



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

9
2y'

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

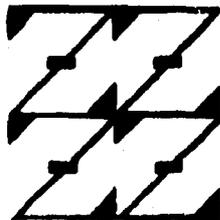
“ZARAGOZA”

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO PARA LA
CUANTIFICACION DE SULFATO DE
EFEDRINA Y CLORHIDRATO DE HIDROXINA
CONTENIDOS EN UN JARABE POR
CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:
SILVIA CERVANTES GARDUÑO



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ.

VOCAL: Q.F.B. JOSE INES JUAREZ LOPEZ.

SECRETARIO: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES.

1º. SUPLENTE: Q.F.B. MABEL C. FRAGOSO SERRANO.

2º. SUPLENTE: Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ.

SITIO DONDE SE REALIZO EL PROYECTO:

LABORATORIOS COLUMBIA S.A.

SUSTENTANTE: SILVIA CERVANTES GARDUÑO

ASESOR INTERNO: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES.

ASESOR EXTERNO: Q.F.B. JOSE INES JUAREZ LOPEZ.

GLOSARIO

b	ORDENADA
r	COEFICIENTE DE CORRELACION
r^2	COEFICIENTE DE DETERMINACION
CV	COEFICIENTE DE VARIACION
IC	INTERVALO DE CONFIANZA
m	PENDIENTE
n	NUMERO DE REPLICACIONES
t	NUMERO DE DILUCIONES
y	MEDIA ARITMETICA
S^2	VARIANZA
DE	DESVIACION ESTANDAR
x	DILUCION O CANTIDAD ADICIONAL
a	ANALISTA
d	DIA
gl	GRADOS DE LIBERTAD
MC	MEDIA DE CUADRADOS
F	FACTOR DE DISTRIBUCION F DE FISHER
SC	SUMA DE CUADRADOS
Σ	SUMATORIA

CONTENIDO		PAG
I	INTRODUCCION	I
II	FUNDAMENTACION DEL TEMA	1
A	CROMATOGRAFIA	1
	1 ANTECEDENTES HISTORICOS	1
	2 DEFINICION DE LA CROMATOGRAFIA	1
	3 CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA	2
	4 MECANISMOS DE SEPARACION	3
	5 PARAMETROS FUNDAMENALES EN LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	5
	6 COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS Y EL PROCESO CROMATOGRAFICO	9
B	DESCRIPCION DE LOS FARMACOS, PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y FARMACOLOGICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	14
	1 CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	14
	2 SULFATO DE EFEDRINA	15
C	VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	16
	1 DEFINICION	16
	2 PROCEDIMIENTOS DE VALIDACION, PARAMETROS ESTADISTICOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION	16
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV	OBJETIVOS	20
	OBJETIVO GENERAL	20
	OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
V	HIPOTESIS	21
VI	MATERIAL Y METODO	22
VII	RESULTADOS	25
	1 CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	26
	2 SULFATO DE EFEDRINA	34
VIII	ANALISIS DE RESULTADOS	43
IX	CONCLUSION	47
X	SUGERENCIAS	47
	ANEXO	II
	BIBLIOGRAFIA	III

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG
1	CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA	2
2	CROMATOGRAMA TIPO	6
3	ANCHO DE PICO EMPLEADOS PARA EL CALCULO DE N.	7
4	COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS	9
5	CROMATOGRAMA DEL SULFATO DE EFEDRINA Y CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	25
6	ESPECIFICIDAD PARA EL CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	28
7	ESPECIFICIDAD PARA EL SULFATO DE EFEDRINA	34

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA		
1	LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA EN UN JARABE	28
2	LINEALIDAD DEL METODO PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA EN UN JARABE	31
3	LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA SULFATO DE EFEDRINA EN UN JARABE	36
4	LINEALIDAD DEL METODO PARA EL SULFATO DE EFEDRINA EN UN JARABE	39

INDICE DE TABLAS

TABLA		
1	METODOS PARA EL CALCULO DE N.	7
2	RESULTADOS DE LA LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	28
3	RESULTADOS DE LA LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	31
4	REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	32
5	ANALISIS DE VARIANZA PARA EL CLORHIDRATO DE HIDROXICINA ..	33
6	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA EL CLORHIDRATO DE HIDROXICINA	33
7	RESULTADOS DE LA LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA PARA EL SULFATO DE EFEDRINA	36
8	RESULTADOS DE LA LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO PARA EL SULFATO DE EFEDRINA	39
9	REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA SULFATO DE EFEDRINA ..	40
10	ANALISIS DE VARIANZA PARA EL SULFATO DE EFEDRINA	41
11	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA EL SULFATO DE EFEDRINA ..	41

I. INTRODUCCION

En la comunidad global, la palabra "calidad" se ha convertido no solo en la clave internacional de la excelencia, si no en algo de suma importancia para obtener un continuo mejoramiento con cero defectos y la satisfacción del cliente.

