



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

“OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE CLORHIDRATO DE MEMANTINA POR
ELECTROFORESIS CAPILAR MEDIANTE DETECCIÓN INDIRECTA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS GERARDO REYES GARCÍA

ASESORA:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
 VOTOS APROBATORIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Optimización y validación de un método analítico para
la determinación de clorhidrato de memantina por electroforesis
capilar mediante detección indirecta.

que presenta el pasante: Luis Gerardo Reyes García
 con número de cuenta: 40402400-5 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de MAYO de 2009.

PRESIDENTE	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	
VOCAL	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MI. Claudia Teriano Hernández</u>	



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por la calidad en la formación académica que he recibido y permite salir como profesionista de alto nivel.
- A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segunda casa, por enseñarme los valores éticos, morales, profesionales, y la educación recibida que permitirá mi desempeño como profesionista contribuyendo a formar un país con un futuro más próspero y justo para las futuras generaciones.
- A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por todo su apoyo, consejos y conocimientos brindados durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por mostrarse siempre dispuesta a apoyarme y a enseñarme siempre. Gracias por su dedicación e interés en la realización de este proyecto y en la redacción de esta tesis y toda su paciencia para conmigo, Gracias por el apoyo moral y ético. Gracias por ser como es una persona honorable.
- A Dios porque me ha permitido terminar esta faceta de mi vida y porque me ha acompañado siempre en el camino.
- A mis padres Susana y Gerardo por las enseñanzas, el apoyo incondicional, el cariño y la confianza que me han brindado siempre. Todos mis logros se los debo a ustedes, Gracias por todos sus consejos.
- A mis hermanos Antonio, Diego, Nancy y Daniela por permitirme compartir con ellos todos estos años en los malos y buenos momentos que pasamos siempre juntos y por todo el apoyo que he recibido de su parte. Sin ustedes no habría logrado alcanzar esta meta. Gracias.
- A mis abuelitos Herminio, Bernarda, Candelaria y Luis por el cariño que me dieron en el tiempo y la sabiduría que recibí a través de sus consejos y de sus plegarias.
- A mis amigos de la carrera Jimmy, Lázaro, Fernando, Pato, Kiri, Edgar, Galagar, Bonito, Iram, Kanu, Jo, Nitzi, Nayeli, Tania, Diana, Souza, Josue, Julieta, Oscar, Pablo, Victor, Calambres, Angela, Yunwe, Yuggy.
- A mis compañeros de Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos; Rogelio, Lluvia, Lucia, Carlos.
- A los sinodales por su atención y tiempo dedicado para el mejoramiento de este trabajo.



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

➤ A la UNAM DGAPA por el apoyo a los proyectos PAPIME PE203405 y PAPIIT IN208608

➤ Al CONACYT por los recursos otorgados al proyecto 52723

INDICE.

I.	Generalidades.	12
1.	Electroforesis Capilar.	12
1.1	Instrumentación.	12
1.2	Aspectos teóricos del fenómeno electroforético	14
1.2.1	Proceso electroforético.	14
1.2.2	Flujo electroosmótico (FEO).	15
1.2.2.1	Factores que afectan la movilidad del FEO.	16
1.2.3	Parámetros determinantes en la calidad de las separaciones electroforéticas.	16
1.3	Electroforesis capilar en zona	17
1.4	Espectrofotometría UV-VIS en EC.	18
1.4.1	Detección indirecta.	19
2.	Validación.	20
2.1	Guías Internacionales	22
2.2	Definición de los parámetros de desempeño analítico.	22
2.2.1	Exactitud.	23
2.2.2	Precisión.	23
2.2.3	Identidad-Especificidad-Selectividad.	23
2.2.4	Limite de detección	25
2.2.5	Limite de cuantificación.	25
2.2.6	Linealidad	25
2.2.7	Robustez	26
3.	Clorhidrato de Memantina.	27
3.1	Propiedades Fisicoquímicas.	27
3.2	Análisis químico.	28
3.3	Farmacocinética.	29
4.	Memantina versus Rimantadina.	30
5.	Justificación.	31
II.	Objetivos	32
III.	Método.	33
3.1	Equipos.	33
3.2	Reactivos.	33
3.1	Optimización de método.	33
3.2	Validación de método	34
3.4.1.	Adecuabilidad del sistema.	34
3.4.2.	Precisión del sistema.	35
3.4.3.	Especificidad.	35
3.4.4.	Linealidad del sistema.	36
3.4.5.	Linealidad del método.	37

3.4.6. Exactitud y repetibilidad del método.	38
3.4.7. Precisión intermedia del método.	39
3.4.8. Robustez.	40
3.4.9. Tolerancia	41
IV. Resultados y análisis de resultados.	42
4.1 Optimización del método.	42
4.1.1 pH del electrolito soporte.	43
4.1.2 Voltaje de separación.	44
4.1.3 Volumen de inyección.	46
4.1.4 Efecto de la temperatura.	47
4.1.5 Ciclo de lavado.	49
4.2 Validación del método analítico.	51
4.2.1 Adecuabilidad del sistema.	52
4.2.2 Precisión del sistema.	53
4.2.3 Especificidad.	54
4.2.4 Linealidad del sistema.	56
4.2.5 Exactitud y repetibilidad del método.	59
4.2.6 Linealidad del método.	61
4.2.7 Precisión intermedia del método.	65
4.2.8 Robustez	66
4.2.9 Tolerancia.	67
4.2.10 Límite de detección.	69
4.2.11 Límite de cuantificación.	70
V. Conclusiones.	72
VI. Bibliografía.	73
VII. Anexo 1	74
VIII. Anexo 2	77

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
Memantina HCl.	Clorhidrato de Memantina
Rimantadina HCl.	Clorhidrato de Rimantadina
EC	Electroforesis Capilar
tm	Tiempo de migración
nm	Nanómetros
g	Gramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Mili molar
µg	Microgramos
kV	Kilo volts
Desv. Est.	Desviación estándar
Prom	Promedio
C.V. (%)	Coficiente de variación
Min	Minutos
NMDA	N-metil-D-ácido aspártico

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla No 1.	Modos de separación de electroforesis capilar.	12
Tabla No 2.	Características de desempeño analítico.	23
Tabla No 3.	Propiedades fisicoquímicas de memantina HCl.	28
Tabla No 4.	Resumen de condiciones reportadas en la literatura para Rimantadina HCl.	42
Tabla No 5.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función del voltaje de separación.	45
Tabla No 6.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función del volumen de inyección.	46
Tabla No 7.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función de la temperatura del capilar.	48
Tabla No 8.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función del tiempo de lavado del capilar entre corridas.	49
Tabla No 9.	Ciclo de lavado del capilar para el análisis de memantina.	50
Tabla No 10.	Parámetros de análisis para memantina por electroforesis capilar de detección indirecta.	52
Tabla No 11.	Resultados del sistema de adecuabilidad de memantina.	53
Tabla No 12.	Resultados de precisión del sistema de memantina.	54
Tabla No 13.	Resultados de linealidad del sistema para memantina.	57
Tabla No 14.	Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad de memantina con un nivel de significancia del 95% de confianza.	58
Tabla No 15.	Parámetros obtenidos de la regresión lineal del sistema de memantina.	59
Tabla No 16.	Resultados de exactitud y repetibilidad del sistema para memantina.	60
Tabla No 17.	Resultados de linealidad del método para memantina.	62
Tabla No 18.	Parámetros obtenidos a partir de la regresión lineal para memantina.	64
Tabla No 19.	Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad de memantina con un nivel de significancia del 95% de confianza.	64
Tabla No 20.	Coefficientes de variación de los porcentajes de recobro de memantina obtenidos en dos días y por dos analistas.	65
Tabla No 21.	Resultados de porcentaje de recobro para diferentes concentraciones de electrolito soporte.	67
Tabla No 22.	Resultados de porcentaje de recobro de dos equipos para memantina.	68
Tabla No 23.	Promedio y coeficiente de variación de las seis determinaciones del porcentaje de recobro en los equipos utilizados.	68

Tabla No 24.	Resumen de los resultados de la validación del método para memantina.	71
Tabla No 25.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y Áreas de memantina en función del voltaje de separación a una inyección de 0.5 psi, 5 s, 25°C.	75
Tabla No 26.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y Áreas de memantina en función del volumen inyección a 20kV, 25 °C.	75
Tabla No 27.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y Áreas de memantina en función del la temperatura del capilar a 20 kV, inyección hidrodinámica 1.5 psi, 5s.	76
Tabla No 28.	Comparación de la variación en los tiempos de migración y Áreas de memantina en función del tiempo de lavado entre corridas a 20 kV, 20 °C, 1.5 psi, 5s.	76
Tabla No 29.	Análisis estadístico de adecuabilidad para memantina.	77
Tabla No 30.	Análisis estadístico de precisión del método para memantina.	78
Tabla No 31.	Análisis estadístico de linealidad del sistema para memantina.	79
Tabla No 32.	Análisis estadístico de especificidad para memantina.	80
Tabla No 33.	Análisis estadístico de exactitud y repetibilidad para memantina.	81
Tabla No 34.	Análisis estadístico de linealidad del método para memantina.	83
Tabla No 35.	Análisis estadístico de precisión intermedia para memantina.	86
Tabla No 36.	Resumen de coeficientes de variación de precisión intermedia para memantina.	86
Tabla No 37.	Análisis estadístico de robustez para memantina.	87
Tabla No 38.	Análisis estadístico de tolerancia para memantina.	88

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. No. 1.	Esquema representativo de un equipo de electroforesis capilar	13
Fig. No. 2.	Velocidades desarrolladas de las moléculas en presencia del flujo electroosmótico.	15
Fig. No. 3.	Fórmula estructural de memantina HCl.	28
Fig. No. 4.	Similitud entre la molécula de Memantina HCl y Rimantadina HCl.	30
Fig. No. 5.	Diagrama lineal de zonas de predominio para Memantina HCl en función del pH.	43
Fig. No. 6.	Electroferograma de memantina a pH=9.0.	44
Fig. No. 7.	Influencia del voltaje en la separación de memantina HCl.	45
Fig. No. 8.	Influencia del volumen de inyección en la separación de memantina.	47
Fig. No. 9.	Influencia de la temperatura del capilar en la separación de memantina.	48
Fig. No. 10.	Comparación de resultados para un placebo con y sin recubrimiento, una solución estándar y un placebo cargado al 100 %.	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Relación de la concentración en función de la respuesta analítica (Área de pico), ecuación de la línea y el coeficiente de correlación.	57
Gráfico 2.	Relación de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada, ecuación de la línea y el coeficiente de correlación.	63

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la optimización de un método analítico para la determinación y cuantificación de clorhidrato de memantina en muestras farmacéutica, empleando la técnica de electroforesis capilar con detección indirecta.

El método se optimizó a partir de condiciones analíticas posteriormente descritas en los artículos [1-2], de la bibliografía. En estas referencias se desarrolló el método para la cuantificación de clorhidrato de rimantadina, siendo ésta una molécula muy similar al clorhidrato de memantina.

Una vez que se logró la optimización de las condiciones de análisis, se continuó con la validación en base a los criterios establecidos en la “guía de validación de métodos analíticos” editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, cumpliendo satisfactoriamente con todos los parámetros evaluados.

I. GENERALIDADES

1. Electroforesis capilar

Es ampliamente reconocido que la electroforesis capilar (EC) es una técnica muy versátil, se debe en parte por los distintos procesos de separación disponibles. [4]

Tabla No 1. Modos de separación de electroforesis capilar. [4]

Modo de separación	Acrónimo simbología	Principio de separación
Electroforesis Capilar en Zona	ECZ	Carga/Tamaño
Cromatografía capilar Electrocinética Micelar	CCEM	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante. Para separar moléculas neutras.
Electroforesis capilar quiral	EQA	Formación de complejos estereoesfericos
Electroforesis capilar por afinidad	ECA	Interacción molecular entre ligando y analito
Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones	CCEMM	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
Electroforesis capilar en gel	ECG	Tamaño molecular
Isoelectroenfoque capilar	IEEC	Punto isoeléctrico
Isotacoforesis capilar	ITFC	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar	ECC	Movilidad en una solución libre y retención cromatografía

1.1. Instrumentación.

Los componentes básicos de estos equipos son:

- a) Viales de entrada y salida.
- b) Medio electroforético.
- c) Capilar.
- d) Fuente de alto voltaje.
- e) Sistema de introducción de la muestra.
- f) Sistema de detección.
- g) Sistema de refrigeración.
- h) Sistema de registro.

