

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

12
2ej

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
PARA LA DETERMINACION DE
GLICINA Y LISINA EN UN ELIXIR**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

SARA SEIJAS SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág.
CAPITULO I. INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del Problema	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Hipótesis	3
CAPITULO II. ANTECEDENTES	
2.1 Validación	4
2.1.1 Definición	4
2.1.2 Linealidad del Sistema de Medición	6
2.1.3 Precisión del Sistema de Medición	6
2.1.4 Exactitud del Método Analítico	7
2.1.5 Linealidad del Método Analítico	8
2.1.6 Precisión del Método Analítico	9
2.1.7 Error Experimental	11
2.2 Aminoácidos	12
2.2.1 Características de los Aminoácidos	13
2.2.2 Reacciones Generales de los Aminoácidos	15

2.2.3	Aminoácidos Esenciales y No Esenciales	17
2.2.4	Funciones de los Aminoácidos	18
2.2.5	Técnicas Utilizadas en la Identificación y Cuantificación de Aminoácidos	20
2.2.6	Glicina	24
2.2.7	Lisina	28

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagrama de Flujo	32
3.1.1	Identificación y Cuantificación de Glicina y Lisina	32
3.1.2	Validación del Método Analítico	33
3.2	Material, Reactivos y Equipo	33
3.2.1	Material de Laboratorio	33
3.2.2	Reactivos	34
3.2.3	Equipo	34
3.2.4	Preparación de Reactivos	35
3.3	Metodología	35
3.3.1	Identificación y Cuantificación de Glicina y Lisina	35
3.3.2	Validación del Método Analítico	37

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Resultados	46
4.2	Discusión	73

CAPITULO V. CONCLUSIONES 77

BIBLIOGRAFIA	79
--------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La industria farmacéutica ha tratado por muchos años de asegurar que los productos que preparan tengan la calidad deseada de una manera reproducible. En la presente década se han observado cambios significativos en la forma de apreciar y conseguir la calidad de los productos farmacéuticos (28).

Los conceptos de Control Total de Calidad, de Validación y la normativa internacional sobre Prácticas Correctas de Manufactura son, sin lugar a dudas, herramientas que permiten conocer mejor los productos y los factores que afectan su calidad. Estos conceptos permiten "construir la calidad" en lugar de "tratar de controlarla" (17, 26).

Los orígenes de validar se localizan en los Estados Unidos en la década de 1970 y surge por el deseo de verificar en forma documentada la confiabilidad de las técnicas analíticas. En la revisión de las normas para las Prácticas Correctas de Manufactura de 1976, la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) menciona por primera vez el concepto de validación de procesos. La FDA decide establecer directrices de tipo informativo para orientar acerca de la

validación de procesos farmacéuticos en un sentido general. A partir de 1985, dicha administración considera que todo proceso que no esté validado está fuera de control (7).

Debido a esto, en México, la validación es un requisito sanitario publicado en el Diario Oficial de la Federación el 18 de Enero de 1988 y la Secretaría de Salud ha pedido a los laboratorios farmacéuticos que tanto sus procesos de fabricación como los métodos de control sean validados, para que de esta manera se tenga un medicamento controlado en su fabricación y eficaz en su acción terapéutica (11).

Por lo anterior, es necesario validar cualquier proceso, pero sobre todo los procesos de productos nuevos que se introducen al mercado y por consiguiente los métodos analíticos que se desarrollan para controlar dichos productos. Este es el caso del laboratorio farmacéutico que produce un elixir que contiene entre sus principios activos: lisina y glicina.

Este laboratorio necesita del desarrollo de un método analítico para la cuantificación de lisina y glicina, y como es un método nuevo requiere ser validado como garantía de que cumplirá todas las especificaciones para obtener una aplicación analítica efectiva y confiable.

1.2 OBJETIVOS.

1. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de glicina y lisina en un elixir como producto terminado, por espectrofotometría visible.

2. Validar el método analítico propuesto.

1.3 HIPOTESIS.

Ho: El método analítico que comprende cromatografía en capa fina, revelado con una solución de ninhidrina y cuantificación de los aminoácidos por espectrofotometría visible, separa lisina y glicina en un elixir.

Hi: El método analítico que comprende cromatografía en capa fina, revelado con una solución de ninhidrina y cuantificación de los aminoácidos por espectrofotometría visible, no separa lisina y glicina en un elixir.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 VALIDACION.

2.1.1 Definición.

Validar un determinado proceso significa comprobar a través de un procedimiento formal y documentado que, en condiciones preestablecidas y con todos los parámetros significativos bajo control, se obtiene un producto con la calidad diseñada. Esto es debido a que la validación es un método científico, que a través de documentación, permite la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación efectuada en equipos o procesos y que éstos se encuentran bajo control (7, 9, 28).

La validación es un requerimiento de control y ahorra tiempo y dinero mediante la reducción de análisis, de reprocesos y de controles en proceso, debido a que con un proceso validado no hay necesidad de hacer ajustes cada vez que haya cambios en personal o cambio de un producto a otro o cambio de procesos. Esto es, porque el proceso está bien documentado y se basa en principios científicos firmes. Así, el personal de operación tiene a su disposición procedimientos escritos a seguir, no necesita perder tiempo tratando de encontrar la forma de hacer ciertas operaciones o, aún peor,

de desarrollar un proceso impropio lo cual puede causar daño y/o atrasos en producción o puede resultar en reprocesos o rechazos. Si bien, la validación puede causar más gastos inicialmente, también es cierto que puede pagarse por sí misma mediante ahorros de tiempo y costo (18).

Al terminar la validación se tiene la garantía de que el sistema, proceso o equipo está funcionando de una manera aceptable y reproducible y se puede asegurar con una certeza razonable de que cualquier lote de producto producido de la misma manera cumplirá con todas las especificaciones y será consistente con lotes producidos antes y después (19).

Por todo lo anterior, la validación se aplica a la manufactura de medicamentos, productos biológicos y equipos médicos, y en el presente trabajo se aplicará la validación a métodos analíticos (26).

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se comprueba y certifica la aceptabilidad de dicha metodología para dar resultados analíticos confiables y reproducibles (26).

Los pasos que se llevan a cabo para realizar la validación de un método analítico para un producto terminado son (9, 26):

- 1) Linealidad del sistema de medición
- 2) Precisión del sistema de medición
- 3) Exactitud del método analítico
- 4) Linealidad del método analítico
- 5) Precisión del método analítico

2.1.2 Linealidad del Sistema de Medición.

Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad física, química o biológica con cierta cantidad de fármaco.

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón, utilizando cuando menos cinco diluciones y haciendo análisis por triplicado para cada dilución, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

El criterio a seguir para la linealidad del sistema es:

a) la relación entre la concentración y la propiedad medida es altamente significativa,

b) la ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración - propiedad medida, debe ser estadísticamente igual a cero ($b = 0$),

c) el coeficiente de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98 ($R^2 > 0.98$) y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple no debe ser estadísticamente significativa (3, 9, 10, 26).

2.1.3 Precisión del Sistema de Medición.

Es la repetición de la medición de cierta cantidad de fármaco. Se determina por el análisis sextuplicado, como mínimo, de una misma solución estándar correspondiente al 100% de lo establecido en la linealidad del sistema de medición y se mide su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

El criterio utilizado en la precisión del sistema de medición es: el coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5 % ($CV \leq 1.5 \%$), (9, 26).

2.1.4 Exactitud del Método Analítico.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia, estos porcentajes se encuentran en función de la forma farmacéutica, (Tabla 1):

Tabla 1. Porcentajes de recobro de diferentes formas farmacéuticas.	
Forma Farmacéutica	% de Recobro
Comprimidos	98 - 102 %
Suspensiones	97 - 103 %
Soluciones	98 - 102 %
Semisólidos	97 - 103 %

Se deben analizar cuando menos seis placebos cargados con el 100 % del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

El criterio empleado para la exactitud del método es el siguiente:

- a) la media aritmética del porcentaje recuperado debe ser estadísticamente igual al 100 % ($\bar{y} = 100 \%$)
- b) el intervalo de confianza para la media debe incluir el 100 % (9, 10, 26).

2.1.5 Linealidad del Método Analítico.

Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado), (3).

Se determina con placebos adicionados del principio activo, cada uno preparado de manera independiente, cuando menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100 %, haciendo análisis de cada concentración por triplicado. La prueba deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación. (El placebo cargado es la mezcla de excipientes junto con la cantidad exacta del principio activo con que se trabaja), (9).

El criterio que se usa para la linealidad del método es:

- a) la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser altamente significativa,
- b) la ordenada al origen de la relación lineal simple de la cantidad adicionada - cantidad recuperada debe ser

estadísticamente igual a cero ($b = 0$),

c) la pendiente de esta relación debe ser estadísticamente igual a uno ($m = 1$),

d) el coeficiente de determinación de la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada debe ser mayor a 0.98 ($R^2 > 0.98$) y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple no debe ser estadísticamente significativa (10, 26).

2.1.6. Precisión del Método Analítico.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea del producto, bajo las mismas condiciones de operación (repetibilidad) y/o bajo diferentes condiciones de operación (reproducibilidad).

La repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas (3).

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos (3).

Esta prueba se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y cada muestra por triplicado. Se debe trabajar de manera independiente partiendo de

una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica (9).

El criterio a seguir para la precisión del método analítico es:

a) el coeficiente de variación total debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición (Tabla 2):

Tabla 2. Coeficiente de variación total de algunos métodos analíticos	
Métodos Analíticos	Coeficiente de Variación Total.
Cromatográficos	Menor o igual a 2 %
Químicos	Menor o igual a 3 %
Espectrofotométricos	Menor o igual a 3 %
Microbiológicos	Menor o igual a 5 %

b) la repetibilidad del método de medición debe de satisfacer los requisitos establecidos para la utilización del método de medición.

c) la reproducibilidad interanalista y la reproducibilidad interdía/analista debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la

utilización del método analítico (10, 26).

2.1.7 Error Experimental.

Cualquier proceso de medición está sujeto a error, es por esto que el error de un método analítico debe ser evaluado para determinar la exactitud y establecer su precisión (9).

El error de un método analítico está formado por el error sistemático (determinado) y el error aleatorio (indeterminado) (3).

El error sistemático es aquél que da lugar a medidas incorrectas y pueden ser evitadas una vez que se conocen. Este tipo de error se relaciona con la exactitud del método analítico. Las fuentes de error sistemático son:

a) errores instrumentales, por ejemplo: equipo defectuoso,

b) errores del método: son los más graves de un análisis porque los errores inherentes al método no pueden cambiarse a menos que se modifiquen las conciciones de la determinación. Algunas fuentes de errores metódicos son: la coprecipitación de impurezas, la ligera solubilidad del precipitado. En algunos casos las correcciones serán relativamente sencillas, por ejemplo: correr un blanco,

c) errores de operación: mal manejo de algún aparato,

d) errores personales: como la dificultad de un analista para juzgar un cambio de color.

El error aleatorio es aquél que permanece aún cuando se

ha eliminado el error sistemático y por lo tanto da lugar a medidas imprecisas. Este error se revela por las pequeñas diferencias en mediciones sucesivas efectuadas por el mismo analista en condiciones prácticamente idénticas y es imposible predecirlo o estimarlo (3, 9, 27).