En el campo del cuidado de la salud, la calidad es un verdadero compromiso. Ante tal situación, aumenta cada día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis garantizando su efectividad mediante una validación, y que de ésta, se obtenga información sobre la confiabilidad del método analítico y que se emplee en el análisis del principio activo de una forma farmacéutica.

La validación debe cumplir con ciertos parámetros estadísticos, los cuales son establecidos por la Secretaria de Salud en nuestro país, la cual da una serie de normas o especificaciones legales que respaldan al método analítico.

En el presente trabajo se realizó el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución en un jarabe, al cual se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad y estabilidad de la muestra.

Los resultados de la validación demuestran que el método desarrollado es lineal, preciso, exacto, específico y estable por 24 hrs.

Por lo que puede ser utilizado como un método de control de calidad en la determinación de sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina en jarabe con la seguridad de que los resultados obtenidos son confiables.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

A. CROMATOGRAFIA.

1. Antecedentes históricos.

La historia de la cromatografía se puede dividir en varios períodos que corresponden cada uno al desarrollo de un nuevo método cromatográfico:

La cromatografía de líquidos en columna "clásica" aparece a principios de éste siglo con la publicación de los trabajos de Tswett, quien separó una mezcla de colorantes en una columna empacada con sílice utilizando como eluyente un líquido. Sin embargo, éste método de separación presentaba algunas desventajas que limitaron su popularidad, básicamente las desventajas fueron las siguientes: la falta de detectores y la lentitud de las separaciones. (1)(18)

En la década de los 30's, el método fué modificado permitiendo que los componentes salieran de la columna para recogerse en fracciones que posteriormente se evaluaba. En la década del '40 Tiselius incorporó un monitor de medición continua (Índice de refracción).

Hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, farmacéutica, biológico o farmacéutico.(20)

2. Definición de la cromatografía

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido. El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.(18)

3. Clasificación de la cromatografía

Basándonos en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, los cuales a su vez se dividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal y como se muestra en la figura 1 (2)

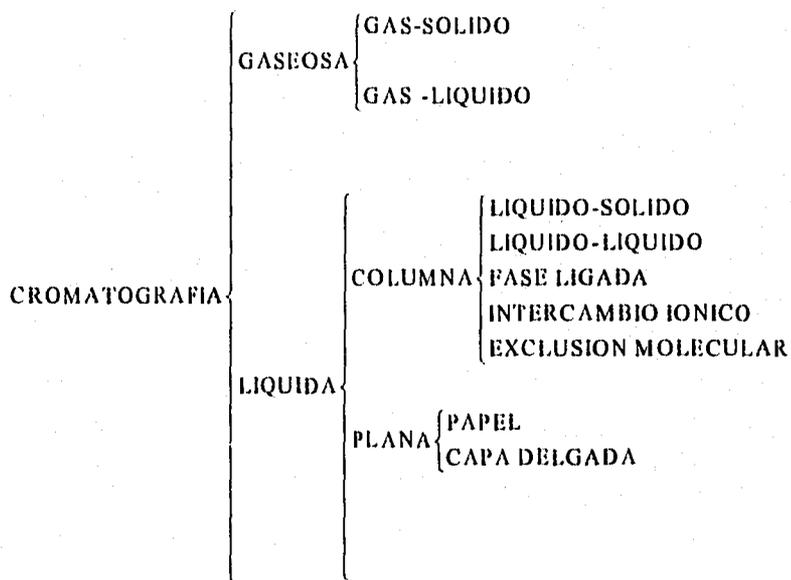


Figura 1. clasificación de la cromatografía

4. Mecanismos de separación

En la cromatografía en columna o cromatografía de líquidos de alta resolución también conocida como CLAR o HPLC (High Performance Liquid Chromatography), existen seis mecanismos diferentes para la retención de las moléculas de la muestra por fase estacionaria, estos son:

- a) Cromatografía líquido-líquido.
- b) Cromatografía líquido-sólido.
- c) Cromatografía de intercambio iónico.
- d) Cromatografía de permeación en gel
- e) Cromatografía en fase normal.
- f) Cromatografía en fase inversa.

a) Cromatografía líquido-líquido.

Comúnmente conocida como cromatografía de partición, involucra una fase estacionaria líquida cuya composición es diferente a la fase móvil líquida. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria, al igual que en una extracción líquido-líquido en un embudo de separación. La fase móvil y la fase estacionaria deben ser inmiscibles.