En los extremos del capilar se colocan dos viales con disolución de separación (búfer o tampón) que contiene cada uno de ellos un electrodo, ambos conectados a una fuente de alto voltaje capaz de alcanzar voltajes de hasta 30 kV. La muestra se introduce dentro del capilar sustituyendo temporalmente el vial inicial con disolución de separación (usualmente el del ánodo) por un vial que contiene la muestra a separar, al ser aplicado un potencial eléctrico o una presión externa durante unos segundos se logra introducir la muestra. A la primera forma se le denomina inyección electrocinética y la segunda hidrodinámica. Después se vuelve a reemplazar el vial de la muestra por el inicial conteniendo la disolución de separación y se aplica un potencial eléctrico, a lo largo del capilar, que produce la separación. Los analitos pueden ser detectados directamente por detección óptica (UV-visible, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja) a través de una ventana del capilar que habitualmente se encuentra cerca del extremo opuesto a donde se hizo la inyección. [4]

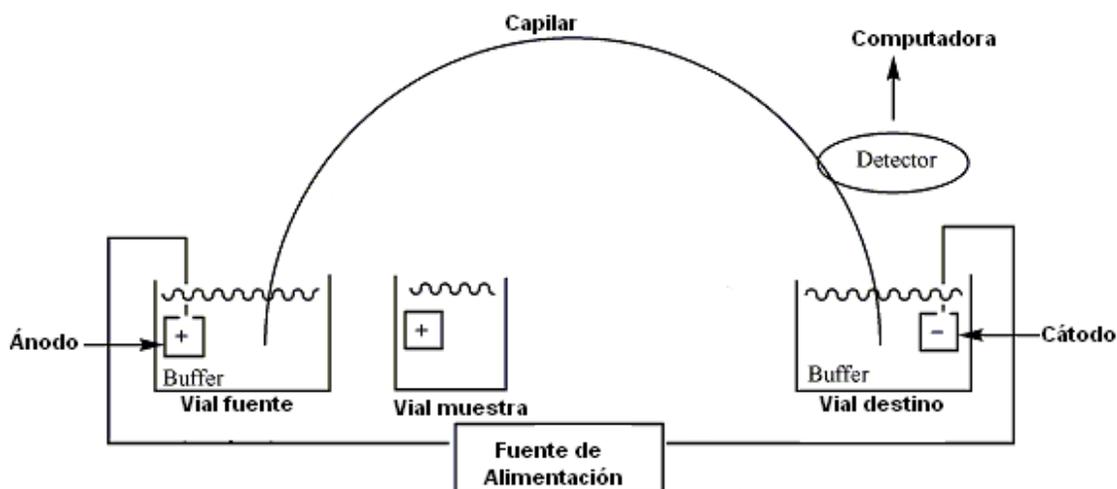


Fig. No 1. Esquema representativo de un sistema de electroforesis capilar.²²

1.2. Aspectos teóricos del fenómeno electroforético.

En EC, la separación depende de las diferentes velocidades con que migran los analitos a través de un medio conductor (tampón) en respuesta al campo eléctrico generado por la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos; la velocidad con la que se mueve un analito depende en gran medida de su relación carga/masa [23].

1.2.1. Proceso electroforético.

El proceso electroforético se ha definido como el movimiento diferencial o migración de iones en disolución por atracción o repulsión en un campo eléctrico [4].

En términos prácticos, un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) se colocan a una disolución que contienen iones, luego, cuando se aplica un voltaje a los electrodos, los iones de diferente carga, aniones con carga (negativa) y cationes con carga (positiva) se mueven a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta.

Por lo tanto la separación ocurre gracias a las diferencias en las velocidades de iones o solutos; así, la velocidad de migración puede ser expresada como:

$$v = \mu_e E$$

Donde v es la velocidad de migración de cada ion (m/s), μ_e es la movilidad electroforética ($\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$) y E es el campo eléctrico aplicado (V/m). La movilidad electroforética depende de la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito [4].

1.2.2. Fenómeno electroosmótico (FEO).

El uso de capilares de sílice provoca un flujo electroosmótico (FEO) que hace mover a los iones y moléculas presentes en el medio electroforético hacia el cátodo. A pH superiores a 4 la superficie interna del capilar, que contiene grupos silanol (Si-OH), se forma una capa de protones (H^+) junto con Na^+ o K^+ dependiendo de la sal del medio de separación; cerca de la pared cargada negativamente. Estas cargas positivas incluyendo las moléculas de solvatación del agua son atraídas hacia el cátodo provocando el (FEO), que mueve a las moléculas neutras que se encuentran en el medio electroforético [4].

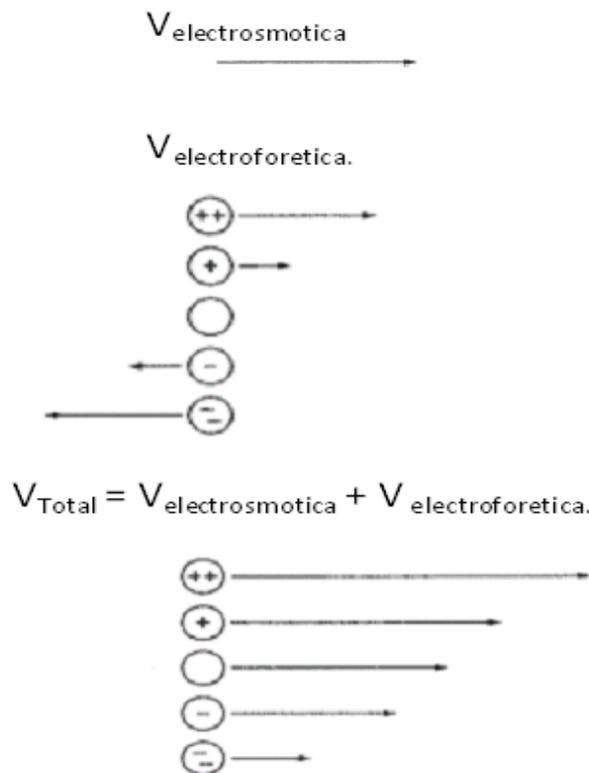


Fig. 2. Velocidades desarrolladas de las moléculas en presencia del flujo electroosmótico.⁷

1.2.2.1. Factores que afectan la movilidad del FEO.

Los principales factores que afectan a la movilidad electroosmótica son la constante dieléctrica, la viscosidad de la solución de separación y el valor del potencial zeta.

1.2.3. Parámetros determinantes en la calidad de las separaciones electroforéticas.

Los factores de la calidad de las determinaciones que se realizan por electroforesis capilar están regidos por los siguientes parámetros: **tiempo de análisis, eficacia, resolución y selectividad.**

El tiempo de análisis está en función del tiempo de migración del análisis (t_m), y viene dado por:

$$T_m = \frac{L_D T_T}{(\mu_e + \mu_{FEO})V}$$

Donde: V= voltaje.
L_D= longitud del capilar hasta la ventana del detector
T_T= longitud total
μ_e = movilidad electroforética
μ_{FEO} = movilidad electroosmótica

Se pueden conseguir tiempos de análisis cortos trabajando a voltajes altos, usando capilares cortos y usando flujos electroosmóticos altos. Sin embargo cuanto mayor sea el FEO peor será la resolución y por ello para acortar el tiempo de análisis es mejor aumentar el voltaje o emplear capilares cortos [4].

La eficacia de los sistemas electroforéticos se cuantifica mediante el número de platos teóricos (N) cuya expresión se calcula de forma análoga a las técnicas cromatográficas:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{W} \right)^2$$

Donde N=números de platos teóricos

T_m=tiempo de migración.

W= ancho de pico.

Donde se deduce que cuanto más estrecho sea el ancho de pico y más largo su tiempo de migración, mayor será la eficiencia [4].

1.3. Electroforesis capilar de zona

El mecanismo de separación se basa en las diferencias en la relación carga/masa de las diferentes sustancias que componen una muestra. Estas diferencias implican distintas movilidades electroforéticas y, por tanto, diferentes velocidades de migración de las especies iónicas en el medio electroforético que contiene el capilar. Este mecanismo de separación permite analizar mezclas de aniones y cationes, aunque las sustancias neutras no podrán ser separadas [4].

1.4. Espectrofotometría UV-VIS en EC.

Este detector tiene su fundamento en la interacción entre la radiación UV-Visible (zona del espectro electromagnético comprendida aproximadamente entre 200 y 800 nm) y la materia, dando origen al fenómeno conocido como absorción de la radiación [4].

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales [20].

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz I_0 (intensidad del rayo incidente) es atenuada hasta I (intensidad de luz que deja pasar la muestra). Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$) [20].

Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A), en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$) por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absorptividad, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente) [20].

1.4.1. Detección indirecta.

La detección indirecta se realiza no solo con el detector UV-Visible sino también con cualquier otro detector (fluorescencia, electroquímico).

La detección indirecta consiste en añadir al electrolito de separación una especie química que sea sensible al detector que se está utilizando. Una especie química que contenga cromóforos en el caso de espectrofotometría UV-visible. El paso del electrolito de separación y el cromóforo por el detector origina una señal de absorción constante proporcionando una línea paralela al eje de las abscisas. Los analitos transparentes desplazan físicamente, en la migración por el capilar, a las moléculas del cromóforo añadido haciéndose el volumen que ocupa cada analito más transparente que el analito de separación. De esta manera se obtendrán como señales analíticas lo que se denominan picos negativos. Sin embargo, si al detector se le invierte la polaridad entonces los electroferogramas mostrarán picos positivos como en el caso de la detección directa [4].

2. Validación.

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósitos perseguidos ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan.

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario para poder resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico [9].

El objetivo del método es el producir los mejores resultados analitos posibles y que sean confiables. Para obtener estos resultados, todas a variables del método deben ser consideradas [17].

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión. La validación puede incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte de muestras [9].

Por tanto la selección de los parámetros de validación para cada ensayo o método de prueba deben ser verificados casos por caso, para asegurar que los parámetros son apropiados para el uso que se pretende.

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación analítica [17].

El objetivo de la validación de un método es evaluar que el método es confiable. Es decir mediante un examen y evidencia objetiva, se confirma que cumple con los requisitos para su uso. La magnitud o rigor de la validación dependerá del propósito del método.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) ha clasificado los métodos analíticos en las siguientes categorías: [17]

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.) [17].

Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. En estas últimas, el interés es establecer si el analito, excede o no, un valor límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría [17].

Categoría III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en cápsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras) [17].

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés [17].

2.1. Guías Internacionales.

Entre las agencias reguladoras más importantes se tiene a nivel internacional la Food and Drug Administration (FDA) y la International Conference on Harmonization (ICH), a través de las Good Manufacturing Practices (GMP's) y Good Laboratory Practices (GLP's) [17].

Las guías de ICH (Comité Internacional de Armonización) Q2A (Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures) y la Q2B (Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology) además de algunas guías publicadas por la FDA como la (Guideline for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation), presentan una discusión de las características a considerar durante la validación de un procedimiento analítico, incluido como parte de las aplicación para el registro, aceptado dentro de la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos [17].

2.2. Definición de los parámetros de desempeño analítico.

El objetivo de un método analítico necesita estar perfectamente claro para saber las características que requieren ser evaluadas. Las características típicas de validación son: exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad), especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango [10].

Tabla No 2. Características de desempeño analítico.

Tipo de procedimiento analítico, características.	Identificación.	Prueba de impurezas		Ensayo; contenido/potencia, disolución, solo dediciones
		Cuantitativa.	Límites.	
Exactitud.	-	+	-	+
Precisión.				
Repetibilidad.	-	+	-	+
Precisión Intermedia.	-	+ ^a	-	+ ^a
Reproducibilidad.	-	+ ^b	-	- ^b
Especificidad.	+	+	+	+ ^c
Límite de detección.	-	+	+	-
Límite de cuantificación.	-	+	-	-
Linealidad.	-	+	-	+
Rango.	-	+	-	+

^a Puede ser necesitado en algunos casos.

^b No se necesita en algunos casos.

^c No se necesita si se realizó reproducibilidad.

2.2.1 Exactitud.

La exactitud es la proximidad acordada entre lo que se acepta como un valor verdadero (House Standard, International Standard) y el valor encontrado después de varias réplicas. El Promedio del recobro de fármaco deberá ser entre 98-102% del valor teórico [9].

2.2.2 Precisión.

La precisión de un método expresa la proximidad acordada entre una serie de mediciones obtenidas de la misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones analíticas [17].

La FDA clasifica la precisión en tres categorías: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

-
- Repetibilidad (precisión entre ensayos). Expresa la precisión bajo condiciones donde hay el mismo analista, el mismo equipo, un corto intervalo de tiempo e idénticos reactivos.
 - Precisión intermedia: La cual es determinada sin la variación de laboratorios, diferente día, deferentes analistas, diferentes equipos.
 - Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios (estudios de colaboración), cuando hay reactivos de diferente fuentes, diferentes analistas, análisis en diferentes días, equipos de diferentes manufacturas (marcas).

2.2.3. Identidad-Especificidad-Selectividad.

La identidad se establece cuando la señal producida en la etapa de medición puede ser atribuida únicamente al analito y no a la presencia de algo similar o la coincidencia [17].

La selectividad y la especificidad evalúan la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias; la segunda se considera por lo general como un 100% de selectividad [17].

La especificidad de un método analítico es la habilidad de medir precisamente un analito en la presencia de interferencias que se sabe están presentes en el producto: productos de degradación, excipientes, enantiómeros, ingredientes aditivos, impurezas, componentes de la matriz [17].

La selectividad de un método es la medida del límite al cual el método puede determinar un componente en particular en las matrices utilizadas sin la interferencia de otros componentes de la matriz [9].

Los términos especificidad y selectividad son frecuentemente intercambiables. Sin embargo, tanto la USP y la ICH actualmente usan el termino de especificidad [10].

2.2.4 Límite de detección.

Es la mínima concentración del analito que se puede detectar confiablemente cuando se aplica un método para el análisis de una muestra, aunque no existe un acuerdo universal sobre la terminología y existen varios criterios para su cuantificación. En algunos casos es suficiente brindar una indicación del nivel en el que la detección se torna menos confiable (Promedio de lectura de blancos del método más tres veces su desviación estándar), pero resulta conveniente aplicar una metodología más exacta [17].

2.2.5. Límite de cuantificación.

Es la cantidad más baja de analito que puede medirse confiablemente en una muestra con exactitud y precisión aceptable [9]

2.2.6. Linealidad.

Definición de linealidad. Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo) dentro de un intervalo dado [17].

Definición de intervalo. Es el intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica el método analítico [17].