2.2 AMINOACIDOS .

Un aminoácido es esencialmente un ácido orgánico que contiene un grupo amino (6).

Los aminoácidos contienen por lo menos un grupo carboxilo y un grupo alfa-amino, pero difieren en la estructura del resto de la molécula que es una cadena lateral distintiva denominada grupo R (ver Figura 1).

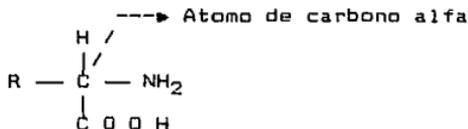


Figura 1. Estructura general de los aminoácidos.

El átomo cerca del grupo carboxilo recibe el nombre de carbono alfa (α), el próximo beta (β), el siguiente gamma (γ), el siguiente delta (δ) y el siguiente épsilon (ϵ). Como todos los aminoácidos tienen un grupo amino unido al átomo de carbono alfa se conocen como alfa-aminoácidos (6).

Los aminoácidos se clasifican de acuerdo a la estructura

del grupo R, así se tienen:

aminoácidos alifáticos: glicina, alanina, serina, treonina (estos dos últimos contienen grupos hidroxilo), valina, leucina, isoleucina (estos tres se llaman aminoácidos de cadena ramificada con grupos R hidrófobos).

aminoácidos tioalifáticos: cisteína, cistina, metionina.

aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina.

aminoácidos heterocíclicos: prolina, hidroxiprolina, triptófano.

aminoácidos ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico.

aminoácidos básicos: histidina, lisina, arginina (4, 14).

2.2.1 Características de los Aminoácidos.

Los aminoácidos son sólidos cristalinos, no volátiles, que funden con descomposición a temperaturas relativamente elevadas. Son insolubles en disolventes no polares como éter de petróleo, benceno, éter, y son apreciablemente solubles en agua, (4).

Todos los aminoácidos, excepto la glicina, poseen al menos un átomo de carbono asimétrico (el carbono alfa) y son, por tanto, ópticamente activos (6).

Los aminoácidos se conducen como ácidos y también como bases ya que contienen, por lo menos, un grupo carboxilo y un grupo amino. Las sustancias que en solución acuosa se ionizan como ácidos y como bases se llaman anfóteras (del griego, amphi: "ambos"), o también anfólitos, locución abreviada de

"electrolitos anfóteros". A valores de pH fisiológicos existen como iones dipolares o anfóteros (Figura 2), esta forma es eléctricamente neutra (no emigra en un campo eléctrico) y al pH en el cual un ion dipolar no emigra en un campo eléctrico se le conoce como punto isoeléctrico (4, 6, 21).

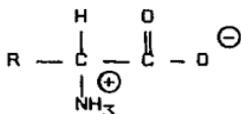


Figura 2. Presentación de los aminoácidos como iones dipolares o anfóteros.

Los aminoácidos se combinan entre sí para formar proteínas por medio de enlaces peptídicos, los cuales son enlaces de amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo alfa-amino de otro, con separación de una molécula de agua (Figura 3), (4, 14).

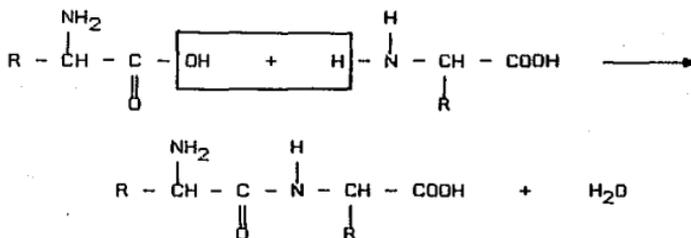


Figura 3. Combinación de dos aminoácidos por medio de un enlace peptídico.

El compuesto que resulta de la unión de dos aminoácidos es un dipéptido, la unión de tres aminoácidos originará un tripéptido y la combinación de varios aminoácidos por enlace peptídico se llamará polipéptido (6).

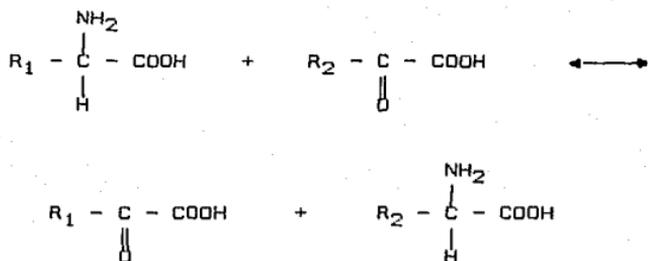
Así, se forma una cadena de aminoácidos en donde en un extremo de la cadena hay un grupo amino expuesto que se llama grupo amino o N-terminal del polipéptido; el otro extremo, con su grupo carboxílico expuesto, es el grupo carboxilo o C-terminal (21).

2.2.2 Reacciones Generales de los Aminoácidos.

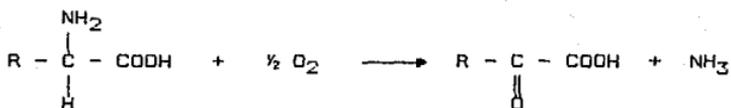
Las reacciones bioquímicas que modifican los aminoácidos se subdividen en reacciones que conciernen a las funciones mediadas por el carbono alfa y reacciones de la cadena lateral R, que son "particulares para cada aminoácido" (5).

Las reacciones que conciernen al carbono alfa, la función amina y la función carboxilo, son llamadas reacciones generales de los aminoácidos. En principio, se producen de la misma forma para todos los aminoácidos. Algunas reacciones se efectúan sobre la función amina: se trata de las transaminaciones y las desaminaciones; otras conciernen al carboxilo, o descarboxilaciones, y por último, existen reacciones de isomerización. A continuación se presentan las reacciones generales de los aminoácidos (4, 5):

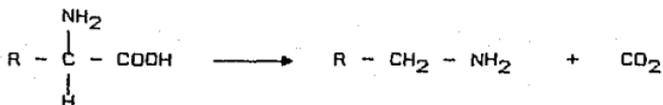
a) Transaminación:



b) Desaminación oxidativa:



c) Descarboxilación:



d) Isomerización:



Las reacciones generales se acompañan de reacciones de eliminación del nitrógeno en exceso. En efecto, es poco lo

que queda en reserva de aminoácidos y proteínas cuando la alimentación aporta un exceso en relación con las necesidades. El nitrógeno es desprendido y eliminado en forma de urea o de amoníaco, mientras que su cadena carbonada es transformada en glúcidos o lípidos (5).

2.2.3 Aminoácidos Esenciales y No Esenciales.

El cuerpo puede sintetizar algunos aminoácidos que se denominan aminoácidos no esenciales, ya que no es esencial que se disponga de ellos en la dieta para el crecimiento y desarrollo normales. (Los términos esencial y no esencial, no tienen significado respecto a la importancia relativa de un aminoácido en el metabolismo, son estrictamente términos dietéticos), (4, 5).

Los aminoácidos esenciales son aquéllos que no puede sintetizar el cuerpo y que, por tanto, deben obtenerse de una fuente externa, la dieta. Los aminoácidos esenciales son producto de reacciones de biosíntesis de los vegetales y del metabolismo bacteriano. Los aminoácidos esenciales para el hombre son: triptófano, fenilalanina, lisina, treonina, valina, metionina, leucina, isoleucina, arginina, histidina, y se requieren cantidades adecuadas de cada uno de estos aminoácidos esenciales para mantener el balance nitrogenado adecuado (5, 6).

Un individuo se encuentra en equilibrio nitrogenado cuando el nitrógeno eliminado (nitrógeno excretado en orina o

heces) equivale al ingresado (nitrógeno en la dieta) durante un período determinado de tiempo. Un niño que crece o un paciente que se recupera de una enfermedad prolongada está en balance nitrogenado positivo. El ayuno, una enfermedad que desnutre o una dieta que carece de cantidades suficientes de aminoácidos esenciales pueden originar un balance nitrogenado negativo. Si el aporte de energía en forma de carbohidratos o lípidos es insuficiente para satisfacer las necesidades energéticas, se utilizan proteínas para compensar esta deficiencia, lo que origina un balance nitrogenado negativo (4, 6).

Los aminoácidos esenciales suelen ser proporcionados por proteínas de origen animal, como carne, huevos, leche, queso y pescado. Las proteínas de origen vegetal son de baja calidad, ya que son deficientes en uno o más de los aminoácidos esenciales. De los alimentos vegetales, las proteínas de mejor calidad provienen de semillas leguminosas (frijoles, cacahuates), y de las nueces (4).

Se recomienda un ingreso dietético diario de 1.0 a 1.5 g de proteína por kilogramo de peso corporal como adecuado para cubrir las necesidades fisiológicas (6).

2.2.4 Funciones de los Aminoácidos.

Los aminoácidos tienen un papel muy importante en los seres vivos, son indispensables para la síntesis proteica en proporciones adecuadas. La ausencia de uno solo de ellos en una célula impide casi todas las síntesis proteicas, en conse-

cuencia, la síntesis proteica es la primera función sintética de los aminoácidos por orden de importancia cuantitativa. Además, los aminoácidos son precursores de muchas otras biomoléculas importantes que incluyen varias hormonas, vitaminas, coenzimas, alcaloides, porfirinas, etc. (5, 17).

También los aminoácidos constituyen una de las principales formas de aporte alimenticio de nitrógeno en los vertebrados superiores y, por tal motivo, uno de los intermediarios esenciales del ciclo del nitrógeno (4).

Por lo anterior, es muy importante consumir alimentos naturales ricos en aminoácidos y proteínas. En pacientes que no pueden consumir estos alimentos o si no pueden digerir proteínas enteras se les puede administrar hidrolizados o mezclas de aminoácidos cristalinos. Esto se hace por medio de hiperalimentación intravenosa. El componente más crítico en esta técnica es una fuente de nitrógeno capaz de reponer o mantener una masa corporal magra y las proteínas esenciales para la cicatrización de heridas, reparación de tejidos y crecimiento. En la mayoría de los hospitales se usan soluciones de mezclas de aminoácidos cristalinos, ya que así son utilizados en forma más eficiente y tolerados más fácilmente en el organismo que los péptidos presentes en hidrolizados de proteínas. De esta forma, los aminoácidos pueden ser utilizados en la síntesis de proteínas y permiten alcanzar un balance nitrogenado positivo y una ganancia de peso en pacientes debilitados. Las soluciones contienen porcentajes variables de aminoácidos, las más usuales tienen: 5, 7 y 10 %

de aminoácidos esenciales y no esenciales (14, 15, 17).

2.2.5 Técnicas Utilizadas en la Identificación y Cuantificación de Aminoácidos.

Algunas técnicas utilizadas en la identificación y cuantificación de aminoácidos son: cromatografía líquida de alta presión, prueba de Ehrlich, espectrofotometría ultravioleta, reacción con ninhidrina, método de Van Slyke, prueba de Hopkins-Cole, fluorometría, prueba de Sakaguchi, cromatografía en papel, prueba de Millon, espectrofotometría visible, prueba de Pauly, cromatografía en capa fina, métodos titrimétricos, cromatografía de gases, espectrofotometría infrarroja, cromatografía de intercambio iónico (4, 5, 14).

