583
Máximo	1,030
Mínimo	0,981

PARA LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR	
n	21
n-1	20
$s^2_{exp.}$	0,003
$\chi^2_{\alpha/2}$	34,170
$\chi^2_{(1-\alpha/2)}$	9,590
Máximo	0,078
Mínimo	0,041

REPETIBILIDAD TABLETAS

No,Muestra	Área	μ/ml	g/tab.	\bar{x}	0,950
1	5,79548	9,582	0,958	n	21
	5,80579	9,599	0,960	s_{exp}	0,029
	6,04248	10,001	1,000	s^2_{exp}	0,001
2	5,8811	9,727	0,973	CV_{exp}	3,007
	5,93869	9,825	0,982	$C.V_{teo}$	5
	5,93056	9,811	0,981	σ_{teo}	0,048
3	5,88779	9,738	0,974	σ^2_{teo}	0,002
	5,81366	9,613	0,961	α	0,05
	5,71342	9,443	0,944	$g.l_{(n-1)}$	20
4	5,52445	9,122	0,912	$\chi^2_{tab. \alpha (0.05,20)}$	31,410
	5,5957	9,243	0,924	$\chi^2_{cal.}$	7,233
	5,6132	9,273	0,927	Prueba de hipótesis:	
5	5,50077	9,082	0,909	$H_0: s^2 = \sigma_0^2$ (donde σ_0^2 se obtiene de despejar del C.V. al 5 %)	
	5,6974	9,416	0,943	$H_1: s^2 > \sigma_0^2$	
	5,69919	9,419	0,943	Criterio de rechazo para Ho	
6	5,53128	9,134	0,913	$\chi^2_{cal.} > \chi^2_{tab.}$	
	5,53564	9,141	0,914	Conclusión: Como la $\chi^2_{cal.} < \chi^2_{tab.}$ Se acepta la hipótesis nula Lo cuál quiere decir que el método es preciso con un error que cuando mucho es del 5%	
	5,57878	9,214	0,921		
7	5,97973	9,894	0,990		
	5,71516	9,446	0,946		
	5,91984	9,793	0,980		

A1. Tabla para el cálculo de precisión del método.

INTERVALOS DE CONFINZA

PARA LA MEDIA	
n	21
\bar{x}	0,950
$t_{\alpha/2}$	2,086
s^2_{exp}	0,029
Raíz cuadrada de n	4,583
Máximo	0,963
Mínimo	0,937

PARA LA DESVIACIÓN ESTANDAR	
n	21
n - 1	20
s^2_{exp}	0,001
$\chi^2_{(\alpha/2, n-1)}$	34,170
$\chi^2_{(1-\alpha/2, n-1)}$	9,591
Máximo	0,022
Mínimo	0,041

RECOBRO

No.Muestra	Área	µg/ml	g/tab.	% Recobro
1	6,24519	10,345	1,034	114,940
	6,15138	10,185	1,019	113,172
	6,22216	10,306	1,031	114,506
2	6,14706	10,178	1,019	113,204
	6,80273	11,290	1,130	125,570
	6,02563	9,972	0,998	110,914
3	6,37035	10,557	1,056	117,298
	6,49942	10,776	1,078	119,730
	6,26215	10,373	1,037	115,259
4	6,46105	10,711	1,072	119,126
	5,88849	9,740	0,975	108,327
	6,14168	10,169	1,018	113,102
5	5,63223	9,305	0,931	103,494
	5,86116	9,693	0,970	107,812
	5,43456	8,970	0,898	99,766
6	5,87545	9,718	0,977	108,516
	5,64864	9,333	0,938	104,221
	5,76894	9,537	0,958	106,499
7	5,912	9,780	0,985	109,428
	5,94138	9,829	0,990	109,985
	5,97281	9,883	0,995	110,581
\bar{x}			1,005	111,688
$S_{exp.}$			0,054	6,001
CV_{exp}			5,373	5,373

A1. Tabla para el cálculo de recobro.