Se debe determinar el intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede aplicar el método; esto se refiere a las concentraciones efectivamente medidas y no a las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentraciones el factor limitante es el valor del límite de detección; en el extremo superior el alcance depende de la respuesta del instrumento o de condiciones analíticas establecidas como óptimas. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un rango de respuesta lineal (intervalo lineal); los cálculos de regresión por si solos pueden ser insuficientes para establecer la linealidad; se debe complementar con una inspección visual de la línea y los residuos. La evaluación del intervalo de trabajo y del intervalo lineal permiten definir qué grado de calibración se requerirá al usar el método; en el intervalo lineal puede ser suficiente un punto de calibración para establecer la pendiente de la línea de calibración. En el resto del intervalo de trabajo será necesaria la calibración en múltiples puntos, preferiblemente más de seis. La respuesta del instrumento a la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que el método sea eficaz, pero la curva debe ser repetible cotidianamente [18].

2.2.7. Robustez.

La robustez es una medida de qué tan bien responde un método analítico ante una implementación no tan perfecta, ya que si ciertas etapas del método no se implementan con el suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre la efectividad del método. Generalmente este parámetro aplica para métodos desarrollados por el laboratorio, en los cuales se realizan variaciones deliberadas en el método y se cuantifica el efecto en el rendimiento. Por lo tanto es una variable que no necesariamente debe ser objeto de la validación cuando se utilizan métodos normalizados [18].

3. Clorhidrato de Memantina.

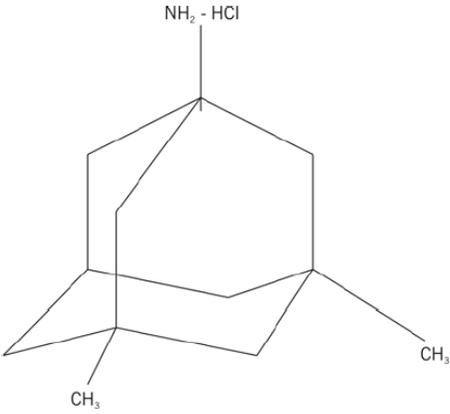
La memantina es un nuevo fármaco derivado de la amantadina que pertenece a la familia de los antagonistas de receptor de NMDA (N-metil-D-ácido aspártico). Los resultados de los análisis realizadas con la memantina han puesto de manifiesto que este fármaco, previene el deterioro y la muerte de las neuronas asociadas a una serie de enfermedades nerviosas degenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington y el dolor neuropático [21].

Memantina es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, de afinidad moderada y voltaje dependiente. Bloquea los efectos de los niveles tónicos de glutamato elevados patológicamente que pueden ocasionar disfunción neuronal. El mal funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica, en particular en los receptores NMDA, contribuye tanto a la expresión de los síntomas como a la progresión de la enfermedad hacia demencia neurodegenerativa [21].

3.1. Propiedades Físicoquímicas.

Las propiedades físicoquímicas de la molécula son parte importante para el desarrollo del método ya que estas marcan la pauta para conocer el tipo de detector que se utilizara, pH del soporte o búfer, disolvente para formar la solución, entre otras. En la tabla 3 se presentan algunas de sus propiedades.

Tabla No 3. Propiedades fisicoquímicas de memantina HCl [24].

Descripción	Polvo blanco cristalino e inodoro.
CAS	41100-52-1
Formula molecular	C ₁₂ H ₂₁ N·HCl
Formula estructural	 <p>Figura No 3. Fórmula estructural de memantina HCl[3].</p>
Peso molecular	215.76 g/mol
Nombre empírico	amino-3,5-dimetil-clorhidrato de adamantadina
Solubilidad	Muy soluble en agua
pka	10.79

3.2. Análisis químico.

No se logró encontrar métodos documentados en la FEUM, USP, o Farmacopea Británica para la determinación de clorhidrato de memantina en comprimidos o en alguna otra forma farmacéutica. Lo que da posibilidad de utilizar métodos ya existentes por electroforesis capilar de zona para otros análogos de la amantadina como lo es el clorhidrato de rimantadina es de gran uso en este momento.

3.3. Farmacocinética.

La memantina se absorbe bien tras su administración por vía oral y presenta una farmacocinética lineal después de alcanzar la concentración terapéutica. Su excreción es predominantemente renal, sin metabolizar y tiene una vida media de eliminación de 60-80 horas.

Absorción.

La memantina presenta una elevada biodisponibilidad por vía oral con concentraciones máximas (C_{max}) a las 3-8 horas. No hay indicios de la influencia de alimentos sobre la absorción de memantina [21].

Distribución.

Dosis diarias de 20 mg producen concentraciones plasmáticas constantes de memantina que oscilan entre 70 y 150 ng/ml (0,5-1 µmol/ml) con importantes variaciones interindividuales. Las concentraciones plasmáticas en el equilibrio estacionario tardan en alcanzarse unos 12 días. El volumen de distribución es de aproximadamente 9-11 L/kg. Alrededor del 45% de la memantina se encuentra ligada a proteínas plasmáticas [21].

Biotransformación.

La memantina experimenta poco biotransformación, el 80% de la memantina en suero aparece sin biotransformar. Los principales productos de biotransformación en humanos son N-3,5-dimetil-gludantato, la mezcla isomérica de 4- y 6-hidroximemantina y 1-nitroso-3,5-dimetil-adamantato, los cuales poseen mínima actividad antagonista NMDA.

La enzima hepática microsomal CYP450 no tiene un papel significativo en la biotransformación de la memantina, no detectándose in vitro ningún producto catalizado por este sistema del citocromo P450 [21].

Eliminación

La memantina se elimina fundamentalmente por vía renal (75-80%), con una semivida terminal de 60-80 horas. Sufre reabsorción tubular, probablemente mediada por proteínas transportadoras de cationes. El índice de eliminación renal de memantina en orina alcalina puede reducirse en un factor entre 7-9. La alcalinización de la orina se puede producir por cambios drásticos en la dieta, por ejemplo de carnívora a vegetariana, o por una ingesta masiva de tampones gástricos alcalinizantes [21].

4. Memantina vs Rimantadina.

Como ya se había mencionado la memantina y la rimantadina son análogos de la amantadina por la que la estructura y las propiedades fisicoquímicas son parecidas. Aunado a esto que existen métodos reportados para la determinación de clorhidrato de rimantadina por electroforesis capilar de zona.

Esto simplifica el trabajo puesto que las condiciones planteadas para la determinación de clorhidrato de rimantadina como son: el tipo de detector y tipo de detección, electrolito soporte (background electrolyte), pH y su concentración, longitud y diámetro del capilar serán puestos a desafío, además de que se optimizaran algunos otras condiciones que se plantearán más adelante.

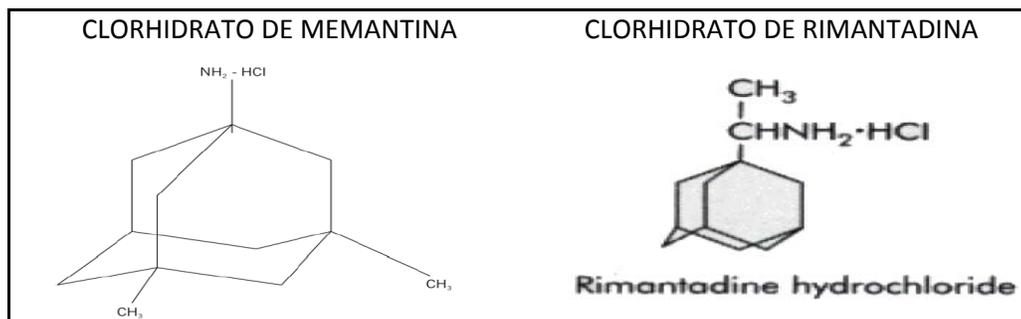


Figura No 4. Similitud entre la molécula de Memantina HCl y Rimantadina HCl.

5. Justificación.

El desarrollo de nuevos fármacos como es el caso del clorhidrato de memantina para la enfermedad del Alzheimer ha llevado a la creación de métodos analíticos para su cuantificación.

Este trabajo plantea la optimización y validación de un método analítico para la determinación y cuantificación de clorhidrato de memantina en comprimidos por electroforesis capilar de zona mediante detección indirecta a partir de las condiciones establecidas para la rimantadina.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar y validar un método analítico por electroforesis capilar de zona con detección indirecta para la determinación y cuantificación de clorhidrato de memantina en comprimidos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el uso, manejos, cuidados y fundamentos teóricos de un equipo de electroforesis capilar.
- Conocer las ventajas e impedimentos que tiene trabajar con una detección indirecta.
- Adecuar condiciones electroforéticas ya establecidas para la determinación de rimantadina para ser aplicadas en la determinación de clorhidrato de memantina.
- Validar el método evaluándolo con los parámetros estadísticos establecidos, en las guías de validación, como son adecuabilidad, especificidad, precisión, linealidad, exactitud y reproducibilidad.

III. METODO.

3.1. Equipo.

- Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter, con detector de arreglo de diodos DAD, acoplado a una computadora mediante el software 32 KARAT (Beckman Coulter, USA).
- Desionizador de agua tipo 1 (milliQ Plus Millipore[®], USA).
- Potenciómetro HI 931401, Hanna Instruments.
- Agitador Magnético (Thermolyne, MIRAKTM).
- Balanza Analítica (BOECO Alemania, 0.0001g de precisión).

3.2 Reactivos.

- 4-metil-bencilamina (Sigma-Aldrich).
- Ácido clorhídrico (JT Baker, grado reactivo analítico).
- Metanol (JT Baker, grado reactivo analítico).
- Materia prima: clorhidrato de memantina.
- Hidróxido de sodio, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México).

3.2. Optimización de método.

Preparación del electrolito soporte.

1. Medir 4 ml de etanol en un vaso de precipitado de 20 ml, adicionar 13 μ L de 4-metilbencilamina homogenizar, adicionar 15 ml de agua desionizada y con ayuda de una barra magnética, agitar y ajustar el pH a 9.0 con HCl. 1.0 N y 0.1 N (1 y 3 gotas aproximadamente), transferir a una matraz volumétrico de 20 ml y aforar con agua desionizada. Concentración final 50 mM.

Nota: la solución tiene una caducidad de 4 días bajo refrigeración.

Preparación del sistema de clorhidrato de memantina.

1. Pesar 20 mg de memantina HCl en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada (solución Stock).
2. Tomar 4 ml de la solución Stock, colocarlos en un matraz de 10 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [80 µg/ml].

3.4 Validación de método.

3.4.1 Adecuabilidad del sistema.

1. Pesar lo más aproximadamente exacto posible 20 mg de memantina HCl y colocarlos en una matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada (sol. Stock).
2. Con ayuda de una pipeta volumétrica tomar 4 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [80 µg/ml].
3. Realizar el análisis por sextuplicado.

3.4.2 Precisión del sistema.

1. Pesar lo más exactamente posible 20 mg de memantina HCl y colocarlos en una matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada (sol. Stock).
2. Con ayuda de una pipeta volumétrica tomar 4 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [80 µg/ml].
3. Repetir el paso anterior por sextuplicado con el fin de tener seis sistemas y realizar el análisis a cada sistema.

3.4.3 Especificidad.

1. Preparar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
2. Pesar lo más aproximadamente exacto 18.32 mg del placebo, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada (sol. A).
3. Con ayuda de una pipeta volumétrica tomar 4 ml de la solución A y transferirlos a un matraz volumétrico de 10 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada. Realizar el ensayo por triplicado.

3.4.4 Linealidad del sistema.

1. Pesar lo más aproximadamente exacto 20 mg de memantina HCl y colocarlos en una matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada (sol. Stock).
2. Tomar 1 ml de la solución Stock, colocarlo en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [20 µg/ml].
3. Tomar 2 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [40 µg/ml].
4. Tomar 3 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [60 µg/ml].
5. Tomar 4 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [80 µg/ml].
6. Tomar 5 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [100 µg/ml].
7. Tomar 6 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [120 µg/ml].
8. Repetir los pasos del 2 al 7 con el fin de tener 18 sistemas; realizar el análisis.

3.4.5 Linealidad del método.

1. Realizar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
2. Para la preparación del placebo cargado se pesaron lo más aproximadamente exacto 20 mg de memantina HCl y 18.32 mg del placebo; se colocaron en un vaso de precipitado, se agitaron por 5 min con ayuda de un magneto y filtrar.
3. El filtrado se colocó dentro de un matraz de 100 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada (sol. Stock).
4. Tomar 1 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [25 %].
5. Tomar 2 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [50 %].
6. Tomar 3 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [75 %].
7. Tomar 4 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [100 %].
8. Tomar 5 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [125 %].

-
9. Tomar 6 ml de la solución Stock, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [150 %].
 10. Repetir por triplicado del paso 2 al 9 con el fin de tener 18 niveles de medición y someterlos al análisis.

3.4.6 Exactitud y repetibilidad del método.

1. Realizar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
2. Para la preparación del placebo cargado se pesaron lo más exacto posible 20 mg de memantina HCl y 18.32 mg del placebo; se colocaron en un vaso de precipitado, se agitaron por 5 min con ayuda de un magneto y filtrar.
3. El filtrado se colocó dentro de un matraz de 100 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada (sol. A).
4. Tomar 3 ml de la solución A, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [75 %].
5. Tomar 4 ml de la solución A, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [100 %].
6. Tomar 5 ml de la solución A, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada, [125 %].

-
7. Repetir por sextuplicado del paso 2 al 6 con el fin de obtener 18 muestras; 6 al 75%, 6 al 100% y 6 al 125% de memantina HCl.

3.4.7 Precisión intermedia del método.

1. Realizar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
2. Para la preparación del placebo cargado se pesaron lo más exacto posible 20 mg de memantina HCl y 18.32 mg del placebo; se colocaron en un vaso de precipitado, se agitaron por 5 min con ayuda de un magneto y filtrar.
3. El filtrado se colocó dentro de un matraz de 100 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada (sol. A).
4. Tomar 4 ml de la solución A, colocarlos en una matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [100 %].
5. Repetir por triplicado los pasos del 2 al 4 con el fin de tener tres sistemas de medición.
6. El procedimiento anterior se debe realizar en dos días diferentes por dos analistas diferentes.