De estas técnicas analíticas se eligieron la cromatografía en capa fina, la espectrofotometría visible y la reacción con ninhidrina por su efectividad para identificar y cuantificar la glicina y lisina en un elixir.

La cromatografía en capa fina es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas por medio de un disolvente (fase móvil) que se mueve sobre una capa delgada de un adsorbente idóneo (fase estacionaria); este adsorbente, generalmente con un adhesivo, se deposita sobre una placa de vidrio o de otro material que actúa como soporte inerte de la capa. La fase móvil pasa por la placa por efecto capilar

(24).

En la cromatografía en capa fina el tiempo necesario para una separación satisfactoria es mucho más corto que para la cromatografía en papel, la resolución es buena, las manchas son más compactas, se pueden separar y recuperar con facilidad cantidades extraordinariamente pequeñas (de orden inferior al microgramo), los reactivos de revelado fuertemente corrosivos, como el ácido sulfúrico, pueden ser pulverizados sobre las láminas de sílice y de alúmina sin afectar el revestimiento, y la capa se puede raspar con una espátula fina para recuperar, por elución, el contenido de una banda o de una mancha. Esta técnica posee la ventaja de ser rápida, versátil y sencilla. Para realizar las separaciones por cromatografía en capa fina no se precisa usar equipo especial o costoso, y el analista puede modificar las condiciones experimentales de manera fácil y rápida. Se usa para diversos propósitos, tales como corridas de prueba para probar fases móviles y estacionarias de la cromatografía líquida, para controlar el progreso de reacciones sintéticas, para hacer diagnósticos clínicos y controlar el abuso de drogas (12, 14, 23, 24).

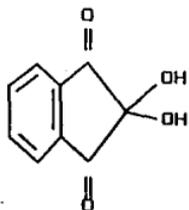
La espectrofotometría en la zona visible (que solía llamarse colorimetría) es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática, pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia (13).

El color está restringido a las frecuencias visibles, por

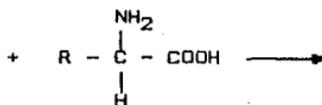
lo cual a una sustancia incolora se le convierte en un derivado fuertemente coloreado para que se lleve a cabo su análisis a través de la absorción en la región visible (22). A veces se conoce la estructura del derivado coloreado y sus soluciones muestran propiedades estructurales altamente reproducibles (8). Este derivado coloreado se forma con la ayuda de la ninhidrina en el análisis de lisina y glicina.

Los aminoácidos reaccionan con ninhidrina (hidrato de tricetohidrendeno) para formar bióxido de carbono, amoníaco, un aldehído con un carbono menos que el aminoácido y un compuesto de color azul a púrpura (las excepciones son la prolina y la hidroxiprolina que dan un color amarillo). La reacción es cuantitativa, tanto por lo referente a la formación de bióxido de carbono como al color, y constituye el fundamento de técnicas de análisis cuantitativo para aminoácidos. El amoníaco formado en la reacción se combina con una molécula de ninhidrina reducida y una molécula de ninhidrina oxidada, formando un compuesto de color conocido como "púrpura de Ruhemann", el cual tiene una absorbancia máxima alrededor de 570 nm y esta longitud de onda se ha convertido en el estándar que se acepta para la determinación cuantitativa de aminoácidos con ninhidrina por colorimetría o espectrofotometría visible. Esta reacción es compleja y puede representarse con dos procesos principales (1, 2, 4, 6):

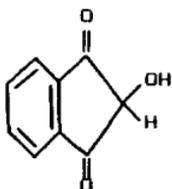
a)



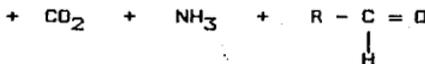
Ninhydrina



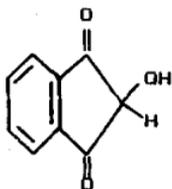
α -aminoácido



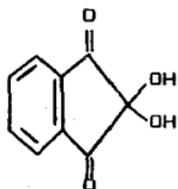
Hidrindantina



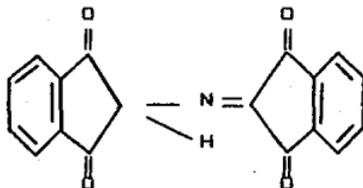
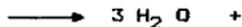
b)



+



+



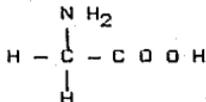
Compuesto de color azul a púrpura

2.2.6 Glicina.

Abreviatura: Gli

Fórmula condensada: $C_2 H_5 O_2 N$

Fórmula desarrollada:



Peso molecular: 75.07

Otros nombres: Acido aminoacético, Glicocola.

Descripción: Polvo cristalino, blanco, inodoro, con sabor dulce; sus soluciones son ácidas frente al tornasol. Punto de fusión: 232° - 236° C, con descomposición.

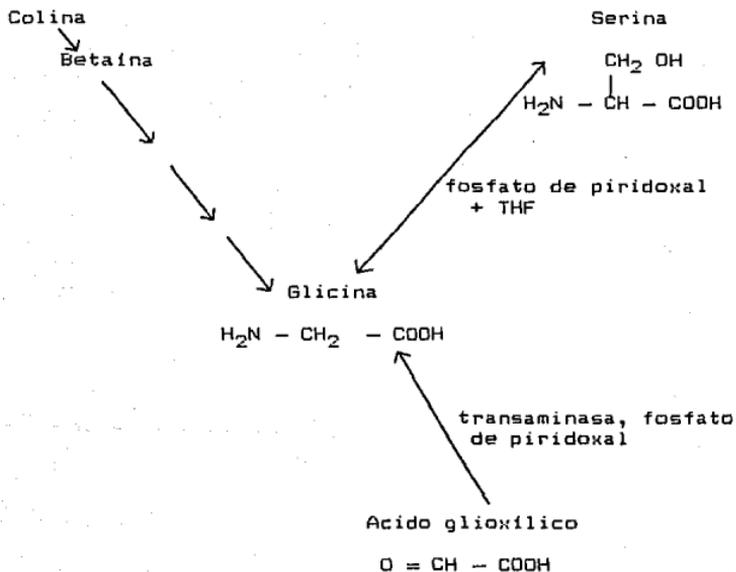
Solubilidad: Soluble 1 g en 4 ml de agua, muy poco soluble en etanol y éter (20).

La glicina es el aminoácido más sencillo, tiene el grupo R más pequeño, por lo cual puede acomodarse en regiones aglomeradas de la cadena polipeptídica. Participa en muchas reacciones biosintéticas, tales como la síntesis de porfirinas y purinas, también en la síntesis de colágeno, una proteína fibrosa, que tiene aproximadamente una glicina por cada tres

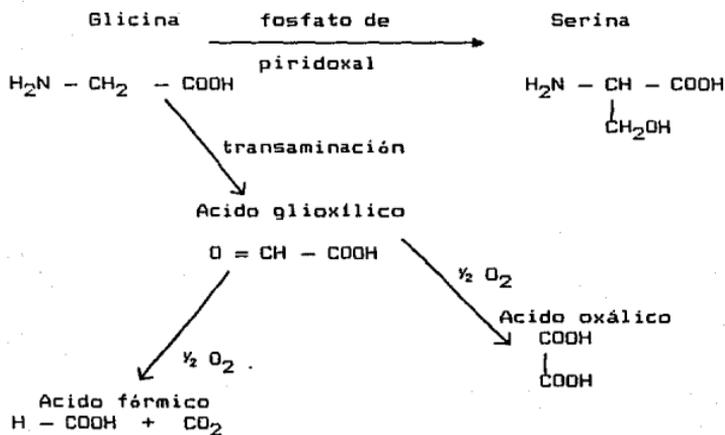
residuos de aminoácidos (4).

El metabolismo de la glicina se muestra a continuación:

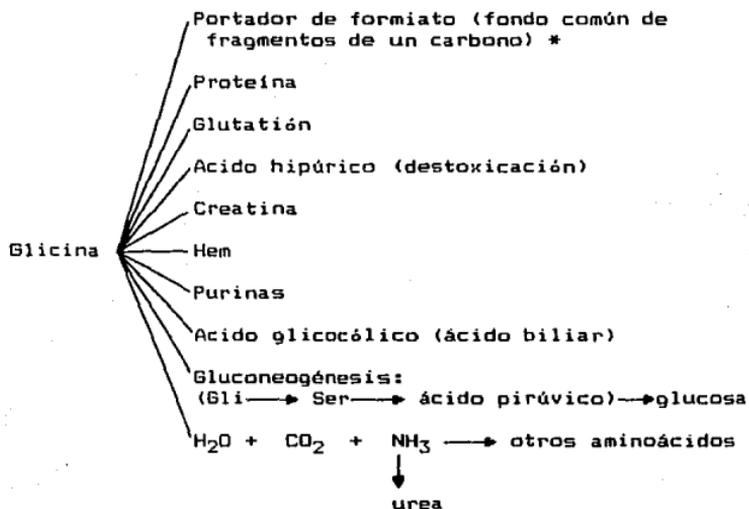
a) La glicina puede formarse a partir de la serina utilizando ácido tetrahidrofólico, del glioxalato o ácido glioxílico por transaminación y de la colina (4):



b) Al degradarse la glicina puede haber conversión en serina; en ácido glioxílico, que se oxida a ácido oxálico o a ácido fórmico y bióxido de carbono; estos ácidos son eliminados por la orina (4, 5):



Algunas funciones especiales de la glicina son (4):



* Esta reacción permite el aporte a todas las células

de los radicales monocarbonados que ellas necesitan. Una parte de estos radicales monocarbonados serán reducidos en metilo (CH_2) y utilizados en las reacciones de metilación. El resto es utilizado para la síntesis del núcleo púrico o del metilo de la timina (5).

Efecto farmacológico:

La glicina ha sido empleada ocasionalmente en la terapia de la miastenia gravis, pero muchos investigadores dudan de su eficacia en esta enfermedad; la dosis usual es 30 g al día en dosis fraccionadas.

Se usa como líquido para irrigación en la resección transuretral de la próstata (solución al 1.5 %).

La glicina se ha utilizado en varias preparaciones antiácidas, a veces como una sal compleja, sin embargo, tiene poca capacidad reguladora del pH (14, 20).

La glicina parece tener un efecto inhibitor sobre la transmisión neural en la médula espinal. La acetilcolina, relacionada metabólicamente con la glicina, está íntimamente relacionada con la neurotransmisión en el sistema nervioso central (4).

Algunas enfermedades relacionadas con la glicina son:

Hiperoxaluria. La enfermedad se caracteriza por una elevada excreción urinaria de ácido oxálico (hiperoxaluria) y oxalatos (por ejemplo, oxalato de calcio). Los oxalatos son escasamente solubles y al precipitarse producen cálculos renales (nefrolitiasis). Esta enfermedad se debe a

alteraciones en la oxidación del ácido glicólico en ácido fórmico o a inactividad de las transaminasas.

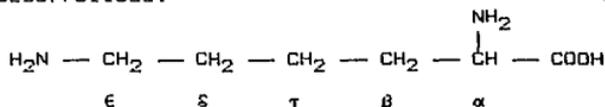
Glicinuria. El síndrome se caracteriza por una excreción elevada de glicina en la orina y tendencia a formar cálculos renales de oxalato. Esta enfermedad se debe probablemente a un defecto en el transporte tubular renal de la glicina (reabsorción de glicina disminuida), (4).