Inicialmente la fase estacionaria líquida se encontraba unida químicamente a un soporte sólido, pero con frecuencia sufría el arrastre por parte de la fase móvil, para evitar este inconveniente se creó una nueva técnica: cromatografía de fase enlazada, en la cual la fase estacionaria está permanentemente unida al soporte para obtener diferentes grados de polaridad en la fase estacionaria.(4)

h) Cromatografía líquido-sólido.

También conocida como cromatografía de adsorción. En el empaque encontramos partículas con grandes áreas de contacto que retienen a las moléculas de la muestra por atracción (afinidad cromatográfica). Los materiales utilizados generalmente en la fase estacionaria son: alumina, carbón activado y carbonato de calcio. Normalmente la cromatografía de adsorción separa los compuestos por grupos funcionales de acuerdo a la polaridad, a través de etapas de adsorción-desorción.(4)

c) Cromatografía de intercambio iónico.

El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra, esta técnica se utiliza casi exclusivamente con muestra iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y por tanto, más tiempo tardará en ser eluida.(18)

d) Cromatografía de permeación en gel.

En esta técnica denominada también como cromatografía por exclusión, la separación de los componentes de la muestra se realiza de acuerdo al tamaño de las moléculas, las más pequeñas penetrarán en la mayoría de los poros de la fase estacionaria, por lo tanto, serán retenidas mayor tiempo que las moléculas grandes, las cuales pasarán libremente a través de la columna que por su tamaño no penetrarán en los poros. Los materiales utilizados como relleno en la fase estacionaria son geles poliméricos rígidos, con un tamaño de poro controlado.

El tiempo de retención de cada compuesto estará en relación inversa a su peso molecular; menor tiempo de retención para compuestos con mayor peso molecular.

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea su polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto, esto es:

e) Cromatografía en fase normal.

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es apolar. las muestra polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

f) Cromatografía en fase inversa.

Es el proceso inverso, en el cual, el lecho estacionario es de naturaleza apolar, mientras la fase móvil es un líquido polar, cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención.

Donde la partícula base de sílica gel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, (los silanoles de características polares) por determinados grupos funcionales, entre ellos se encuentran: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C₁₈), octilsilano (C₈), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc. (20)

5. Parámetros fundamentales en la cromatografía de líquidos de alta resolución.

El cromatograma comienza en el momento en que la solución en ensayo es inyectada (ver cromatograma tipo en la figura 2). A partir de ese punto, las señales encontradas en el cromatograma pueden clasificarse como: Volumen de elución (V_{el}): es el volumen de fase móvil entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A flujo constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de retención.

Tiempo de retención (t_r): es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal).

Línea base: es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto. (20)

Resolución (R).

Como se ha dicho, el objetivo primario de la cromatografía es la separación de los constituyentes de una muestra. Es natural, entonces, la necesidad de contar con una expresión cuantitativa de la calidad de la separación. Esta expresión es la resolución, donde la resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos y es definida como la distancia que existe entre el centro del pico dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos. Esta expresión se calcula de la siguiente manera:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2 (W_2 + W_1)}$$

Tanto la selectividad (α), como la eficiencia (N) y el factor de capacidad (k) están estrechamente ligados a la resolución, ocupando la siguiente fórmula:

$$R = \left(\frac{1}{4}\right) (N)^{1/2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k'}{1 + k'}\right)$$

Eficiencia Selectividad Factor de capacidad

Por lo tanto, para optimizar o poner a punto una separación se puede actuar sobre cualquiera de estos factores. (4, 20)

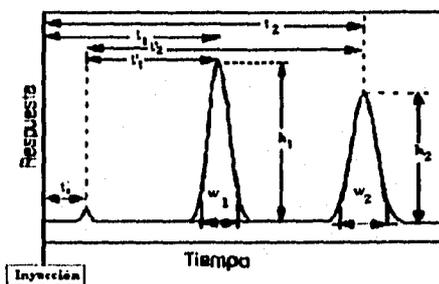


Figura 2. Cromatograma tipo

Eficiencia (N).

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos (N), estos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma. (18)

N es el valor útil para medir la habilidad relativa de la columna para proporcionar picos angostos, es decir, con valores pequeños de ancho de pico y así mejorar la resolución. Bidlingmeyer y Warren analizaron las modalidades empleadas para la determinación de N concluyendo que tanto el cálculo basado en la medida del ancho del pico en la base, como la tomada a media altura de pico son poco exactas cuando el gráfico se aleja de la normalidad (ver figura 3 y tabla 1). Sin embargo, como estos autores reconocen, el método debe elegirse de acuerdo a la necesidad del analista. (20)

$$N = a \left(\frac{t_r}{W} \right)$$

Donde

t_r = tiempo de retención

W = ancho del pico

a = ecuación anterior

Tabla 1. Métodos para el cálculo de N.