3.4.8 Robustez.

4. Realizar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
5. Para la preparación del placebo cargado se pesaron lo más exacto posible 20 mg de memantina HCl y 18.32 mg del placebo; se colocaron en un vaso de precipitado, se agitaron por 5 min con ayuda de un magneto y filtrar.
6. El filtrado se colocó dentro de un matraz de 100 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada (sol. A).
7. Tomar 4 ml de la solución A, colocarlos en un matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [100 %].
8. Repetir por triplicado los pasos del 2 al 4 con el fin de tener tres sistemas de medición.
9. El procedimiento debe realizarse a: condición normal y variando la concentración del electrolito soporte.

Nota: la condición variada se prepara de la siguiente forma.

- ✓ Medir 4 ml de etanol en un vaso de precipitado de 20 ml adicionar 11 μ L de 4-metilbencilamina homogenizar adicionar 15 ml de agua desionizada y con ayuda de una vara magnética, ajustar el pH a 9.0 con HCl 1.0 N y 0.1 N (1 y 3 gotas aproximadamente), transferir a un matraz volumétrico de 20 ml y aforar con agua desionizada.

3.4.9 Tolerancia.

1. Realizar 10 g de una mezcla que contenga los mismos componentes que el de la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (memantina HCl). (placebo).
2. Para la preparación del placebo cargado se pesaron lo más exacto posible 20 mg de memantina HCl y 18.32 mg del placebo; se colocaron en un vaso de precipitado, se agitaron por 5 min. con ayuda de un magneto y filtrar.
3. El filtrado se colocó dentro de un matraz de 100 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada (sol. A).
4. Tomar 4 ml de la solución A, colocarlos en un matraz volumétrico de 10 ml y llevar a la marca de aforo con agua desionizada [100 %].
5. Repetir por triplicado los pasos del 2 al 4 con el fin de tener tres sistemas de medición.
6. El procedimiento debe realizarse en dos equipos diferentes.

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Optimización del método.

Como ya se había mencionado, el presente trabajo no intenta desarrollar un método como tal, puesto que se toman algunas condiciones de métodos ya reportados para rimantadina, un compuesto de estructura muy similar a la memantina. Los datos obtenidos de los artículos [1-2] reportan las siguientes condiciones de análisis.

Tabla No 4. Resumen de condiciones reportadas en la literatura para Rimantadina HCl [1-2].

	ARTICULO 1	ARTICULO 2
Diámetro Interno del capilar	75 μ m	
Longitud total del capilar	43 cm	
Longitud efectiva al detector	36.5 cm	
Voltaje	20 kV	30 kV
Electrolito soporte	5 mM de 4-metilbenzil amina en 1:4 metanol – agua	
Tipo de inyección	Hidrodinámica	
Presión de inyección	1.5 psi	1.0 psi
Tiempo de inyección	5 s	10 s
Longitud de onda	210 nm	
Temperatura	--	25° C
pH del electrolito soporte	9.0	

El fin de adaptar el método es saber si las condiciones antes descritas son aplicables en la determinación de memantina, tratar de mejorar algunos aspectos si es posible y verificar que el sistema trabaje de forma confiable para posteriormente efectuar la validación.

4.1.1 pH del electrolito soporte.

El pH de corrida del electrolito soporte (búfer) es el parámetro más importante a manipular. Al elegir el pH del búfer se definen las cargas netas de los componentes de la muestra y por lo tanto la magnitud y dirección de sus movilidades dentro del capilar, bajo la influencia del flujo electroosmótico presente.

Las especies químicas presentes en la escala de pH se describen a continuación.

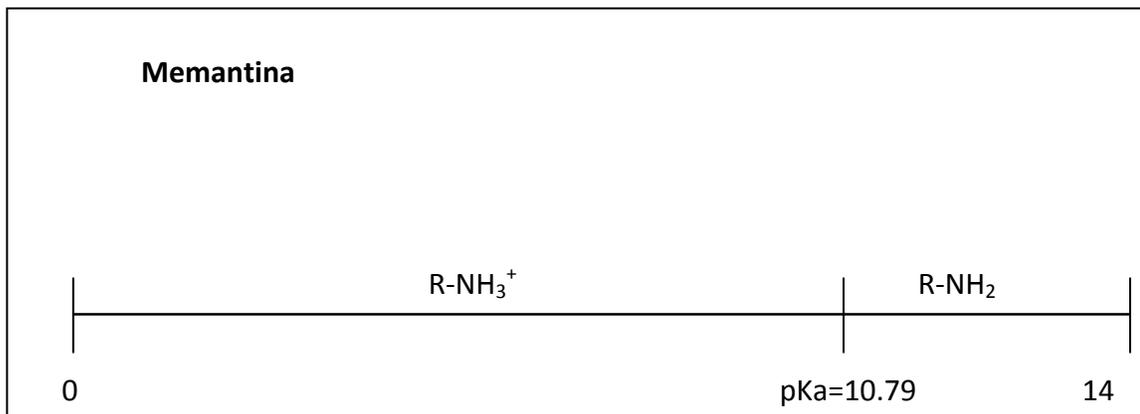


Figura No 5. Diagrama lineal de zonas de predominio para memantina en función del pH

En la figura 5 se observa que a un pH de 9.0 el fármaco está en estado ionizado, por lo que se espera que el analito salga antes que el flujo electroosmótico.

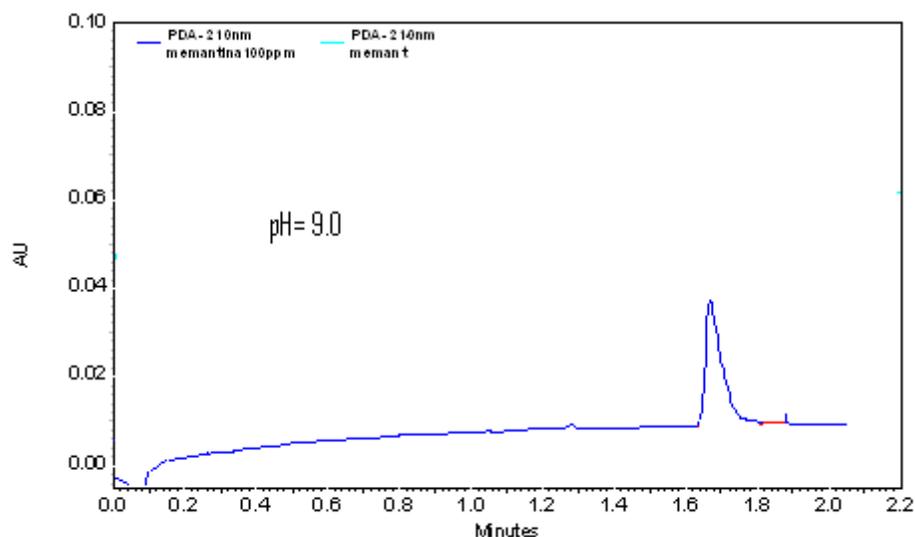


Figura No 6. Electroferograma para memantina a pH = 9.0

Condiciones: capilar de sílice fundida de 43 cm de longitud total, 36.5 cm de longitud efectiva, D. I. 75 μm , electrolito soporte 4-metilbencilamina 50 mM, inyección hidrodinámica 1.5 psi por 5 s, 20kV, inversión de la polaridad del detector (indirecta) 210 nm, 25° C.

Al saber que la variación de pH afecta la resolución de picos en una matriz, y que esta matriz solo contiene un analito no se llevó a cabo otro experimento para observar la influencia del pH; además que el tiempo de migración del analito es menor de 2.0 min por lo que se considera un buen tiempo de análisis.

4.1.3 Voltaje de separación.

La fuerza del campo eléctrico (E , voltios/cm) aplicada al capilar es el motor de la separación. La velocidad electroforética es directamente proporcional al campo eléctrico, por lo que un aumento en el voltaje proporcionará mayor rapidez (tiempos cortos) [4]. Aunque puede disminuir la resolución de los picos.

Con el fin de encontrar un voltaje óptimo de corrida que disminuyera los tiempos de análisis, pero que no afectara otros parámetros críticos como el C.V. (%) en tiempos y áreas, se inyectaron 12 muestra a voltajes de 20 y 30 kV a (0.5 psi, 5 s), cuyos resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla No 5. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función del voltaje de separación.

	30 kV		20 kV	
	tm	Área	tm	Área
Promedio	1.22	17967.25	1.92	27811.17
Desv. Est.	0.02	2531.54	0.02	2763.78
C.V. (%)	1.55	14.09	1.07	9.94

Los resultados indican que a un voltaje de 20 kV se obtiene un menor C.V. (%) para tiempos de migración y para áreas.

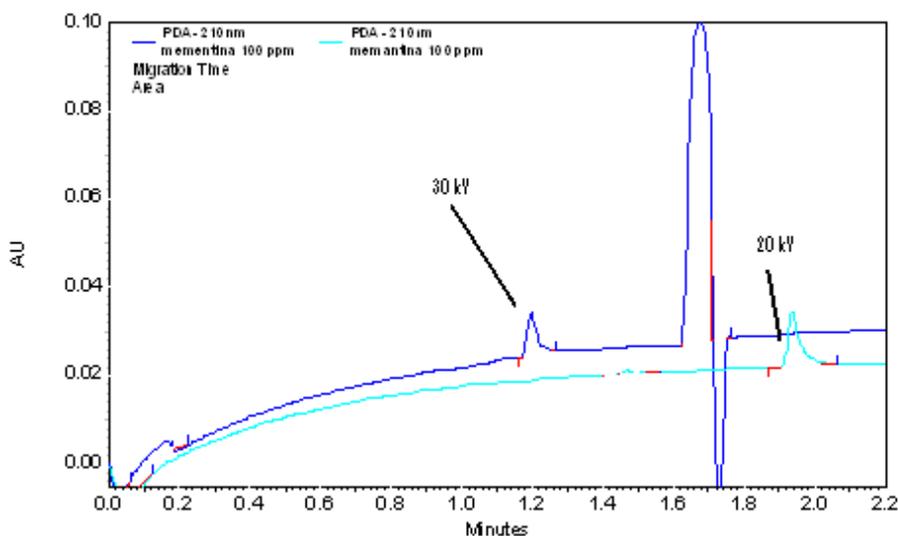


Figura No 7. Influencia del voltaje en la separación de memantina.

Condiciones: capilar de sílice fundida de 43 cm de longitud total, 36.5 cm de longitud efectiva, D. I. 75 μ m, electrolito soporte 4-metilbencilamina 50 mM, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, a 20 kV y 30kV, inversión de la polaridad del detector (indirecta) 210 nm, 25° C.

4.1.3 Volumen de inyección.

Debido a la discrepancia que existe en el volumen de inyección de la muestra entre las dos referencias de las cuales se fundamenta el trabajo ilustrada en la tabla 4, siendo la primera a una inyección hidrodinámica a 1.5 psi con una duración de 5 s. Y la segunda a 1.0 psi por 10 s., se realizó un experimento para conocer que con qué presión debería ser inyectada la muestra dejando constante el tiempo de la inyección a 5 s.

Tabla No 6. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina en función del volumen de inyección (resultados de 10 determinaciones).

	0.5 psi		1.0 psi		1.5 psi	
	tm	Área	tm	Área	tm	Área
Promedio	1.91	24358.70	1.87	50136.40	2.09	70269.20
Desv. Est.	0.02	2503.57	0.01	1472.52	0.03	804.09
C.V. (%)	1.03	10.28	0.65	2.94	1.61	1.14

Con los resultados obtenidos en esta prueba se demuestra que empleando una inyección hidrodinámica a 1.5 psi por 5 s, se mantienen tiempos de migración y áreas de pico reproducibles.

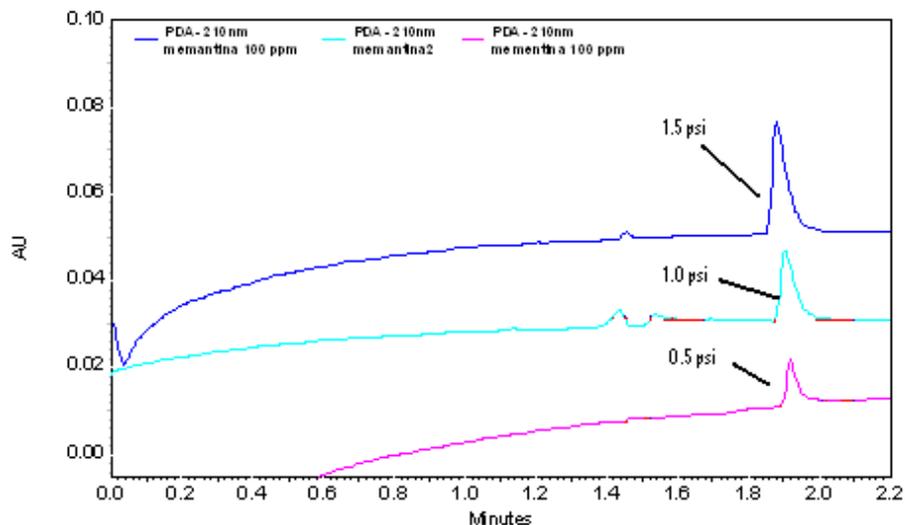


Figura No 8. Influencia del volumen de inyección en la separación de memantina.
 Condiciones: capilar de sílice fundida de 43 cm de longitud total, 36.5 cm de longitud efectiva,
 D. I. 75 μm , electrolito soporte 4-metilbencilamina 50 mM, inyección hidrodinámica 0.5, 1.0, 1.5 psi por
 5 s, a 20 kV, inversión de la polaridad del detector (indirecta) 210 nm, 20° C.