2.2.7 Lisina.

Abreviatura: Lis

Fórmula condensada: $C_6 H_{14} O_2 N_2$

Fórmula desarrollada:



Peso molecular: 146.0

Otros nombres: Acido diamino monocarboxílico

Descripción: Polvo ligeramente blanco, inodoro

Solubilidad: Libremente soluble en agua, muy poco soluble en alcohol (20).

La lisina es un aminoácido esencial en el hombre. Es

degradada por oxidación de su función amina primaria en aldehído y después en ácido, seguida de la transaminación. El diácido formado se une a la vía de catabolismo de los ácidos grasos (5).

Efecto farmacológico:

La lisina interviene en la síntesis de la vasopresina, que es una hormona peptídica producida por la pituitaria posterior, al igual que la oxitocina. La vasopresina humana y la de la mayoría de los mamíferos se denomina vasopresina arginina o simplemente vasopresina, también denominada hormona antidiurética (AOH). La de cerdo contiene lisina en lugar de arginina y en consecuencia se denomina vasopresina lisina o lipresina. La lipresina tiene la siguiente fórmula:



Se aísla de la pituitaria del cerdo y se prepara sintéticamente. La lipresina posee una actividad antidiurética fuerte y presora débil. Se emplea sólo en el tratamiento de diabetes insípida débil a moderada, debida a insuficiencia neurohipofisiaria (14).

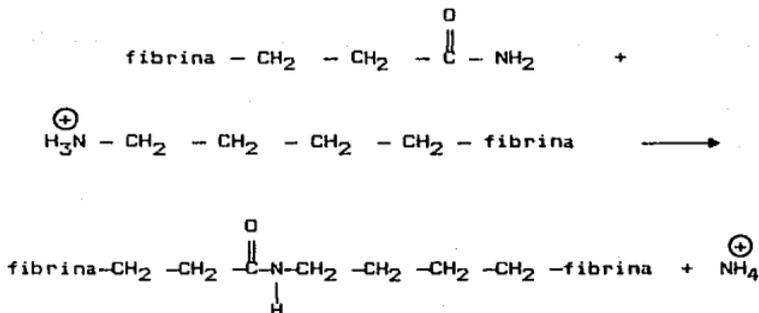
La 8-hidroxislisina se halla en el colágeno y se forma después que la lisina ha sido incorporada a la proteína. En algunas glucoproteínas, los residuos de azúcares están unidos en forma covalente a los residuos de hidroxilisina. Los residuos de lisina también participan en los entrecruzamientos

intramoleculares en el colágeno y la elastina. En estas moléculas, el carbono ϵ se oxida a aldehído por la acción de la lisil oxidasa (4):



El grupo carbonilo puede originar varios tipos de reacciones de condensación con otros residuos de aminoácidos para producir entrecruzamientos, como ocurre en la elastina (4).

La lisina experimenta otra reacción covalente en la formación de la fibrina, una reacción esencial para la coagulación de la sangre. En este caso se forma un enlace peptídico entre las cadenas laterales de las glutaminas y las lisinas de dos moléculas diferentes de fibrina:



Esta reacción es catalizada por la enzima transamidasa. La deficiencia de esta enzima causa trastornos en la coagu-

lación (4).

En varias proteínas, el grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ de residuos de lisina está unido en forma covalente (por medio de una unión amida o formación de una base de Schiff) a compuestos que cumplen una función de catálisis. Algunos ejemplos son:

a) la biotina, en las enzimas carboxilantes (biotinil-lisina),

b) el ácido lipoico, en las enzimas de la descarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos (piruvato, α -cetoglutarato, descarboxilasas de los cetoácidos de cadena ramificada),

c) la opsina, una proteína que se encuentra en los bastones de la retina, tiene residuos específicos de lisina que pueden unirse por formación de una base de Schiff al retinal 11-cis (un derivado de la vitamina A). Estas reacciones son los fenómenos primarios en el proceso de la excitación visual,

d) en el metabolismo de los aminoácidos, particularmente las transaminasas, muchas enzimas utilizan como cofactor de un residuo de lisina el piridoxal fosfato, unido al grupo $\epsilon\text{-NH}_2$. Por lo general, esta base de Schiff se rompe y se rehace durante el ciclo catalítico de la enzima (4).

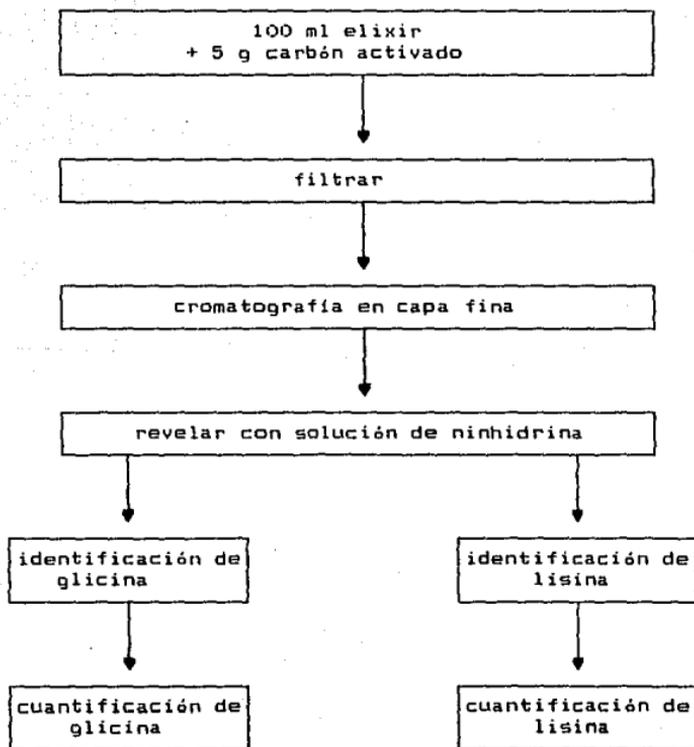
Por supuesto, la lisina también se utiliza como aminoácido esencial para mantener el balance nitrogenado positivo en el cuerpo.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

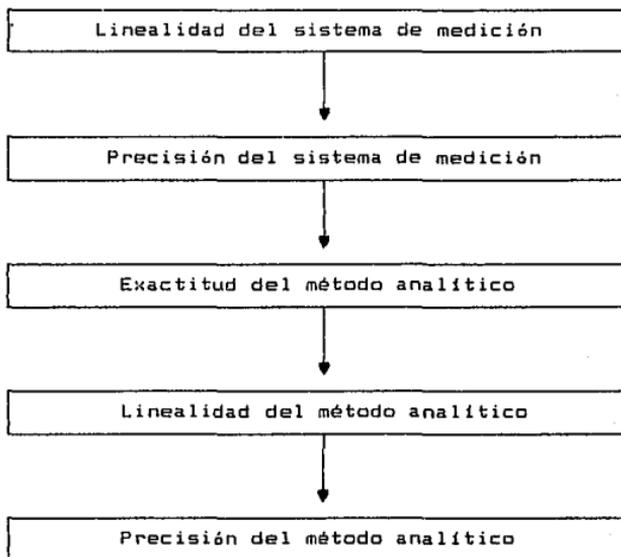
3.1 DIAGRAMA DE FLUJO.

3.1.1 Identificación y Cuantificación de Glicina y Lisina:



fb

3.1.2 Validación del Método Analítico.



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1 Material de Laboratorio.

Matraces volumétricos (25 ml, 250 ml)

Pipetas volumétricas (3 ml, 5 ml, 10 ml)

Vasos de precipitados (50 ml, 250 ml)

Embudos de vidrio (tallo corto)

Matraces Erlenmeyer (25 ml, 50 ml)

Matraces Erlenmeyer rojos (150 ml)

Pipetas graduadas (1 ml)
Probetas (100 ml)
Cristalizadores (20 cm diámetro)
Microjeringas (25 µl)
Cámaras para cromatografía
Placas de sílica gel G (20 x 20 cm)
Espátulas
Papel filtro redondo (Whatman No. 1)

3.2.2 Reactivos.

Glicina (USP)

Lisina (USP)

Los siguientes reactivos son grado analítico:

Carbón activado (Merck)

Ninhidrina (J. T. Baker)

Acetato de sodio anhidro (J. T. Baker)

Acetato de sodio trihidratado (J. T. Baker)

Acido acético glacial (J. T. Baker)

Metilcelosolve (Merck)

Cloruro de titanio (Merck)

Propanol (Merck)

Nitrógeno (gas)

Agua destilada

3.2.5 Equipo.

Espectrofotómetro uv/vis (Pye Unicam Ltd SP8-400)

Balanza granataria (Sartorius)

Balanza analítica (Unimatic Instruments Stanton)

Parrilla de calentamiento (HP-2515 B Thermolyne/Corporation)

Ultrasonido (Sartorius)

3.2.4 Preparación de Reactivos.

1) Solución de ninhidrina:

Pesar exactamente 2.0 g de ninhidrina y pasarlos a un matraz Erlenmeyer rojo de 150 ml, disolverlos en una mezcla de 75 ml de metilcelosolve y 25 ml de la solución amortiguadora de acetatos (solución No. 2), agregar 0.2 ml de cloruro de titanio. Agitar en ultrasonido durante 5 minutos y después burbujear nitrógeno por espacio de 10 minutos.

2) Solución amortiguadora de acetatos:

Pesar 32.8 g de acetato de sodio anhidro y 54.4 g de acetato de sodio trihidratado, pasarlos a un matraz volumétrico de 250 ml, disolver estas sales en un poco de agua destilada, agregar con una pipeta volumétrica 10 ml de ácido acético glacial y aforar con agua destilada.

3.3 METODOLOGIA.

3.3.1 Identificación y Cuantificación de Glicina y Lisina

1) Tomar 100 ml de elixir, agregar 5 g de carbón activado y filtrar a través de papel Whatman No. 1 seco, desechar los primeros 5 ml.

2) En una placa de sílica gel G no activada aplicar en banda 25 µl de elixir filtrado y secar la placa por 24 horas.

3) Saturar la cámara para cromatografía con los solventes: propanol:agua (67:33), durante una hora.

4) Dejar correr el solvente a través de la placa hasta 2 cm antes del borde superior de ésta y retirar la placa de la cámara.

5) Dejar evaporar los solventes y revelar con la solución de ninhidrina.

6) Con una espátula raspar de la placa la zona donde se encuentra la glicina y pasar el polvo a un matraz volumétrico de 25 ml. Agregar 3 ml de agua destilada con una pipeta volumétrica, agitar en ultrasonido durante 3 minutos y agregar con una pipeta volumétrica 5 ml de la solución de ninhidrina.

En un cristizador tener agua destilada en ebullición e introducir el matraz volumétrico, calentar por 20 minutos. Al término de este tiempo sacar el matraz del cristizador e introducirlo en un vaso de precipitados con agua destilada por 2 minutos (para su enfriamiento).

Aforar el matraz con agua destilada y filtrar a través de papel filtro seco, recibir el filtrado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y determinar la absorbancia de la solución filtrada al máximo de absorción (570 nm) usando celdas de vidrio de 2 cm.