4.1.4 Efecto de la temperatura.

La temperatura ejerce un papel importante en muchas separaciones ya que la movilidad de los analitos y el FEO están relacionados con este parámetro; el uso de temperaturas altas disminuye el tiempo de análisis y mejora la forma de los picos, debido a la disminución de la viscosidad.

Durante la adaptación del método se encontró un problema en la repetibilidad del ensayo puesto que las áreas no eran semejantes en el transcurso del día y entre días. Posibles causas la temperatura del capilar y el ciclo del lavado del capilar. Por lo tanto se monto el experimento con la temperatura del capilar a 20 ° C y 25 ° C por dos días diferentes a diferentes horas.

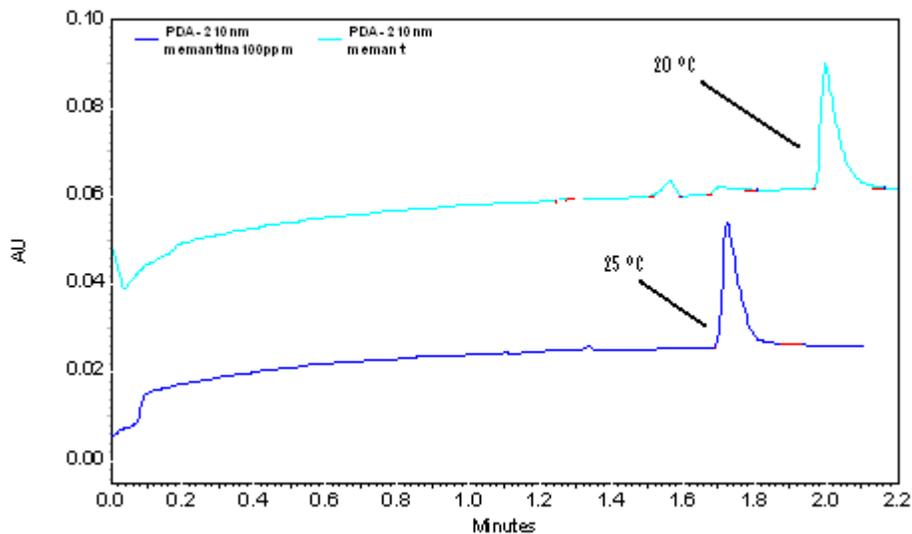


Figura No 9. Influencia de la temperatura del capilar en la separación de memantina.
 Condiciones: capilar de sílice fundida de 43 cm de longitud total, 36.5 cm de longitud efectiva,
 D. I. 75 μ m, electrolito soporte 4-metilbencilamina 50 mM, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, a
 20 kV, inversión de la polaridad del detector (indirecta) 210 nm, 20° C y 25 ° C.

Al determinar la variación existente entre cada lectura, se observa que al tener la temperatura a 20 °C la dispersión de los datos es mucho menor, que cuando hay una temperatura de 25 °C. Lo que permite una repetibilidad entre ensayos. Esto se observa en la tabla 7; los resultados de cada lectura de reportan en el anexo 1.

Tabla No 7. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función de la temperatura del capilar (Promedio de 6 muestras).

	25° C		20° C	
	Área	tm	Área	tm
Promedio	79201.33	1.76	77793.83	2.00
C.V. (%)	5.63	1.47	1.84	0.97

4.1.5 Ciclo de lavado.

Durante el desarrollo de un método es importante optimizar el ciclo de lavado del capilar para obtener resultados reproducibles. Cada método necesita un tiempo de acondicionamiento del capilar en función de la solución de separación que se esté empleando y la matriz utilizada [4].

Se realizó un experimento variando el tiempo de lavado del capilar entre inyecciones con el fin de observar el efecto que tiene este en la reproducibilidad de los resultados. Los resultados se observan en la siguiente tabla.

Tabla No 8. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función del tiempo de lavado del capilar entre corridas (Promedio de 10 muestras).

	2.0 min		2.5 min		3.0 min	
	Área	tm	Área	tm	Área	tm
Promedio	75405.30	2.30	75443.30	2.09	75264.40	2.13
C.V. (%)	3.65	2.72	0.86	0.98	0.89	0.71

Después de analizar los datos se concluyo que el mejor tiempo de lavado entre inyecciones es de 2.5 min.

Con este dato el ciclo de lavado del capilar durante la validación se realiza de la siguiente forma:

Tabla No 9. Ciclo de lavado del capilar para el análisis de memantina HCl.

Ciclo de lavado inicial (primer uso) Solo para capilares nuevos.	10 min Agua 20 psi 25°C. 10 min NaOH 0.1 N 20 psi 25°C. 20 min NaOH 0.1 N 20 psi 40 °C. 10 min Agua 20 psi 25°C. 10 min Búfer 20 psi 25°C.
Ciclo de lavado antes de cada sesión	10 min Agua 20 psi 20°C 10 min NaOH 0.1 N 20 psi 20°C 10 min Agua 20 psi 20°C. 10 min Búfer 20 psi 20°C
Ciclo de lavado entre muestras	2.5 min Búfer 20 psi 20 °C
Ciclo de lavado al finalizar la sesión.	10 min Agua 20 psi 25°C

Una vez analizados estos parámetros de la optimización del método, se determinó que las condiciones óptimas con las que se debía llevar a cabo la validación son:

- ❖ Búfer (electrolito soporte) 4-metilbencilamina 50 mM; pH 9.0.
- ❖ Longitud de onda 210 nm.
- ❖ Inyección hidrodinámica 1.5 psi, 5 s.
- ❖ Temperatura del capilar 20°C.
- ❖ Voltaje de separación 20kV.
- ❖ Tiempo de lavado entre corridas 2.5 min.

4.2. Validación del método analítico.

El presente trabajo tiene el propósito de cuantificar memantina HCl como contenido químico, por lo que los parámetros que se evaluaron para validación del método son:

- ✚ Adecuabilidad del sistema.
- ✚ Precisión del sistema.
- ✚ Especificidad.
- ✚ Linealidad del sistema.
- ✚ Exactitud y repetibilidad de método.
- ✚ Linealidad del método.
- ✚ Limite de detección.
- ✚ Limite de cuantificación.
- ✚ Precisión Intermedia.
- ✚ Robustez.
- ✚ Tolerancia.

Las condiciones electroforéticas establecidas a partir de la optimización del método y bajo las cuales se trabajó durante toda la validación del método, se encuentran reportadas a en la tabla 10.

Tabla No 10. Parámetros de análisis para memantina HCl por electroforesis capilar de detección indirecta.

Parámetros	Condición
Aparato de EC	P/ACE MDQ, Beckman Coulter Software de analysis 32 KARAT Detector de arreglo de diodos (DAD).
Capilar	Sílice fundida 43 cm de largo total. 36.5 cm de longitud efectiva. 75 µm de diámetro interno.
Búfer de corrida	4-metilbencilamina, 50mM, pH=9.0
Voltaje	20 kV
Modo de inyección.	Hidrodinámico (1.5psi por 5 s)
Tiempo de lavado entre corridas	2.5 min con búfer.
Longitud de onda	210 nm.
Detector	UV-Vis. Detección indirecta
Tiempo de migración.	Memantina HCl = 2.0 min.
Tempo total de corrida	2.5 min.
Parámetros de integración	Integración manual del pico 0.1 min antes del t_m y 0.2 min después del t_m .

4.2.1 Adecuabilidad del sistema.

Las pruebas de adecuabilidad del sistema se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. [17] Independientemente de las condiciones ambientales [11].

Por tanto se preparó una muestra equivalente al 100% (80 µg/ml) de la concentración del analito y se realizó la inyección de la muestra por sextuplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla No 11. Resultados del sistema de adecuabilidad de memantina.

CORRIDA	tm	Área
1	2.01	63082
2	2.03	63383
3	1.99	63549
4	1.98	63609
5	1.98	63324
6	2.01	62863
Promedio	2.00	63301.67
Desv. Est.	0.02	284.05
C.V. (%)	1.00	0.45

El coeficiente de variación para las áreas y para el tiempo de migración son menores del 2% por lo que se considera que el sistema electroforético funciona correctamente independientemente de las condiciones ambientales.

4.2.2 Precisión del sistema.

El sistema: analista, equipo e instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc. originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica (absorbancia, transmitancia, mililitros consumidos, área del pico, altura del pico, área relativa, peso, entre otros), que en general es aditiva a la del método, por lo que, es importante verificar, que su valor no sea una fuente importante de la variabilidad. [17].

Se prepararon seis soluciones diferentes; de una concentración que equivale al 100% (80 µg/ml) de la concentración de la muestra a partir de una solución stock. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla No 12. Resultados de precisión del sistema de memantina.

SISTEMA	tm	Área
1	2.00	61685
2	2.02	61381
3	2.04	63257
4	2.05	62390
5	2.01	62863
6	2.00	63324
Promedio	2.02	62483.33
Desv. Est.	0.02	813.71
C.V. (%)	1.04	1.30

Ya que la precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones de sistema ya establecidas, con base a los resultados que se observan en la tabla 12 y de acuerdo con los criterios de aceptación se considera que el sistema es preciso.

4.2.3 Especificidad.

La determinación de la especificidad del método confirma que la medida de la señal es debida solamente al analito. Para determinar este parámetro, se analizó una solución estándar de 80 µg/ml, un placebo cargado al 100 % (80 µg/ml) y una solución placebo con y sin recubrimiento.

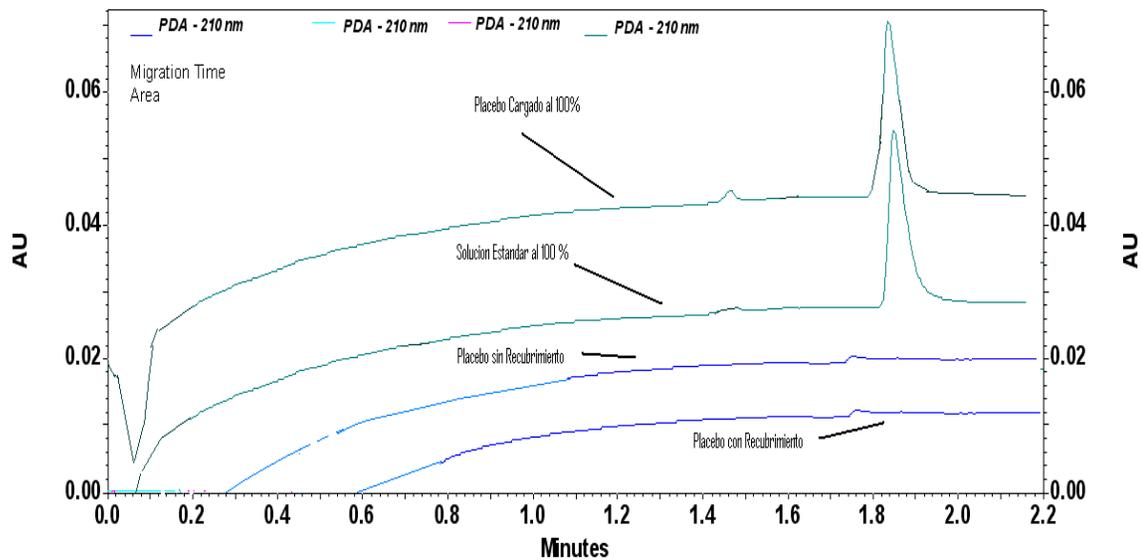


Figura No. 10. Comparación de resultados para un placebo con y sin recubrimiento, una solución estándar y un placebo cargado al 100 %. Condiciones: capilar de sílice fundida de 43 cm de longitud total, 36.5 cm de longitud efectiva, D. I. 75 μ m, electrolito soporte 4-metilbencilamina 50 mM, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, a 20 kV, inversión de la polaridad del detector (indirecta) 210 nm, 20° C.

En la figura 10 se observa que los componentes de la formulación no interfieren con la señal generada por el analito, por lo que se considera que el método es específico para memantina.

4.2.4 Linealidad del sistema.

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito (o sus transformaciones matemáticas) no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificar la linealidad bajo la condiciones del laboratorio [9].

Este concepto generalmente se denomina “curva de calibración” y es parte esencial de varios métodos analíticos en las determinaciones cuantitativas del analito [5].

La linealidad del sistema se determinó por medio de la preparación por triplicado de una curva de calibración de seis niveles de concentración a partir de una solución estándar, en un rango de 20 µg/ml a 120 µg/ml (25%-150%) para Memantina HCl.

En la tabla 13 se puede apreciar que los tiempos de migración no presentan una diferencia significativa entre ellos.

Tabla No 13. Resultados de linealidad del sistema para memantina HCl.