Preparar un blanco para la glicina raspando un cuadro de igual tamaño al de este aminoácido, pero de la parte superior de la placa y tratar da la misma manera, con este blanco

ajustar el espectrofotómetro antes de leer la glicina.

7) De la misma placa cromatográfica raspar la zona donde se encuentra la lisina y pasar el polvo a un matraz Erlenmeyer de 25 ml, agregar con pipeta volumétrica 10 ml de agua destilada, agitar en ultrasonido durante 3 minutos. Filtrar esta solución a través de papel filtro seco y recibir el filtrado en un matraz Erlenmeyer de 25 ml, de este filtrado tomar con pipeta volumétrica 3 ml y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, agregar 5 ml de la solución de ninhidrina e introducir el matraz en un cristizador con agua destilada en ebullición durante 25 minutos. Al término de este tiempo retirar el matraz del cristizador e introducirlo en un vaso de precipitados con agua por 2 minutos. Aforar el matraz volumétrico con agua destilada y determinar la absorbancia de la solución al máximo de absorción (570 nm) usando celdas de vidrio de 1 cm. Preparar un blanco para la lisina al igual que en la glicina.

3.3.2 Validación del Método Analítico.

A continuación se presenta el significado de la terminología empleada en la validación del método analítico:

m	=	pendiente
b	=	ordenada al origen
t	=	número de concentraciones
r	=	número de replicaciones
n	=	número de pares ordenados

FV	=	fuentes de variación
GL	=	grados de libertad
SC	=	suma de cuadrados
MC	=	media de cuadrados
F _{calc}	=	valor de F calculado
F _{crit}	=	valor de F crítico o de tablas
gl _{ER}	=	grados de libertad del error de regresión
gl _{EP}	=	grados de libertad del error puro
gl _{FA}	=	grados de libertad de la falta de ajuste
SCR	=	suma de cuadrados de la regresión
SCER	=	suma de cuadrados del error de regresión
SCEP	=	suma de cuadrados del error puro
SCFA	=	suma de cuadrados de la falta de ajuste
MCR	=	media de cuadrados de la regresión
MCER	=	media de cuadrados del error de regresión
MCEP	=	media de cuadrados del error puro
MCFA	=	media de cuadrados de la falta de ajuste
R ²	=	coeficiente de determinación
S _{yx}	=	desviación estandar de la regresión
S _b	=	desviación estandar de la ordenada al origen
IC (B)	=	intervalo de confianza para la ordenada al origen
CV	=	coeficiente de variación
IC (M)	=	intervalo de confianza para la media
A _{max}	=	amplitud máxima
t	=	valor t de Student
S _m	=	desviación estandar de la pendiente

IC (M)	=	intervalo de confianza para la pendiente
Y...	=	suma total de los datos
Y _{1..}	=	suma de datos para el analista 1
Y _{2..}	=	suma de datos para el analista 2
EEY _{ijk} ²	=	suma de cada dato elevado al cuadrado
Y _{11.}	=	suma de datos del analista 1 en el día 1
Y _{21.}	=	suma de datos del analista 2 en el día 1
a	=	analista
d	=	día
r	=	replicación
g _{la}	=	grados de libertad del analista
g _{ld}	=	grados de libertad del día
g _{le}	=	grados de libertad del error
SC _a	=	suma de cuadrados del analista
SC _d	=	suma de cuadrados del día
SC _e	=	suma de cuadrados del error
MC _a	=	media de cuadrados del analista
MC _d	=	media de cuadrados del día
MC _e	=	media de cuadrados del error
σ _a	=	desviación estandar del analista
σ _d	=	desviación estandar del día
σ _e	=	desviación estandar del error
σ	=	desviación estandar total

Los pasos a seguir para la validación del método analítico son:

a) Linealidad del sistema de medición:

Construir una curva de calibración utilizando cinco concentraciones: 80, 90, 100, 110 y 120 %, y hacer análisis por triplicado para cada concentración.

Calcular los datos necesarios para construir la tabla de análisis de varianza:

$$IC(B) = b \pm t_{(n-2, 0.975)} \times Sb$$

Tabla de ANADEVIA					
FV	GL	SC	MC	F _{calc}	F _{crit}
Regresión	1	SCR	SCR	$F_1 = \frac{MCR}{M CER}$	$F_{(g1R, g1ER, 0.99)}$
Error de regresión	n - 2	SCER	$\frac{SCER}{g1ER}$	—	—
Falta de ajuste	$(n-2) - t(n-1)$	SCFA	$\frac{SCFA}{g1FA}$	$F_2 = \frac{MCFA}{M CEP}$	$F_{(g1FA, g1EP, 0.95)}$
Error puro	t(n-1)	SCEP	$\frac{SCEP}{g1EP}$	—	—

Al evaluar la linealidad del sistema se debe aprobar o rechazar la hipótesis siguiente:

H_0 : Hay linealidad.

H_1 : No hay linealidad.

El criterio para la regla de decisión es:

Si $F_{1calc} \geq F_{crit}$, no se rechaza H_0 y por lo tanto hay linealidad del sistema de medición.

Si $F_{1calc} < F_{crit}$, se rechaza H_0 y no hay linealidad del sistema.

Si $F_{2calc} < F_{crit}$, no existe falta de ajuste.

Si $F_{2calc} \geq F_{crit}$, existe falta de ajuste y error puro o experimental.

b) Precisión del sistema de medición.

Realizar análisis por decuplicado de una misma solución estandar cuya concentración debe ser al 100 %.

Las fórmulas para calcular la precisión del sistema son:

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

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

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

Evaluación de la precisión del sistema de medición:

Ho: El sistema es preciso.

Hi: El sistema no es preciso.

Regla de decisión:

Si $CV \leq 1.5 \%$, no se rechaza Ho y por lo tanto hay precisión en el sistema de medición.

Si $CV > 1.5 \%$, se rechaza Ho y no hay precisión en el sistema.

c) Exactitud del método analítico.

Preparar diez muestras de manera independiente con una concentración del 100 % y analizarlas.

Emplear las siguientes fórmulas para conocer la exactitud del método:

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

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

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

$$A_{max} = 2 \times 1.96 \times s$$

Evaluación de la exactitud del método analítico:

Ho: $M = 100 \%$

Hi: $M \neq 100 \%$

Criterio para la regla de decisión:

Si $M = 100 \%$, el método es exacto.

Si $M \neq 100 \%$, el método no es exacto.

d) Linealidad del método analítico:

Determinar la linealidad del método con las siguientes concentraciones: 50, 100, 150 y 200 %, preparar cada una de manera independiente y hacer análisis por triplicado para cada concentración.

Construir la tabla de análisis de varianza correspondiente como en la linealidad del sistema de medición.

Evaluación de la linealidad del método:

Ho: Hay linealidad del método.

Hi: No hay linealidad del método.

Criterio para la regla de decisión:

Si $F_{1calc} \geq F_{crit}$, no se rechaza Ho y por lo tanto hay linealidad del método analítico.

Si $F_{1calc} < F_{crit}$, se rechaza Ho y no hay linealidad del método.

Si $F_{2calc} < F_{crit}$, no hay falta de ajuste.

Si $F_{2calc} \geq F_{crit}$, hay falta de ajuste y error puro.

e) Precisión del método analítico.

Trabajar dos analistas de manera independiente en dos diferentes días haciendo análisis por triplicado para cada una de las cuatro muestras que se encuentran al 100 %.

Calcular los datos necesarios para evaluar la precisión con la siguiente tabla de análisis de varianza:

Tabla de ANADEV					
FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Analista	1	SCa	$\frac{SCa}{gla}$	$F_1 = \frac{MCa}{MCd}$	$F_{(gla, gld, 0.95)}$
Día	(d-1)a	SCd	$\frac{SCd}{gld}$	$F_2 = \frac{MCd}{MCE}$	$F_{(gld, gle, 0.95)}$
Error	(r-1)ad	SCe	$\frac{SCe}{gle}$	—	—

Evaluación de la reproducibilidad del método:

Ho: Hay reproducibilidad.

Hi: No hay reproducibilidad.

Regla de decisión:

Si $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$, el método es reproducible.

Si $F_{\text{calc}} \geq F_{\text{crit}}$, el método no es reproducible.

Evaluación de la repetibilidad del método:

H_0 : Hay repetibilidad.

H_1 : No hay repetibilidad.

Regla de decisión:

Si $F_{2\text{calc}} < F_{\text{crit}}$, el método es repetible.

Si $F_{2\text{calc}} \geq F_{\text{crit}}$, el método no es repetible.

Evaluación de la precisión del método analítico:

H_0 : El método es preciso.

H_1 : El método no es preciso.

Regla de decisión:

Si $CV \leq 3\%$ (por ciento establecido para métodos espectrofotométricos), no se rechaza H_0 y por lo tanto hay precisión en el método analítico.

Si $CV > 3\%$, se rechaza H_0 y no hay precisión en el método analítico.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS .

Los valores R_f obtenidos prácticamente son: para la glicina: 0.38 y para la lisina: 0.03, ambos son muy cercanos a los valores teóricos: 0.32 y 0.02, respectivamente.

Todos los resultados obtenidos en la validación se presentan en cuadros y tablas para su mayor comprensión.

Los resultados que se obtuvieron al evaluar la linealidad del sistema de medición se presentan en los Cuadros No. 1 y 2 y en la Tabla 1 para la glicina, y en los Cuadros No. 3 y 4 y en la Tabla 2 para la lisina. En ambos se tiene que el valor F_1 calculado es mayor que el valor F crítico, para la glicina es: $5669 > 9.07$ y para la lisina es: $4624 > 9.07$, por lo cual no se rechaza H_0 y se considera que hay linealidad del sistema de medición que se observa en la relación altamente significativa entre la concentración y la absorbancia, la cual es una línea recta que se observa en la gráfica No. 1 para glicina y en la gráfica No. 2 para lisina.

Como el valor F_2 calculado es menor que el valor F crítico: para glicina es: $1.25 < 3.71$ y para lisina es: $1.73 < 3.71$, no hay falta de ajuste en la relación lineal simple concentración - propiedad medida y ésto se corrobora

con el valor de R^2 que es 0.9976 para glicina y 0.9952 para lisina.

Para ver si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero se calcula el intervalo de confianza:

$$IC (B) = -0.0244 \text{ a } 0.0055 \text{ para glicina,}$$

$$IC (B) = -0.0424 \text{ a } 0.0022 \text{ para lisina}$$

ambos intervalos incluyen $b = 0$.

Los datos necesarios para la evaluación de la precisión del sistema de medición se anotan en los Cuadros No. 5 y 6 para la glicina y para la lisina en los Cuadros No. 7 y 8. Como el coeficiente de variación es menor a 1.5 % en ambos casos, para glicina es 0.88 % y para lisina es: 0.75 %, no se rechaza H_0 y se considera que el sistema de medición es preciso.

En los Cuadros No. 9 y 10 se señalan los resultados obtenidos en la exactitud del método analítico para la glicina y en los Cuadros No. 11 y 12 para la lisina. Como la media aritmética de ambos métodos (glicina: 99.74 %, lisina: 99.94 %) es relativamente el 100 %, los métodos analíticos se consideran exactos.