REPETICIÓN	NIVEL (%)	CONC. (µg/ml)	ÁREA	tm
1	25	20	15915.00	2.073
2			16128.00	2.065
3			14897.00	2.045
1	50	40	31687.00	2.070
2			30194.00	2.052
3			31843.00	2.082
1	75	60	47460.00	2.082
2			47705.00	2.058
3			45492.00	2.060
1	100	80	60789.00	2.042
2			63494.00	2.054
3			63704.00	2.019
1	125	100	79005.00	2.045
2			76086.00	2.052
3			79635.00	2.063
1	150	120	94777.00	2.052
2			95071.00	2.049
3			91384.00	2.080
			Promedio	2.058
			Desv. Est.	0.016
			C.V. (%)	0.782

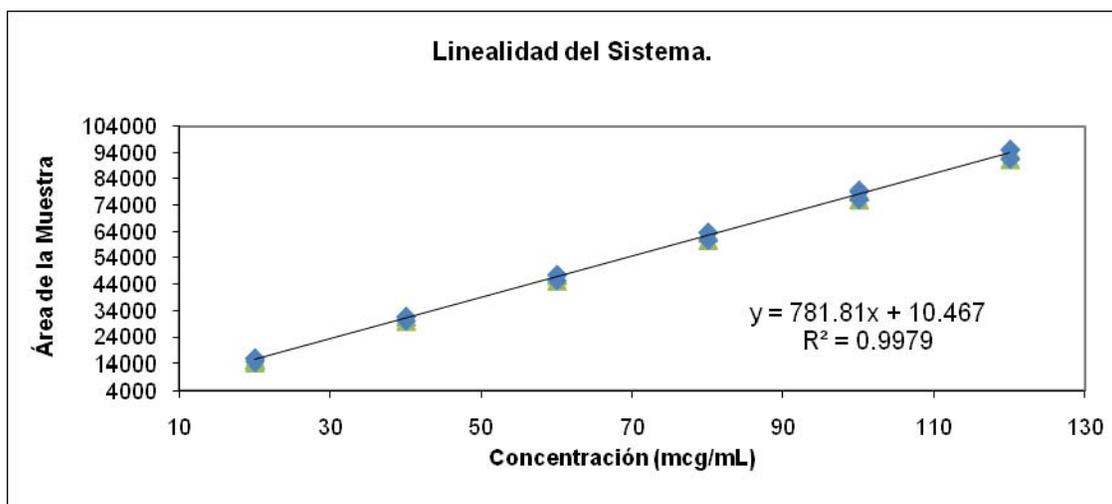


Gráfico No. 1. Relación de la concentración en función de la respuesta analítica (área de pico), ecuación de la línea y el coeficiente de correlación.

Cuando se tiene una variable dependiente o respuesta y k variables independientes o de regresión, la relación entre estas variables se caracteriza por un modelo matemático conocido como ecuación de regresión. El modelo de regresión se ajusta a un conjunto de datos.

En el gráfico 1, se puede observar que existe un comportamiento lineal entre la concentración de memantina y el área (respuesta analítica), es decir, que el área es proporcional a la concentración. Una forma adicional de demostrar que la respuesta es debida a la concentración del analito, es a través de un análisis de variancia (*se utiliza variancia por ser la mejor traducción de varianza al español*).

Se realizo un análisis de variancia para determinar que los datos se ajustan a un modelo lineal.

Para establecer hipótesis relacionadas con la significación de la regresión, se debe proponer que:

H_0 = Los datos no se ajustan a un modelo lineal.

H_a = Los datos se ajustan a un modelo lineal.

Tabla No 14. Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad de memantina con un nivel de significancia del 95% de confianza.

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	12835686217	12835686217	7781.2826	6.17886E-23
Residuos	16	26392946.78	1649559.174		
Total	17	12862079164			

El análisis de variancia (tabla 14), muestra que el valor de crítico de F es menor que el valor de F calculada, por lo que se rechaza hipótesis nula. Por lo que los datos de concentración de memantina en función del área de pico se ajustan a un modelo lineal.

En resumen los parámetros estadísticos más importantes de la regresión se para memantina, se muestran en la tabla 15.

Tabla No 15. Parámetros obtenidos de la regresión lineal del sistema de memantina.

PARÁMETRO	RESULTADO
R^2	0.997
Pendiente (m)	781.8
Intercepto (b)	10.46
IC (B_1)	763.02-800.60

4.2.5 Exactitud y repetibilidad del método.

Para evaluar la exactitud y repetibilidad del método se preparó un placebo analítico con los componentes incluidos en la formulación. A la cantidad de placebo analítico se adicionó la cantidad correspondiente al 75%, 100%, 125%, a concentraciones de 60 – 100 $\mu\text{g/ml}$ de memantina, por sextuplicado, el mismo día y el mismo analista, bajo las condiciones normales de operación. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 16.

Tabla No 16. Resultados del exactitud y repetibilidad del sistema para memantina.

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
75%	0.60	0.593	98.79
		0.599	99.91
		0.592	98.59
		0.592	98.73
		0.602	100.30
		0.592	98.25
100%	0.80	0.802	100.29
		0.797	99.66
		0.798	99.79
		0.808	100.99
		0.802	100.20
		0.802	100.27
125%	1.00	0.996	99.60
		0.982	98.23
		0.991	99.10
		0.996	99.60
		0.995	99.51
		0.996	99.58
		Promedio	99.52
		Desv. Est.	0.77
		C.V. (%)	0.78
		IC (μ)	99.14-99.91

En la tabla 16 se observa que el promedio aritmético para el porcentaje de recobro para memantina se encuentra dentro del intervalo establecido (98% - 102 %), además que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor de 2.0 %. Por lo que cumple con los criterios de aceptación, por lo tanto es un método exacto y repetible.

El análisis estadístico se encuentra en el anexo 2.

4.2.6 Linealidad del método.

Si un químico analítico desarrolla un método nuevo para la determinación de un analito en concreto, el método debe ser validado (entre otras pruebas) aplicándolo a un número de muestras que contengan una concentración ya conocida. El interés principal al realizar una comparación entre la cantidad conocida y la recuperada por el método analítico será la identificación de errores sistemáticos, es decir, conocer si el método analítico proporciona resultados significativamente más altos o más bajos que la cantidad conocida. Queda claro que si cada resultado obtenido del método conduce a un resultado idéntico a la cantidad de analito conocida, la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen 0, y una pendiente y coeficiente de correlación de 1. En la práctica, por supuesto, esto casi nunca ocurre: incluso estando completamente ausentes de errores sistemáticos, los errores aleatorios aseguran que los resultados del método analítico no darán resultados en exacta concordancia para todas las muestras [11].

La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de la concentración de placebos cargados en un rango de concentración de 20 -120 $\mu\text{g/ml}$ para memantina HCl, por triplicado en el mismo día por el mismo analista.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17.

Tabla No 17. Resultados de linealidad del método para memantina HCl.

No	Nivel	tm (min)	Cantidad adicionada (mg)	Área	Concentración recuperada (ug/ml)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro
1	25%	2.061	0.2000	15615	19.86	0.1986	99.285
2		2.059	0.2000	15718	19.99	0.1999	99.94
3		2.048	0.2000	15697	19.96	0.1996	99.81
4	50%	2.081	0.4000	31387	39.91	0.3991	99.78
5		2.049	0.4000	31394	39.92	0.3992	99.81
6		2.082	0.4000	31043	39.48	0.3948	98.69
7	75%	2.082	0.6000	46960	59.72	0.5972	99.53
8		2.08	0.6000	46705	59.39	0.5939	98.99
9		2.059	0.6000	46892	59.63	0.5963	99.39
10	100%	2.039	0.8000	62689	79.72	0.7972	99.65
11		2.09	0.8000	62494	79.47	0.7947	99.34
12		2.038	0.8000	62304	79.23	0.7923	99.04
13	125%	2.037	1.0000	78905	100.34	1.0034	100.34
14		2.06	1.0000	78886	100.32	1.0032	100.32
15		2.029	1.0000	77935	99.11	0.9911	99.107
16	150%	2.038	1.2000	93907	119.42	1.1942	99.515
17		2.06	1.2000	93671	119.12	1.1912	99.27
18		2.09	1.2000	94384	120.02	1.2002	100.02
Promedio		2.06					99.55
Desv. Est.		0.02					0.46
C.V. (%)		0.97					0.46

En la tabla 17 se observa que el coeficiente de variación del Promedio aritmético del porcentaje de recobro esta dentro del rango de 98 - 102 %; y es menor a 2 %. Por lo que cumple los parámetros de aceptación.

Una vez calculada la cantidad recuperada se construyo un grafico de cantidad adicionada vs cantidad recuperada, los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 2.

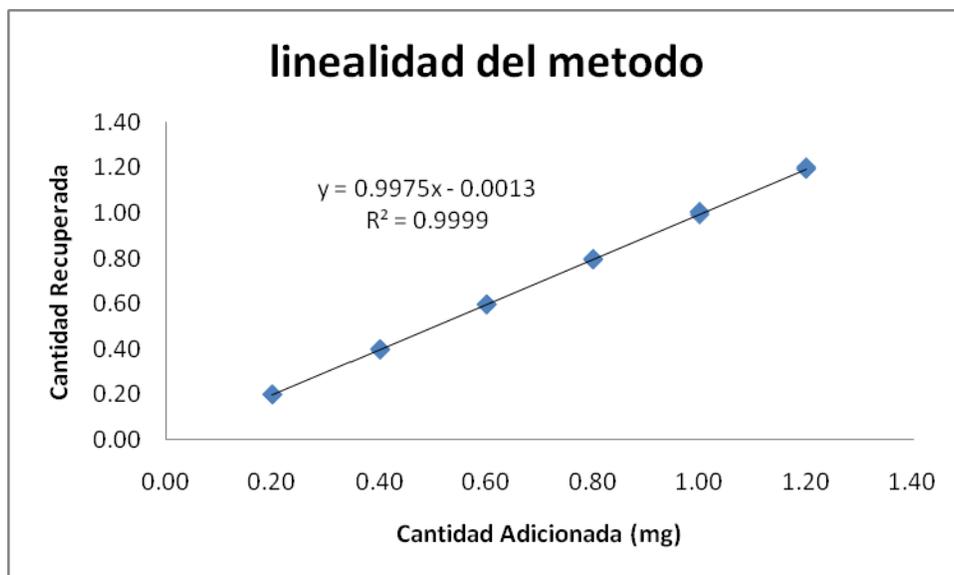


Grafico No. 2. Relación de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada, ecuación de la línea y el coeficiente de correlación.

Considerando la concentración medida como variable Y, y la concentración adicionada como la variable X, se debe calcular la pendiente y el intercepto de la línea de regresión.

En el grafico 2 se observa que el coeficiente de determinación es mayor de 0.98, un valor de la ordenada al origen diferente de cero y un valor de la pendiente muy cercano a uno. Los demás parámetros estadísticos se muestran a continuación.

Tabla No 18. Parámetros estadísticos para la linealidad del método para memantina.

PARAMETRO	RESULTADO
R^2	0.9999
Pendiente (m)	0.9975
Intercepto (b_0)	-0.00126
C.V. y/x (%)	0.5357
IC (B_1)	1.0029-0.9920
IC (B_0)	-0.00552-0.00299
C.V. (%)	0.457
IC (μ)	99.318-99.771

En la tabla 18 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal, además de que se determinó el intervalo de confianza para la pendiente, la ordenada al origen y del porcentaje de recobro, todos estos parámetros cumplen con los criterios de aceptación.

Además de los antes ya descrito se realizó un análisis de variancia al 95 % de confianza para asegurar que los datos se ajustan a un modelo lineal.

Tabla No 19. Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad de clorhidrato de memantina con un nivel de significancia del 95% de confianza.

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2.08962583	2.0896258	149835.56	3.3173E-33
Residuos	16	0.00022314	0.0000139		
Total	17	2.08984897			

Se puede observar que el valor calculado de F es mayor que el valor crítico de F por lo que se tiene la confianza al 95 % que los datos se ajustan a un modelo lineal.

Después de analizar los datos se determinó que el método cumple con los parámetros de linealidad establecidos.

4.2.7 Precisión intermedia del método.

La estimación de esta cualidad del método permite investigar, el efecto del analista y del día, así como estimar la variabilidad entre analistas (reproducibilidad inter-analistas) y, la variabilidad entre días (reproducibilidad inter-días) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad). Esta prueba es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de precisión del método a esas fuentes de variación.

La precisión intermedia del método se evaluó mediante la estimación por triplicado del porcentaje de recobro a partir de muestras al 100 % de memantina en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20.

Tabla No 20. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro de memantina obtenidos en dos días y por dos analistas.

MEMANTINA HCl	% RECOBRO		C.V. (%)
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	
DIA1	100.98	100.80	0.91
	98.90	99.56	
	99.36	98.76	
C.V. (%)	1.09	1.03	
DIA2	100.38	101.19	0.91
	99.13	99.84	
	98.69	100.63	
C.V. (%)	0.88	0.68	
		C.V. (%) GLOBAL	0.91

En la tabla 20. Se observa que el día y el analista no son fuentes de variación en la reproducibilidad del método, ya que en ambos casos los coeficientes de variación

del porcentaje de recobro de memantina HCl obtenidos en diferentes días por diferentes analistas es menor a 2%.

4.2.8 Robustez para la concentración del electrolito soporte.

La prueba de robustez ayuda a determinar que tan fuerte es el método, si una implementación no tan perfecta en alguna etapa del ensayo, tiene un efecto severo sobre la efectividad del método.

La robustez del método mediante la estimación por triplicado del porcentaje de recobro a partir de placebos cargados al 100 %, variando la preparación del electrolito soporte:

Condición normal: Medir 4 ml de etanol en un vaso de precipitado de 20 ml adicionar 13 μ L de 4-metilbencilamina homogenizar adicionar 15 ml de agua desionizada y con ayuda de una vara magnética, ajustar el pH a 9.0 con HCl 1.0 N y 0.1 N (1 y 3 gotas aproximadamente), transferir a una matraz volumétrico de 20 ml y aforar con agua desionizada.

Condición variada (1): Medir 4 ml de etanol en un vaso de precipitado de 20 ml adicionar 11 μ L de 4-metilbencilamina homogenizar adicionar 15 ml de agua desionizada y con ayuda de una vara magnética, ajustar el pH a 9.0 con HCl 1.0 N y 0.1 N (1 y 3 gotas aproximadamente), transferir a una matraz volumétrico de 20 ml y aforar con agua desionizada.

Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla No 21. Resultados de porcentaje de recobro para diferentes concentraciones de electrolito soporte.