Se calcula el intervalo de confianza para el por ciento de recobro para la glicina:

$$IC (M) = 99.1384 \% \text{ a } 100.3476 \%$$

En el intervalo se encuentra el 100 % por lo que es otra

manera de comprobar que el método es exacto. Además, en este intervalo se deben encontrar los por cientos de recobro obtenidos; como se observa que algunos valores quedan fuera de este intervalo se procede a calcular la amplitud máxima y se obtiene un valor de 3.3132; este valor se compara con la diferencia entre el valor más alto (101.19 %) y el valor más bajo (98.62 %) obtenidos que es 2.57. Como esta diferencia queda incluida dentro de la amplitud máxima, es decir, $2.57 < 3.31$, se dice que el método es exacto y se aceptan todos los valores obtenidos.

Lo mismo sucede para la lisina, se calcula el intervalo de confianza para el por ciento de recobro:

$$IC (M) = 99.4574 \% \text{ a } 100.4246 \%$$

En este intervalo se encuentra el 100 % y también se observa que algunos valores no están dentro del intervalo por lo que se calcula la amplitud máxima y se obtiene un valor de 2.6499; este valor se compara con la diferencia entre el valor más alto (101.04 %) y el valor más bajo (98.81 %) obtenidos que es 2.23. Como esta diferencia es menor que la amplitud máxima, $2.23 < 2.65$, se dice que el método es exacto y se aceptan todos los valores que se obtuvieron.

Los Cuadros No. 13 y 14 citan los datos necesarios para construir la tabla de Análisis de Varianza (Tabla 3) para evaluar la linealidad del método para glicina. Los Cuadros No.15 y 16 y la Tabla 4 presentan los resultados para la

lisina. Se observa que el valor F_1 calculado es mayor que el valor F crítico en ambos casos, para la glicina se tiene: $75832 > 10.04$ y para la lisina: $177099 > 10.04$, por lo cual no se rechaza H_0 y existe una relación altamente significativa entre el por ciento adicionado y el por ciento recuperado que se puede observar mediante una línea recta en la gráfica No. 3 y No. 4 para glicina y lisina, respectivamente.

También se observa que el valor F_2 calculado es menor que el valor F crítico para los dos aminoácidos, la glicina tiene un valor de 2.6583 y la lisina de 2.5175, ambos son menores a 4.46, por lo que no existe falta de ajuste a la relación lineal simple por ciento adicionado - por ciento recuperado, lo que se comprueba con el valor de R^2 que es 0.9999 para ambos.

Para ver si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, se calcula el intervalo de confianza:

$$IC (B) = -1.3702 \text{ a } 0.8552 \text{ para glicina,}$$

$$IC (B) = -0.6051 \text{ a } 0.8467 \text{ para lisina}$$

en los dos casos el intervalo incluye $b = 0$.

Para ver si la pendiente es estadísticamente igual a uno, se calcula el intervalo de confianza:

$$IC (M) = 0.9962 \text{ a } 1.0124 \text{ para glicina,}$$

$$IC (M) = 0.9960 \text{ a } 1.0066 \text{ para lisina}$$

los intervalos incluyen $m = 1$.

La precisión del método analítico se evalúa en el Cuadro

No. 17 y Tabla 5 para la glicina y en el Cuadro No. 18 y la Tabla 6 para la lisina. En la reproducibilidad del método se observa que el valor F_1 calculado es menor que el valor F crítico, para glicina es: $3.3328 < 18.51$ y para lisina es: $0.0141 < 18.51$, por lo que no se rechaza H_0 y se considera que el método es reproducible.

Para la glicina se calcula la variación interanalista:

$$\sigma_a = 0.1570$$

$$A_{max} = 0.6154$$

esta amplitud máxima se compara con la diferencia de las medias aritméticas del analista 1 ($\bar{y} = 100.20$) y del analista 2 ($\bar{y} = 99.93$) que es 0.27 y se observa que $0.27 < 0.6154$, por lo que se dice que el método es reproducible entre analistas.

Se calcula la variación interdías por analista:

$$\sigma_d = 0.2882$$

$$A_{max} = 1.1297$$

esta amplitud máxima se compara con la diferencia de las medias aritméticas de los días 1 ($\bar{y} = 100.26$) y 2 ($\bar{y} = 100.13$) del analista 1 que es 0.13 y con la diferencia de las medias del día 1 ($\bar{y} = 100.06$) y 2 ($\bar{y} = 99.80$) del analista 2 que es 0.26. Como $0.13 < 1.1297$ y $0.26 < 1.1297$, se dice que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Para la lisina también se calcula la variación interanalista:

$$\sigma_a = 0.1639$$

$$A_{max} = 0.6425$$

esta amplitud máxima se compara con la diferencia de las medias aritméticas del analista 1 ($\bar{y} = 100.20$) y del analista 2 ($\bar{y} = 100.17$) que es 0.03, se observa que $0.03 < 0.6425$, por lo tanto, el método es reproducible entre analistas.

Se calcula la variación interdías por analista:

$$\sigma_d = 0.0936$$

$$A_{max} = 0.3669$$

$$A_{max} = 0.4792$$

esta última amplitud máxima se compara con la diferencia de las medias aritméticas de los días 1 ($\bar{y} = 100.00$) y 2 ($\bar{y} = 100.40$) del analista 1 que es: 0.40 y con la diferencia de las medias del día 1 ($\bar{y} = 100.30$) y 2 ($\bar{y} = 100.05$) del analista 2 que es: 0.25. Como $0.40 < 0.4792$ y $0.25 < 0.4792$, se dice que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

En la evaluación de la repetibilidad del método se debe cumplir que el valor F_2 calculado sea menor que el valor F crítico, como $0.2029 < 4.46$ para glicina y $1.1918 < 4.46$ para lisina, no se rechaza H_0 y se considera que el método es repetible.

Para la glicina se calcula la repetibilidad del método:

$$\sigma_e = 0.5590$$

$$A_{max} = 2.1913$$

este último valor se compara con las diferencias entre el valor más alto y más bajo para cada día y cada analista, así se tiene que para el analista 1 en el día 1 es: 0.99 (100.79 - 99.80), para el analista 1 en el día 2 es: 1.18, para el analista 2 en el día 1 es: 0.99 y para el analista 2 en el día 2 es: 1.19. Como $0.99 < 2.1913$, $1.18 < 2.1913$, $0.99 < 2.1913$ y $1.19 < 2.1913$, se dice que el método tiene repetibilidad.

Para la lisina también se calcula la repetibilidad del método:

$$\sigma_e = 0.3703$$

$$A_{\max} = 1.4516$$

esta amplitud máxima se compara con las diferencias entre el valor más alto y más bajo para cada día y cada analista, así se tiene que $0.75 < 1.4516$, $0.74 < 1.4516$, $0.74 < 1.4516$ y $0.60 < 1.4516$, por lo cual el método tiene repetibilidad.

Al observarse que los métodos son reproducibles y repetibles se dice que son precisos.

Los coeficientes de variación total para ambos son menores al 3 % establecido para métodos espectrofotométricos (glicina: 0.51 %, lisina: 0.36 %), por lo cual no se rechaza H_0 y se confirma que el método analítico es preciso.

En la Tabla 7 se presenta un resumen de los resultados de la validación de glicina y en la Tabla 8 los resultados de lisina.

A continuación se presentan los cuadros, tablas y gráficas citados:

Cuadro No. 1 Resultados de las absorbancias para las diferentes concentraciones finales en la linealidad del sistema para glicina.

Concentración final µg/ml	Absorbancias		
1.000	0.402	0.398	0.403
1.125	0.462	0.457	0.452
1.250	0.505	0.508	0.510
1.375	0.559	0.556	0.562
1.500	0.604	0.609	0.611

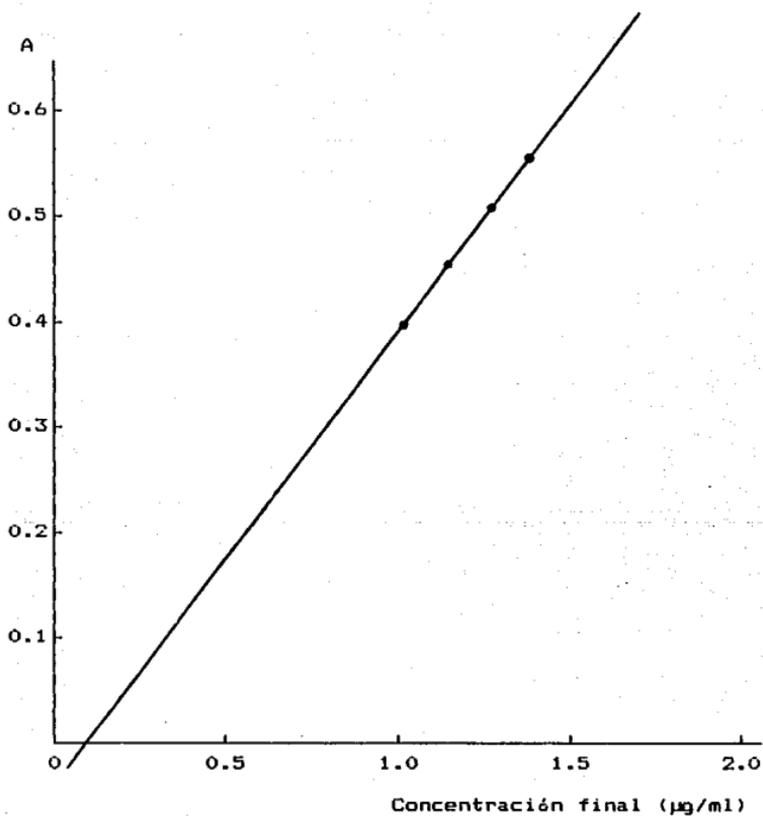
Cuadro No. 2 Datos necesarios para construir la Tabla de Análisis de Varianza:

Σx	=	18.7500	Σy	=	7.5980
Σx^2	=	23.9063	Σy^2	=	3.9287
Σxy	=	9.6910	Σyi^2	=	11.7857
t	=	5	r	=	3
n	=	15			
m	=	0.4128	b	=	-9.4667×10^{-3}

Tabla 1. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del sistema.

FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Regresión	1	0.0799	0.0799	5669.88	9.07
Error de regresión	13	1.8319×10^{-4}	1.4092×10^{-5}	—	—
Falta de ajuste	3	4.9860×10^{-5}	1.6620×10^{-5}	1.2465	3.71
Error puro	10	1.3333×10^{-4}	1.3333×10^{-5}	—	—

Gráfica No. 1 Linealidad del sistema de medición
para glicina: absorbancia - concentración final



Cuadro No. 3 Resultados de las absorbancias para las diferentes concentraciones finales en la linealidad del sistema para lisina.