<i>No</i>	<i>CONDICIONES</i>	
	<i>Normal</i>	<i>Variada</i>
<i>1</i>	100.39	98.86
<i>2</i>	99.77	100.15
<i>3</i>	99.56	98.26
Promedio	99.91	99.09
Desv. Est.	0.43	0.97
C.V. (%)	0.43	0.98

Diferencias absolutas

$$|di|C1 = |99.906\% - 99.093\%| = 0.813\%$$

La tabla 21 demuestra que las diferencias absolutas entre la variación de de la concentración del electrolito soporte es menor a 2 %, por lo que cumple los criterios de aceptación para robustez en términos del cambio en la concentración del electrolito soporte.

4.2.9 Tolerancia.

Para la prueba de tolerancia se deben establecer aquellos factores ajenos al método como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso.

Se determino la tolerancia del método mediante el ensayo por triplicado de placebo cargado al 100 % de memantina HCl, realizándose en diferentes equipos.

Los resultados se muestran a continuación.

Tabla No 22. Resultados de porcentaje de recobro de dos equipos para memantina HCl.

No	Condiciones	
	Normal	No 1
1	99.25	98.66
2	100.73	98.07
3	98.11	98.13
Promedio	99.36	98.29
Desv. Est.	1.31	0.32
C.V. (%)	1.32	0.33

Tabla No 23. Promedio y coeficiente de variación de las seis determinaciones del porcentaje de recobro en los equipos utilizados.

Promedio	99.0780
Desv. Est.	1.1692
C.V. (%)	1.18

La tabla No 23 muestra que el coeficiente de variación entre las seis determinaciones es menor de 2%; por lo que cumple con el criterio de aceptación.

4.2.10 Limite de detección (LD).

Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión.

Se determino el límite de detección en base a la curva de calibración y la desviación estándar de regresión mediante la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_i}$$

Sustituyendo datos en fórmula:

$$LD = \frac{3.3 \times 1284.4}{781.81}$$

$$LD = 5.42 \text{ mcg/ml.}$$

Los datos de $S_{y/x}$, b_i se encuentran en el anexo 2 en la parte de linealidad del sistema.

4.2.10 Limite de cuantificación (LC).

Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión.

Se determino el límite de cuantificación en base a la curva de calibración y la desviación estándar de regresión mediante la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_i}$$

Sustituyendo datos en fórmula:

$$LC = \frac{10 \times 1284.4}{781.81}$$

$$LC = 16.43 \text{ mcg/ml.}$$

Los datos de $S_{y/x}$, b_i se encuentran en el anexo 2 en la parte de linealidad del sistema.

Las formulas de LD y LC se obtuvieron de la guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio de QFB's

Tabla No 24. Resumen de los resultados de la validación del método para memantina HCl.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado	Observación
Adecuabilidad	C.V. (%) \leq 2 % para la respuesta analítica.	C.V. (%) = 0.45	Aprobado.
Precisión del sistema	C.V. (%) \leq 1.5 % para la respuesta analítica.	C.V. (%) = 1.3	Aprobado.
Linealidad del sistema	$R^2 \geq 0.98$. IC (β_1) no debe incluir el cero.	$R^2 = 0.997$. IC (β_1) = 763.02 – 800.06.	Aprobado.
Especificidad	La respuesta analítica debe ser debida al analito.	No hay interferencia de los excipientes con el analito.	Aprobado.
Exactitud y repetibilidad	IC(μ) debe incluirse en el intervalo de 98 -102 % C.V. (%) de recobro \leq 2 %.	IC (μ) = 99.139 – 99.906 %. C.V. (%) = 0.775.	Aprobado.
Linealidad del método	<i>Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.</i> $R^2 \geq 0.98$. IC (β_1) debe incluir la unidad. IC (β_0) debe incluir el cero. C.V. (%) _{x/y} del porcentaje de recobro \leq 2 %.	$R^2 \geq 0.9989$. IC (β_1) = 0.9920 - 1.0029. IC (β_0) = -0.00552 – 0.00299. C.V. (%) _{x/y} = 0.5357%.	Aprobado.
	<i>Porcentaje de recobro.</i> IC (μ) debe incluirse en el intervalo de 98 -102 %. C.V. (%) de recobro \leq 2 %.	IC (μ) = 99.318 – 99.171. C.V. (%) =0.457 %.	Aprobado.
Precisión intermedia	C.V. (%) \leq 2 %.	C.V. (%) =0.91 %.	Aprobado.
Robustez	$ di Cl \leq 2$ %.	$ di Cl = 0.813$ %.	Aprobado.
Tolerancia	C.V. (%) \leq 2 %.	C.V. (%) =1.18 %.	Aprobado.

V. CONCLUSIONES

Se optimizó un método analítico para la cuantificación de memantina HCl por la técnica de electroforesis capilar con detección indirecta. Las condiciones óptimas para el análisis son: búfer (electrolito soporte) 4-metilbencilamina 50 mM; pH 9.0, longitud de onda 210 nm, longitud efectiva del capilar 36.5 cm, D.I. 75 μ m, inyección hidrodinámica 1.5 psi, 5 s, temperatura del capilar 20°C, voltaje de separación 20kV, tiempo de lavado entre corridas 2.5 min con búfer.

Se realizó la validación del método analítico para la determinación de contenido químico de memantina HCl, evaluándose los parámetros de: adecuabilidad, precisión, linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud y repetibilidad, precisión intermedia, robustez y tolerancia. Todos los parámetros estadísticos evaluados cumplen con los criterios especificados en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB's, por lo que el método desarrollado cumple adecuadamente con la validación y puede proponerse para la cuantificación de memantina HCl, en comprimidos a nivel industrial.

VI. Referencias.

Artículos de revistas.

- [1] J. Pazourek, A. L. Revilla. Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for Determination of Rimantadine Hydrochloride in Rimantadin 100 Tablets and the Method Application to Dissolution Test Monitoring. *Drug Development and Industry Pharmacy*. **(2004)**. Vol. 30, No. 2, pp. 125-134.
- [2] Revilla A. L., J. Hamacek. Determination of Rimantadine in Pharmaceutical Preparations by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Determination or after Derivation. *Chromatographia*. **(1998)**. Vol 47. No. 7/8. pp. 433-439.
- [3] V. Fernández Gallego, I. Prieto, J.L. Sandoval, J. Honorato. Memantina. Nuevos medicamentos. *REV MED UNIV NAVARRA/VOL 48, Nº 1 (2004)*. pp 42-46.

Libros.

- [4] FERNANDEZ, A. G.; Segura A. C. **(2005)**. Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección. Eug. Granada.
- [5] ADAMOVIĆ, J. A. "Chromatographic analysis of pharmaceutical. Chromatographic science series". Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, USA, Vol. 74.
- [6] CASTILLO, R.M.A., Revilla, V. A. L, López, A. R. **(2002)**. Fundamentos sobre electroforesis capilar. UNAM. Mexico.
- [7] DALE, R. Baken. **(1995)**. Capillary Electrophoresis. Wiley-Interscience Publication. USA.
- [8] PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. **(2008)** Ed. 54. Thomson PLM, S.A. de C.V. México.
- [9] CHOW, C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X. M. **(2004)**. Analytical method validation and instrument performance verification. Editorial Wiley-Interscience. USA.
- [10] CARTENSEN, J. T., Rhodes, C. T. **(2000)**. Drug stability. Principles and practices. Tercera Edición. Editorial Marcel Dekker, USA, Vol. 107.
- [11] MILLAR, N. James; Millar, C. Jane. (2002). Estadística y Quimiometría para química analítica. Cuarta Edición. Prentice Hall, España.

Guías y normas.

- [12] Guía de Validación de Métodos Analíticos. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. 2002.
- [13] ICH Q2A. Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures. Octubre 1994.
- [14] ICH Q2B. Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology, Availability. Noviembre 1996.
- [15] FDA. Guideline for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. August 2000.
- [16] Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimiento de la Industria Químico Farmacéutica Dedicados a la Fabricación de Medicamentos 2008.

Páginas web.

- [17] Validación de Métodos Analíticos. Recomendaciones para su Presentación ante la FEUM. Consulta Pública 2007-3.
www.farmacopea.org.mx/consulta/estad/EST001.doc
- [18] <http://www.scribd.com/doc/4925527/porque-validar-metodos-analiticos>
- [19] http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-14/skoog/30.html
- [20] http://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_ultravioleta-visible.
- [21] <http://www.hipocampo.org/memantina.asp>
- [22] <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m071.htm>
- [23] http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis (octubre 2008)
- [24] http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9232635.htm

Tesis.

- [25] Fundamentos de electroforesis capilar. Castillo Rodríguez Miriam. Tesis Licenciatura Q.F.B. FESC-UNAM, México, 2000.

VII. ANEXO 1

Tabla No 25. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función del voltaje de separación a una inyección de 0.5 psi, 5 s, 25 °C.

# de corrida	0.5 psi 5 s			0.5 psi 5 s		
	Voltaje	tm	Área	Voltaje	tm	Área
1	30	1.196	17544	20	1.913	27160
2	30	1.208	18266	20	1.879	23878
3	30	1.208	19267	20	1.888	27652
4	30	1.208	17341	20	1.900	30969
5	30	1.217	16914	20	1.913	23100
6	30	1.208	24977	20	1.908	30935
7	30	1.233	14674	20	1.917	28904
8	30	1.238	16444	20	1.921	25354
9	30	1.242	17144	20	1.938	26778
10	30	1.242	17856	20	1.942	27498
11	30	1.246	18961	20	1.938	30267
12	30	1.25	16219	20	1.938	31239
	Promedio	1.225	17967.250	Promedio	1.916	27811.167
	Desv. Est.	0.019	2531.541	Desv. Est.	0.021	2763.777
	C.V. (%)	1.545	14.090	C.V. (%)	1.072	9.938

Tabla No 26. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función del volumen inyección a 20kV, 25 °C.

# de corrida	Voltaje	0.5 psi		1 psi		1.5 psi	
		tm	Área	tm	Área	tm	Área
1	20	1.913	20362	1.85	50196	2.1	69794
2	20	1.879	26598	1.854	49138	2.11	70707
3	20	1.888	23569	1.858	49092	2.05	70638
4	20	1.9	23546	1.871	53974	2.05	69389
5	20	1.913	26987	1.867	50736	2.05	70104
6	20	1.908	25368	1.863	50178	2.1	71644
7	20	1.917	26548	1.871	50178	2.12	70767
8	20	1.921	26589	1.875	49310	2.1	70965
9	20	1.938	23655	1.883	49587	2.15	69095
10	20	1.942	20365	1.888	48975	2.11	69589
	Promedio	1.912	24358.700	1.868	50136.400	2.094	70269.200
	Desv. Est.	0.020	2503.574	0.012	1472.523	0.034	804.085
	C.V. (%)	1.033	10.278	0.653	2.937	1.611	1.144

Tabla No 27. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función de la temperatura del capilar a 20 kV, inyección hidrodinámica 1.5 psi, 5s.

corrida	Día	Hr.	25° C		20° C	
			Área	Tm	Área	Tm
1	1	0	81003.000	1.767	77941.000	1.970
2	1	1	83217.000	1.725	75616.000	2.020
3	1	3	85063.000	1.733	76487.000	1.990
4	2	0	75677.000	1.788	79075.000	2.010
5	2	1	75389.000	1.775	78997.000	2.000
6	2	3	74859.000	1.779	78647.000	2.020
Promedio			79201.333	1.761	77793.833	2.002
Desv. Est.			4461.869	0.026	1434.526	0.019
C.V. (%)			5.634	1.473	1.844	0.970

Tabla No 28. Comparación de la variación en los tiempos de migración y áreas de memantina HCl en función del tiempo de lavado entre corridas a 20 kV, 20 °C, 1.5 psi, 5s.

corrida	tiempo de lavado 2.0 min		tiempo de lavado 2.5min		tiempo de lavado 3.0 min	
	Área	tiempo	Área	Tiempo	Área	Tiempo
1	70941	2.237	76932	2.075	75632	2.133
2	75616	2.350	75352	2.071	74367	2.120
3	76487	2.379	75025	2.071	75164	2.122
4	76075	2.362	75031	2.075	75942	2.120
5	77997	2.308	75997	2.075	76258	2.125
6	79647	2.313	74524	2.087	74053	2.120
7	73961	2.329	75264	2.102	75265	2.150
8	75987	2.233	75569	2.138	75254	2.150
9	76267	2.221	75487	2.083	75657	2.121
10	71075	2.217	75252	2.090	75052	2.100
Promedio	75405.300	2.295	75443.300	2.087	75264.400	2.126
Desv. Est.	2753.185	0.062	650.443	0.021	671.960	0.015
C.V. (%)	3.651	2.717	0.862	0.984	0.893	0.706

VIII. ANEXO 2

Tabla No 29. Análisis estadístico de adecuabilidad para memantina HCl.

Cantidad pesada de STD:	20.0 mg		
No.	tm	Área	Y2
1	2.056	63082	3979338724
2	2.045	63383	4017404689
3	1.998	63549	4038475401
4	2.065	63609	4046104881
5	2.063	63324	4009928976
6	2.036	62863	3951756769
Σ		379810	24043009440
Promedio	2.04	63301.67	
Desv. Est.	0.03	284.05	
C.V. (%)	1.22	0.45	

Media Aritmética

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

$$\bar{y} = \frac{(63082 + 63383 + 63549 + 63609 + 63324 + 62863)}{6} = \frac{379810}{6} = 63301.67$$

Desviación Estándar

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

$$\sum y^2 = 63082^2 + 63383^2 + 63549^2 + 63609^2 + 63324^2 + 62863^2 = 24043009440.00$$

$$S = \sqrt{\frac{6 \times 24043009440 - 379810^2}{6(6-1)}} = 284.05$$

Coefficiente de Variación

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

$$CV = \frac{284.05}{63301.00} * 100 = 0.45\%$$

El C.V. (%) no excede el 2.0%

Tabla No 30. Análisis estadístico de precisión del método para memantina HCl.