Concentración final $\mu\text{g/ml}$	Absorbancias		
4.8	0.529	0.527	0.521
5.4	0.610	0.607	0.613
6.0	0.676	0.671	0.679
6.6	0.746	0.738	0.740
7.2	0.808	0.814	0.796

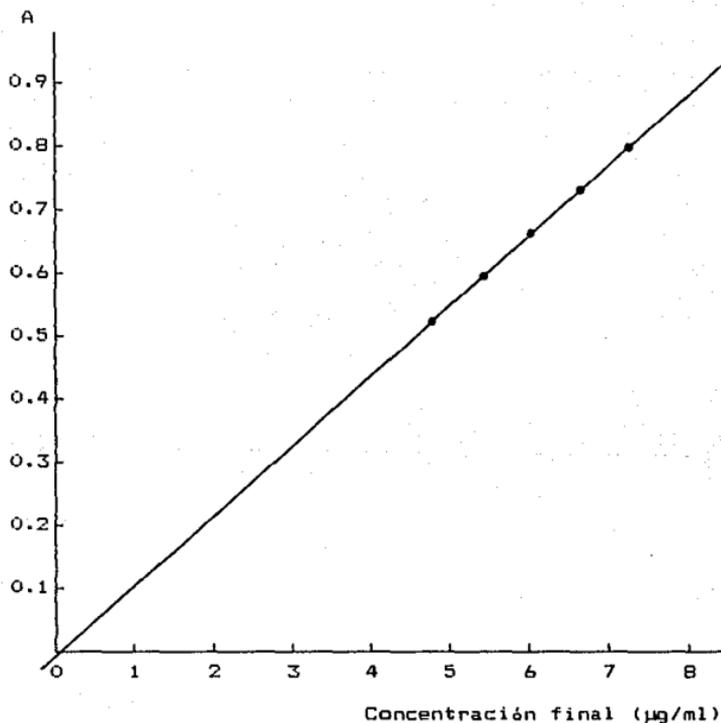
Cuadro No. 4 Datos necesarios para construir la Tabla de Análisis de Varianza:

Σx	=	90.0000	Σy	=	10.0750
Σx^2	=	550.8000	Σy^2	=	6.9114
Σxy	=	61.6956	Σyi^2	=	20.7334
t	=	5	r	=	3
n	=	15			
m	=	0.1153	b	=	-0.0201

Tabla 2. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del sistema.

FV	GL	SC	MC	F _{calc}	F _{crit}
Regresión	1	0.1440	0.1440	4624.27	9.07
Error de regresión	13	4.0482×10^{-4}	3.1140×10^{-5}	—	—
Falta de ajuste	3	1.3815×10^{-4}	4.6050×10^{-5}	1.7269	3.71
Error puro	10	2.6667×10^{-4}	2.6667×10^{-5}	—	—

Gráfica No. 2 Linealidad del sistema de medición
para lisina: absorbancia - concentración final



Cuadro No. 5 Resultados de las absorbancias para la evaluación de la precisión del sistema para glicina

Medición No.	Absorbancia
1	0.501
2	0.508
3	0.512
4	0.505
5	0.507
6	0.500
7	0.509
8	0.502
9	0.499
10	0.504

Cuadro No. 6 Datos necesarios para evaluar la precisión del sistema para glicina:

Σy	=	5.0470	\bar{y}	=	0.5047
Σy^2	=	2.5474	s	=	4.4609×10^{-3}
n	=	10	CV	=	0.8839 %

Cuadro No. 7 Resultados de las absorbancias para la evaluación de la precisión del sistema para lisina.

Medición No.	Absorbancia
1	0.676
2	0.671
3	0.666
4	0.670
5	0.679
6	0.676
7	0.673
8	0.670
9	0.674
10	0.681

Cuadro No. 8 Datos necesarios para evaluar la precisión del sistema para lisina:

$\Sigma y = 6.7360$	$\bar{y} = 0.6736$
$\Sigma y^2 = 4.5376$	$s = 5.0596 \times 10^{-3}$
$n = 10$	$CV = 0.7511 \%$

Cuadro No. 9 Por cientos de recobro de las muestras para la evaluación de la exactitud del método para glicina:

Muestra No.	% de recobro
1	100.40
2	99.80
3	98.81
4	99.01
5	100.59
6	99.60
7	98.62
8	101.19
9	100.20
10	99.20

Cuadro No. 10 Datos necesarios para evaluar la exactitud:

$E_y =$	997.4300	$\bar{y} =$	99.7430
$E_{y^2} =$	99493.0890	$s =$	0.8452
$n =$	10		

Cuadro No. 11 Por cientos de recobro de las muestras para la evaluación de la exactitud del método para lisina:

Muestra No.	% de recobro
1	100.30
2	98.81
3	99.55
4	99.41
5	100.74
6	100.30
7	99.85
8	99.41
9	100.00
10	101.04

Cuadro No. 12 Datos necesarios para evaluar la exactitud:

Σy =	999.4100	\bar{y} =	99.9410
Σy^2 =	99886.1470	s =	0.6760
n =	10		

Cuadro No. 13 Relación de los porcentajes adicionado y recuperado para la evaluación de la linealidad del método para glicina.

% Adicionado	% Recuperado		
	50	49.80	49.41
100	100.99	100.59	99.60
150	149.41	150.79	150.99
200	200.20	200.59	200.79

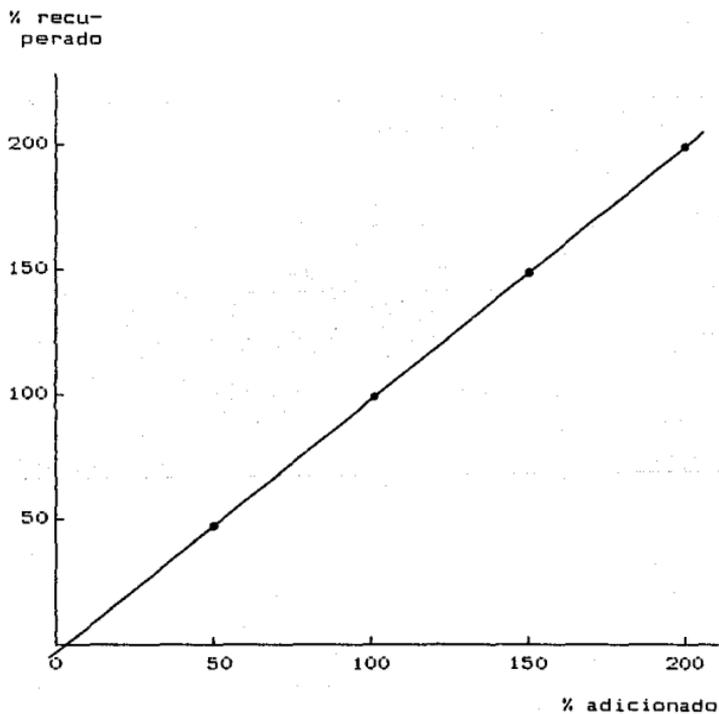
Cuadro No. 14 Datos necesarios para evaluar la linealidad del método:

Σx	=	1500	Σy	=	1503.36
Σx^2	=	225000	Σy^2	=	226170.88
Σxy	=	225583	Σyi^2	=	678503.65
t	=	4	r	=	3
n	=	12			
m	=	1.0043	b	=	-0.2575

Tabla 3. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del método.

FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Regresión	1	37824.9510	37824.9510	75831.89	10.04
Error de regresión	10	4.9883	0.4988	—	—
Falta de ajuste	2	1.9916	0.9958	2.6583	4.46
Error puro	8	2.9967	0.3746	—	—

Gráfica No. 3 Linealidad del método analítico para glicina: % recuperado - % adicionado



Cuadro No. 15 Relación de los porcentajes adicionado y recuperado para la evaluación de la linealidad del método para lisina.

% Adicionado	% Recuperado		
	50	50.14	49.70
100	100.74	100.30	99.85
150	149.85	150.45	150.74
200	200.15	200.59	200.30

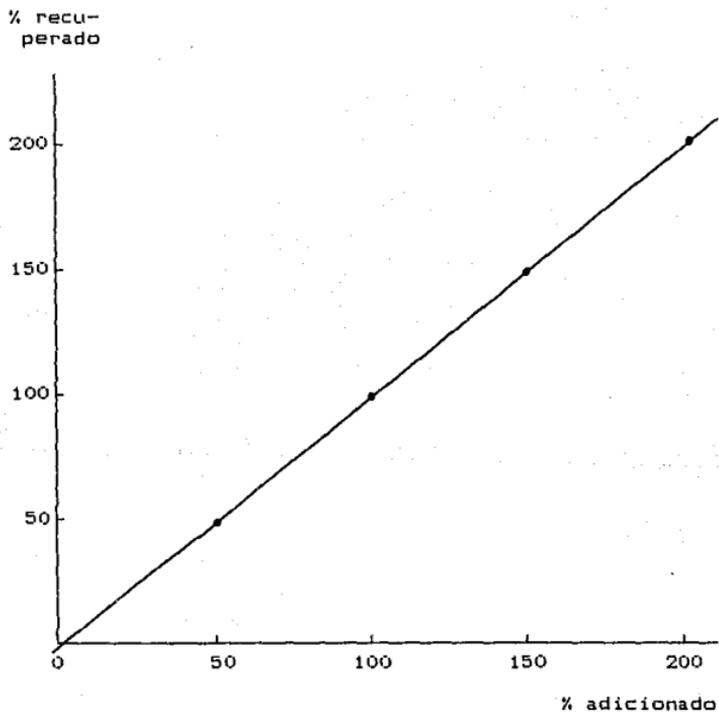
Cuadro No. 16 Datos necesarios para evaluar la linealidad del método:

Σx	=	1500.00	Σy	=	1503.40
Σx^2	=	225000.00	Σy^2	=	225951.35
Σxy	=	225474.50	Σyi^2	=	677850.14
t	=	4	r	=	3
n	=	12			
m	=	1.0013	b	=	0.1208

Tabla 4. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del método.

FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Regresión	1	37598.2640	37598.2640	177099.69	10.04
Error de regresión	10	2.1234	0.2123	—	—
Falta de ajuste	2	0.8201	0.4101	2.5175	4.46
Error puro	8	1.3033	0.1629	—	—

Gráfica No. 4 Linealidad del método analítico
para lisina: % recuperado - % adicionado



Cuadro No. 17 Resultados del por ciento de recobro por dos analistas en dos días para glicina.

Día	Analista	
	1	2
1	100.79	99.60
	99.80	100.00
	100.20	100.59
2	100.40	99.21
	100.59	99.80
	99.41	100.40

Tabla 5. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la precisión del método para glicina

FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Analista	1	0.2113	0.2113	3.3328	18.51
Día	2	0.1267	0.0634	0.2029	4.46
Error	8	2.5000	0.3125	—	—

Cuadro No. 18 Resultados del por ciento de recobro por dos analistas en dos días para lisina.

Día	Analista	
	1	2
1	99.55	100.59
	100.15	99.85
	100.30	100.45
2	100.45	99.70
	100.74	100.30
	100.00	100.15

Tabla 6. Tabla de Análisis de Varianza para evaluar la precisión del método para lisina.

FV	GL	SC	MC	Fcalc	Fcrit
Analista	1	0.0023	0.0023	0.0141	18.51
Día	2	0.3267	0.1634	1.1918	4.46
Error	8	1.0967	0.1371	—	—

Tabla 7. Resumen de los Resultados de la Validación de Glicina.