Cantidad pesada de STD:	20.0 mg		
No.	tm	Área	Y2
1	2.00	61685	3805039225
2	2.02	61381	3767627161
3	2.04	63257	4001448049
4	2.05	62390	3892512100
5	2.01	62863	3951756769
6	2.00	63324	4009928976
Σ		374900	23428312280
Promedio	2.02	62483.33	
Desv. Est.	0.02	813.71	
C.V. (%)	1.04	1.30	

Media Aritmética

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

$$\bar{y} = \frac{(61685 + 61381 + 63257 + 62390 + 62863 + 63324)}{6} = \frac{374900}{6} = 62483.33$$

Desviación Estándar

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

$$\sum y^2 = 61685^2 + 61381^2 + 63257^2 + 62390^2 + 62863^2 + 63324^2 = 23428312280.00$$

$$S = \sqrt{\frac{6 \times 23428312280 - 374900^2}{6(6-1)}} = 813.709$$

Coeficiente de Variación

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

$$CV = \frac{813.709}{62483.33} * 100 = 1.30\%$$

El C.V. (%) no excede el 2.0%

Tabla No 31. Análisis estadístico de linealidad del sistema para memantina HCl.

No	Nivel	Concentració n (mcg/mL) X	Área muestra Y	tm	XY	X2	Y2
1	25%	20	15915	2.073	318300	400	253287225
2		20	16128	2.065	322560	400	260112384
3		20	14897	2.045	297940	400	221920609
4	50%	40	31687	2.070	1267480	1600	1004065969
5		40	30194	2.052	1207760	1600	911677636
6		40	31843	2.082	1273720	1600	1013976649
7	75%	60	47460	2.082	2847600	3600	2252451600
8		60	47705	2.058	2862300	3600	2275767025
9		60	45492	2.060	2729520	3600	2069522064
10	100%	80	60789	2.042	4863120	6400	3695302521
11		80	63494	2.054	5079520	6400	4031488036
12		80	63704	2.019	5096320	6400	4058199616
13	125%	100	79005	2.045	7900500	10000	6241790025
14		100	76086	2.052	7608600	10000	5789079396
15		100	79635	2.063	7963500	10000	6341733225
16	150%	120	94777	2.052	11373240	14400	8982679729
17		120	95071	2.049	11408520	14400	9038495041
18		120	91384	2.080	10966080	14400	8351035456
		Σ	1260	985266	85386580	109200	66792584206
		Σ2	1587600	970749090756			

Pendiente:

$$b_1 = 781.81$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen:

$$b_0 = 10.47$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = 0.9979$$

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

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$S_{b_1} = 8.8629 \quad S_{y/x} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = 1284.4 \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1(\sum xy) - b_0(\sum y)}{n-2}}$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b_1}$$

$$t(16,0.975) = 2.12$$

$$\checkmark IC(\beta_1) = 781.81 + (2.12)8.8629 = 800.60$$

$$\checkmark IC(\beta_1) = 781.81 - (2.12)8.8629 = 763.02$$

IC (β_1) no incluye el cero

Tabla No 32. Análisis estadístico de especificidad para memantina HCl.

No	Cantidad pesada (mg)	Respuesta observada (Área)
STD	20.0	63280.1667
Placebo 1	38.2	0
Placebo 2	38.3	0
Placebo 3	38.2	0

RESPUESTA SOLO DEL ESTÁNDAR	ANALITO RESPUESTA NULA (COMO BLANCO)
-----------------------------	--------------------------------------

Tabla No 33. Análisis estadístico de exactitud y repetibilidad para memantina HCl.

No	Nivel	Cantidad adicionada	Área muestra	Cantidad recuperada	% de Recobro	Y2	
1	75%	0.60	46985	0.593	98.786	9758.73848	
2		0.60	47521	0.599	99.913	9982.661833	
3		0.60	46892	0.592	98.591	9720.144695	
4		0.60	46960	0.592	98.734	9748.356291	
5		0.60	47705	0.602	100.300	10060.11668	
6		0.60	46732	0.590	98.254	9653.925729	
7	100%	0.80	63602	0.802	100.293	10058.64056	
8		0.80	63200	0.797	99.659	9931.889994	
9		0.80	63286	0.798	99.794	9958.938212	
10		0.80	64041	0.808	100.985	10197.97525	
11		0.80	63545	0.802	100.203	10040.61957	
12		0.80	63587	0.802	100.269	10053.89662	
13	125%	1.00	78956	0.996	99.603	9920.829704	
14		1.00	77864	0.982	98.226	9648.307554	
15		1.00	78558	0.991	99.101	9821.064303	
16		1.00	78954	0.996	99.601	9920.32711	
17		1.00	78885	0.995	99.514	9902.995411	
18		1.00	78935	0.996	99.577	9915.553101	
n= 18				Promedio	0.5946	99.5224	
				Desv. Est.	0.0049	0.7715	
				C.V. (%)	0.8209	0.7752	
				Σ		1791.4038	178294.9811
				Σ²		3209127.5455	

Media Aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n} \qquad \bar{y} = \frac{1791.403}{18} = 99.52$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}} \qquad S = \sqrt{\frac{18 \times 178294.98 - 1791.40^2}{18(18-1)}} = 0.7715$$

$\sum y^2 = 178294.98$

Coeficiente de Variación

El C.V. (%) es menor al 2%

$$CV = \frac{S}{y} * 100 \qquad CV = \frac{0.7715}{99.52} * 100 = 0.775\%$$

Intervalo de Confianza para la media poblacional

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

$$t_{0.975, 18-1} = 2.110$$

$$IC(\mu) = 99.52 + (2.11) \frac{0.771}{\sqrt{18}} = 99.906\%$$

$$IC(\mu) = 99.52 - (2.11) \frac{0.771}{\sqrt{18}} = 99.139\%$$

Incluye el intervalo 98%-102

Tabla No 34. Análisis estadístico de linealidad del método para memantina HCl.

No	Nivel	Cantidad adicionada (mg) X	Área	Cantidad recuperada(mg) Y	XY	X2	Y2	% Recobro	
1	25%	0.20	15615	0.1986	0.0397	0.04	0.0394	99.285	
2		0.20	15718	0.1999	0.0400	0.04	0.0400	99.940	
3		0.20	15697	0.1996	0.0399	0.04	0.0398	99.807	
4	50%	0.40	31387	0.3991	0.1597	0.16	0.1593	99.784	
5		0.40	31394	0.3992	0.1597	0.16	0.1594	99.807	
6		0.40	31043	0.3948	0.1579	0.16	0.1558	98.691	
7	75%	0.60	46960	0.5972	0.3583	0.36	0.3566	99.529	
8		0.60	46705	0.5939	0.3564	0.36	0.3528	98.988	
9		0.60	46892	0.5963	0.3578	0.36	0.3556	99.385	
10	100%	0.80	62689	0.7972	0.6378	0.64	0.6355	99.649	
11		0.80	62494	0.7947	0.6358	0.64	0.6316	99.339	
12		0.80	62304	0.7923	0.6338	0.64	0.6277	99.037	
13	125%	1.00	78905	1.0034	1.0034	1	1.0068	100.341	
14		1.00	78886	1.0032	1.0032	1	1.0063	100.316	
15		1.00	77935	0.9911	0.9911	1	0.9822	99.107	
16	150%	1.20	93907	1.1942	1.4330	1.44	1.4261	99.515	
17		1.20	93671	1.1912	1.4294	1.44	1.4189	99.265	
18		1.20	94384	1.2002	1.4403	1.44	1.4406	100.021	
	Σ	12.60		12.5461	10.8770	10.9200	10.8345	99.545	Promedio.
	Σ^2	158.76		157.4035	118.3101	119		0.455	Desv. Est.
	n=	18						0.457	C.V. (%)

Pendiente:

$b_1 = 0.997526902$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen:

$b_0 = -0.001265729$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación:

$r^2 = 0.999893228$

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

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975})S_{b1} \quad \begin{array}{l} t \text{ de} \\ \text{tablas=} \end{array} \quad 2.12$$

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

$S_{b1} = 0.002577016$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1(\sum xy) - b_0(\sum y)}{n-2}}$$

$S_{y/x} = 0.003734451$

$$IC(\beta_1) = 0.9975 + (2.12) 0.00258 = \mathbf{1.00299}$$

$$IC(\beta_1) = 0.9975 - (2.12) 0.00258 = \mathbf{0.99206}$$

El intervalo de confianza de la pendiente incluye la unidad.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{\beta_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Promedio de X = 0.7

$S_{b0} = 0.002007207$

$$IC(\beta_0) = -0.001266 + (2.12) 0.002007 = \mathbf{0.002989}$$

$$IC(\beta_0) = -0.001266 - (2.12) 0.002007 = \mathbf{-0.005521}$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye el cero.

Coefficiente de variación de regresión:

Promedio de Y = 0.697003

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

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

$$C.V. (\%)_{y/x} = (0.003734451/0.69703)100 = \mathbf{0.5358}$$

El coeficiente de variación de la regresión es menor de 2 %.

Intervalo de confianza para el recobro:

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

$$t_{0.975,17} = 2.11$$

$$IC(\mu) = 99.545 + (2.11) [(0.455)/(18)^{1/2}] = \mathbf{99.318}$$

$$IC(\mu) = 99.545 - (2.11) [(0.455)/(18)^{1/2}] = \mathbf{99.771}$$

El intervalo de confianza para el recobro esta dentro de 98 - 102

Tabla No 35. Análisis estadístico de precisión intermedia para memantina HCl.

		Analista 1					Analista 1		
Día	No	Cantidad muestra (mg)	Área	% de recobro	Día	No	Cantidad muestra (mg)	Área	% de recobro
	1	1	38.7	73273.50		100.9810	2	1	38.9
	2	38.9	72132.50	98.8975		2	38.6	72473.50	99.5590
	3	39.0	72658.50	99.3632		3	38.8	72266.00	98.7623
		Analista 2					Analista 2		
Día	No	Cantidad muestra (mg)	Área	% de recobro	Día	No	Cantidad muestra (mg)	Área	% de recobro
	1	1	38.7	72693.00		100.3822	2	1	38.5
	2	38.9	72159.00	99.1324		2	38.9	72573.50	99.8350
	3	39	72024.00	98.6933		3	38.8	72966.00	100.6336

Cantidad pesada de estándar A1 D1: 20.0 Cantidad pesada de estándar A1 D2: 20.1
 Cantidad pesada de estándar A2D1: 20.1 Cantidad pesada de estándar A2D2: 20.1
 Pureza del estándar: 100 Pureza del estándar: 100
 Área del estándar A1D1: 72561.67 Área del estándar A1D2: 73348.00
 Área del estándar A2D1: 72778.33 Área del estándar A2D2: 72681.33

Tabla No 36. Resumen de coeficientes de variación de precisión intermedia para memantina HCl.

MEMANTINA HCl	% RECOBRO		C.V. (%)
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	
DIA1	100.98	100.80	0.91
	98.90	99.56	
	99.36	98.76	
C.V. (%)	1.09	1.03	
DIA2	100.38	101.19	0.91
	99.13	99.84	
	98.69	100.63	
C.V. (%)	0.88	0.68	
		C.V. (%) GLOBAL	0.91

El coeficiente de variación es menor de 2%

Tabla No 37. Análisis estadístico de robustez para memantina HCl.

Condiciones normales.

No	Cantidad pesada STD (mg)	Cantidad pesada MTRA (mg)	Área STD	Área de la muestra	% Recobro
1	20.0	38.6	67280.17	67368.00	100.3900
2	20.0	38.7	67280.17	67123.50	99.7671
3	20.0	38.8	67280.17	67157.00	99.5597

Condición 1.

No	Cantidad pesada STD (mg)	Cantidad pesada MTRA (mg)	Área STD	Área de la muestra	% Recobro
1	20.0	38.6	67035.00	66102.00	98.8637
2	20.0	38.7	67035.00	67138.00	100.1537
3	20.0	38.8	67035.00	66039.50	98.2611

Resultados globales

No	CONDICIONES	
	Inicial	No 1
1	100.390	98.864
2	99.767	100.154
3	99.560	98.261
Promedios	99.906	99.093
Desv. Est.	0.432	0.967
C.V. (%)	0.433	0.976

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

$$\bar{y}_{Ci} = \frac{100.39 + 99.767 + 99.560}{3} = 99.906\%$$

$$\bar{y}_{C1} = \frac{99.093 + 100.154 + 98.261}{3} = 99.093\%$$

$$|d|_{C1} = |99.906 - 99.093| = 0.813\%$$

La diferencia absoluta es inferior al 2%.

Tabla No 38. Análisis estadístico de tolerancia para memantina HCl.

Condiciones Normales.

No	Cantidad pesada STD (mg)	Cantidad pesada MTA (mg)	Área STD	Área de la muestra	% Recobro
1	20.0	38.7	67446.17	66937.50	99.2458
2	20.0	38.6	67446.17	67760.00	100.7256
3	20.0	38.6	67446.17	65998.00	98.1064

Condición 1. Otro equipo

No	Cantidad pesada STD (mg)	Cantidad pesada MTA (mg)	Área STD	Área de la muestra	% Recobro
1	20.1	38.7	65497.00	65294.50	100.1893
2	20.1	38.7	65497.00	63911.50	98.0672
3	20.1	38.8	65497.00	64120.00	98.1335

Resultados globales

No	Condiciones	
	Inicial	No 1
1	99.24582	100.1893
2	100.72558	98.0672
3	98.10636	98.1335
Promedio	99.3593	98.2852
Desviación	1.3133	0.3219
C.V. (%)	1.3218	0.3275

Promedios	99.0780
Desv. Est.	1.1692
C.V. (%)	1.1801

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

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

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

El coeficiente de variación es menor de 2%