Parámetro	Resultados
Linealidad del Sistema de Medición	$m = 0.4128$ $b = -9.4667 \times 10^{-3}$ $R^2 = 0.9976$ 5669 (Fcalc regresión) > 9.07 (Fcrit) 1.25 (Fcalc falta de ajuste) < 3.71 (Fcrit)
Precisión del Sistema	0.88 % (CV calc) < 1.5 % (CV establecido)
Exactitud del Método	$\bar{y} = 99.7430 \%$
Linealidad del Método Analítico	$m = 1.0043$ $b = -0.2575$ $R^2 = 0.9999$ 75832 (Fcalc regresión) > 10.04 (Fcrit) 2.66 (Fcalc falta de ajuste) < 4.46 (Fcrit)
Precisión del Método Analítico	3.33 (Fcalc analista) < 18.51 (Fcrit) Existe reproducibilidad 0.20 (Fcalc día) < 4.46 (Fcrit) Existe repetibilidad 0.51 % (CV calculado) < 3 % (CV establecido) Existe precisión

Tabla B. Resumen de los Resultados de la Validación de Lisina.

Parámetro	Resultados
Linealidad del Sistema de Medición	$m = 0.1153$ $b = -0.0201$ $R^2 = 0.9952$ 4624 (Fcalc regresión) > 9.07 (Fcrit) 1.73 (Fcalc falta de ajuste) < 3.71 (Fcrit)
Precisión del Sistema	0.75% (CV calc) $< 1.5\%$ (CV establecido)
Exactitud del Método	$\bar{y} = 99.9410\%$
Linealidad del Método Analítico	$m = 1.0013$ $b = 0.1208$ $R^2 = 0.9999$ 177099 (Fcalc regresión) > 10.04 (Fcrit) 2.52 (Fcalc falta de ajuste) < 4.46 (Fcrit)
Precisión del Método Analítico	0.01 (Fcalc analista) < 18.51 (Fcrit) Existe reproducibilidad 1.19 (Fcalc día) < 4.46 (Fcrit) Existe repetibilidad 0.36% (CV calculado) $< 3\%$ (CV establecido) Existe precisión

4.2 DISCUSION .

Linealidad del Sistema de Medición.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las Tablas 1 y 2 de análisis de varianza se tiene que los sistemas de medición para glicina y lisina son lineales (ver Gráficas 1 y 2, respectivamente). En ambos sistemas se observa una relación altamente significativa entre la concentración y la absorbancia que se mide con el coeficiente de determinación (R^2), el cual para glicina tiene un valor de: 0.9976 y para lisina de: 0.9952, y en ambos casos es mayor a 0.98 como se establece en los criterios para evaluar este parámetro. Este coeficiente de determinación también indica que no hay falta de ajuste ni presencia de error experimental o puro en esta relación lineal concentración - absorbancia.

En ambos sistemas, la ordenada al origen se considera como cero, debido a que en los dos casos este valor ($b = 0$) está incluido en los intervalos de confianza.

Por lo anterior, el sistema de medición resulta lineal según los criterios establecidos para su aceptación.

Precisión del Sistema de Medición.

Para que un sistema de medición sea preciso debe cumplir con un coeficiente de variación menor o igual a 1.5 %. Se tiene que el coeficiente de variación para glicina es 0.88 % y el coeficiente de variación para la lisina es 0.75 %, ambos resultados son menores a 1.5 %, por lo que se establece que el

sistema de medición es preciso.

Exactitud del Método Analítico.

El método analítico es exacto para los dos aminoácidos porque en ambos la media aritmética se considera como el 100%, ya que los resultados obtenidos son aproximados a este valor: para glicina se obtiene una media aritmética de 99.74 % y para lisina de: 99.94 %. Además que en los intervalos de confianza para la media también se encuentra el 100 %.

Como se dijo anteriormente, en los intervalos de confianza se deben encontrar los resultados obtenidos al igual que la media aritmética; como se observa que algunos valores quedan fuera del intervalo se calcula la amplitud máxima tomando en cuenta el 95 % de confiabilidad en la distribución t de Student, la cual se compara con la diferencia del valor más alto y más bajo obtenidos. Así, para glicina se tiene: $2.57 < 3.31$ (Amax) y para lisina se tiene: $2.23 < 2.65$ (Amax). Por lo tanto, como esta diferencia de valores queda incluida dentro de la amplitud máxima, todos los valores que se obtuvieron experimentalmente son aceptados y se considera que el método es exacto.

Linealidad del Método Analítico.

Al observar las Gráficas 3 y 4 y los resultados que se obtuvieron en las Tablas 3 y 4 de análisis de varianza se deduce que el método analítico es lineal, no tiene falta de

ajuste ni error experimental y esto se confirma con el valor del coeficiente de determinación, el cual para glicina y lisina es: 0.9999 que es mayor a 0.98, lo que comprueba una relación altamente significativa.

En los intervalos de confianza para la ordenada al origen se encuentra $b = 0$ y en los intervalos de confianza para la pendiente se encuentra $m = 1$, esto comprueba que el método es lineal e indica que no hay error sistemático lo cual certifica la exactitud del método, ya que un método analítico que no presenta error sistemático es exacto.

Precisión del Método Analítico.

Esta prueba se llevó a cabo con dos analistas y dos días y conforme a los resultados obtenidos en las Tablas 5 y 6 de análisis de varianza se infiere que el método es reproducible bajo estas diferentes condiciones de medición y es reproducible entre diferentes analistas y en distintos días por un mismo analista.

La variación interanalista se calculó con un límite de confianza del 95 % al igual que la variación interdías por analista para glicina, pero para la lisina se calculó con un límite de confianza del 99 % debido a que con el 95 % la amplitud máxima quedaba más baja que la diferencia entre las medias y de esta forma la amplitud máxima es mayor que la diferencia de las medias, así se demuestra que el método es reproducible en distintos días por un mismo analista. Si con

este límite de confianza no se obtuviera un valor más grande para la amplitud máxima, entonces los resultados no indicarían la reproducibilidad del método y se tendría que repetir la prueba por el mismo analista o por otro analista.

Con los resultados obtenidos en las Tablas 5 y 6 de análisis de varianza se muestra que el método es repetible y ésto se comprueba con el cálculo de la desviación estandar del error (σ_e) y su amplitud máxima, y como las diferencias de los valores más altos y más bajos para cada día y cada analista son menores a la amplitud máxima, se afirma que el método es repetible.

El coeficiente de variación total indica la variación del analista, del día y del método, y como su valor, tanto para glicina, que es 0.51 %, como para la lisina, que es 0.36 %, es menor al establecido para métodos espectrofotométricos (3 %), se asegura que el método analítico es preciso.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico que sirve para cuantificar glicina y lisina en un elixir como producto terminado y este método desarrollado fue validado con los parámetros estadísticos adecuados.

El método analítico se eligió después de varias determinaciones con diferentes solventes en la cromatografía en capa fina y después de experimentar con diferentes soluciones de ninhidrina hasta que se obtuvo un método que satisficiera todos los requisitos del análisis.

En cuanto a la validación, los parámetros desarrollados certifican la eficacia del método, por lo cual se afirma que es un método analítico exacto, preciso y lineal, y es específico para estos dos aminoácidos a través de la cromatografía en capa fina.

Además, como la validación es un requerimiento necesario y obligatorio en la actualidad para cualquier proceso, el presente trabajo puede ser una guía para validar otros métodos analíticos.

Por lo anterior, se concluye que el método analítico implementado cumple con la función asignada y se podrá emplear como técnica en la cuantificación de glicina y lisina en elixir como producto terminado.

Este método puede emplearse para la cuantificación de estos aminoácidos en otras formas farmacéuticas debido a que ambos son solubles en agua y a que la fase móvil da una buena separación.

Para glicina se obtiene experimentalmente un R_f de 0.38 y para lisina se obtiene un R_f de 0.03, con lo cual se advierte que no hay interferencia entre aminoácidos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

B I B L I O G R A F I A

1. Allen, G., SEQUENCING OF PROTEINS AND PEPTIDES, 2a. edición, Elsevier Science Publishers B. V., Holanda, (1989).
2. Barret, C. G., CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF THE AMINOACIDS, 3a. edición, J. W. Arrowsmith, Ltd., Gran Bretaña, (1985).
3. Bauer, E. L., MANUAL DE ESTADISTICA PARA QUIMICOS, 5a. edición, Ed. Alhambra, S. A., España, (1974).
4. Bhagavan, V. N., BIOQUIMICA, 2a. edición, Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V., México, (1983).
5. Borel; Randoux; Peuch, BIOQUIMICA DINAMICA, 1a. edición, Ed. Médica Panamericana, S. A., Argentina, (1989).
6. Burton; Routh, QUIMICA ORGANICA Y BIOQUIMICA, 1a. edición, Nueva Editorial Interamericana, S. A., México, (1977).
7. Cemeli, J. P., La Validación, una Filosofía y un Sistema, C. I. F., 4: 8: 220 - 226, (1985).
8. Connors, A. K., CURSO DE ANALISIS FARMACEUTICO, 5a. edición, Ed. Reverté, S. A., España, (1980).
9. CURSO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS, Con sultorio y Servicios en Estadística Biomédica y Farmacéutica,

A. P., (1989).

10. Daniel, W. W., BIOESTADISTICA. BASE PARA EL ANALISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD, 4a. edición, Ed. Limusa, S. A., México, (1982).

11. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION, Lunes 18 de Enero de 1988.

12. Edwards, D. I., CROMATOGRAFIA. PRINCIPIOS Y TECNICAS, 3a. edición, Ed. El Manual Moderno, S. A., México, (1975).

13. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5a. edición, México, (1988).

14. Gennaro; Chase; Gibson; Granberg, FARMACIA REMINGTON, 17a. edición, Ed. Médica Panamericana, S. A., Argentina, (1987).

15. Goodman; Gilman, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA, 7a. edición, Ed. Médica Panamericana, S. A., México, (1986).

16. Guerra; Finkelson, Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories, Pharmaceutical Technology, 10: 3: 74 - 84, (1986).

17. Guyton, C. A., FISILOGIA HUMANA, 6a. edición, Nueva Editorial Interamericana, S. A., México, (1987).

18. Kratochvil; Taylor, Sampling for Chemical Analysis, Analytical Chemistry, 53: 8: 924 A - 938 A, (1981).

19. Mark; Norris; Williams, Methods of Determining the True Accuracy of Analytical Methods, Analytical Chemistry, 61: 5: 398 - 403, (1989).

20. Martindale, EXTRA PHARMACOPOEIA, 5a. edición, The Pharmaceutical Press, Great Britain, (1967).

21. Morrison; Boyd, QUIMICA ORGANICA, 2a. edición, Fondo Educativo Interamericano, S. A., México, (1985).

22. Pozas, H. R., CURSO BASICO SOBRE LA ESPECTROSCOPIA EN LA INDUSTRIA QUIMICA FARMACEUTICA, Asociación Farmacéutica Politécnica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, (1979).

23. Randerath, K., THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, 2a. edición, Weinheim-Bergstr Academic Press, Alemania, (1965).

24. Smith; Feinberg, CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL Y CAPA FINA. ELECTROFORESIS, 3a. edición, Ed. Alhambra, S. A., España, (1979).

25. Strobel, H. A., INSTRUMENTACION QUIMICA, 4a. edición, Ed. Limusa, S. A., México, (1982).

26. TALLER DE VALIDACION, Asociación Farmacéutica Mexicana, (1988).

27. Taylor, K. J., Quality Assurance of Chemical Measurements, Analytical Chemistry, 53: 14: 1588 A - 1596 A, (1981).

28. Taylor, K. J., Validation of Analytical Methods, Analytical Chemistry, 55: 6: 600 A - 608 A, (1983).