W	a	método	exactitud
W_1	4	inflexión	baja
W_2	5.54	media onda	baja
W_3	9	3	—
W_4	16	4	media
W_5	25	5	alta
W_{tan}	16	tangente	baja

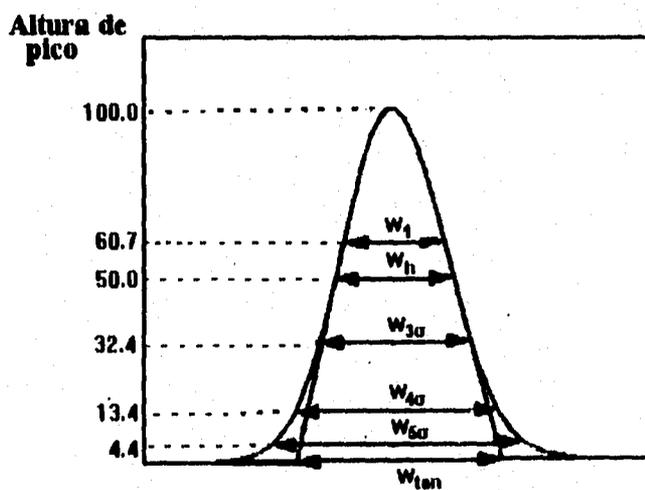


Figura 3. Anchos de pico empleados para el cálculo de platos teóricos (N)

Selectividad (α).

Mide la capacidad de una columna para separar dos componentes debido a sus diferentes afinidades y por tanto a su diferente retención. La separación de los componentes requiere que tengan diferentes coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. El α de los picos 1 y 2 (ver figura 2) se calcula como:

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Factor de capacidad (k').

Es el coeficiente de reparto común a todos los procedimientos de distribución; por lo que es una constante termodinámica y mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor nos indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en una columna.

El factor de capacidad (k') para un componente dado, está definido por la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{\text{concentración de la muestra en la fase estacionaria}}{\text{concentración de la muestra en la fase móvil.}}$$

Puede demostrarse que k' es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0}$$

ó

$$k' = (V_n - V_0) / V_0$$

El valor de k' puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil. (20)

6. Componentes de un cromatógrafo de líquidos y el proceso cromatográfico.

Los componentes esenciales encontrados en un instrumento de CLAR incluye: bomba, inyector, reservorio, columna, detector y registrador (Ver figura 4).

La columna está considerada como el corazón del sistema, la cual se encuentra rellena de fase estacionaria que está compuesta por partículas, y para la cual es necesario una bomba de alta presión para transportar la fase móvil a través de la columna. El proceso cromatográfico empieza por la inyección del soluto a través del inyector. La separación ocurre al bombear la fase móvil y el soluto a través de la columna, cada compuesto que chuye de la columna es detectado ya sea por un detector universal o selectivo, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir.

La respuesta del detector a la presencia de cada componente es manifestada en una carta graficadora como un cromatograma por medio de un integrador. Para coleccionar, guardar y analizar los datos cromatográficos, están siendo ocupados computadoras para procesamiento de datos. La señal producida por el detector será manifestada en forma de picos (Gaussianos) representando la concentración de los componentes eluidos. La calidad de la separación cromatográfica puede ser determinada matemáticamente obteniendo los valores de eficiencia, selectividad y resolución de los resultados cromatográficos. (20)

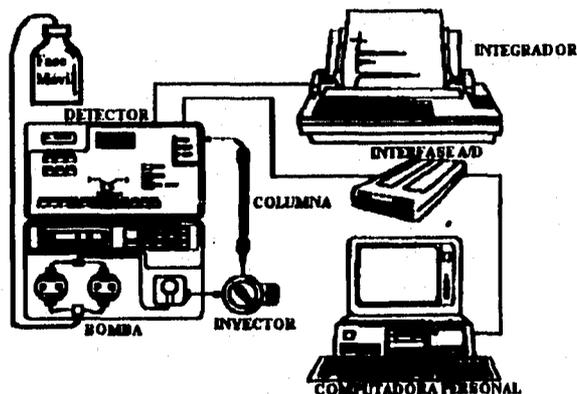


Figura 4. Componentes de un cromatógrafo de líquidos.

a) Contenedor de fase móvil.

Su función será contener los disolventes que se emplean como fase móvil, la cual ayuda a la separación de los componentes de una mezcla en una columna. Algunos sistemas cromatográficos solo disponen de una cavidad de reservorio, pero en la actualidad, los equipos suelen disponer de dos reservorios e incluso de tres, capaces de suministrar los distintos solventes en ellos contenidos de forma variable y pasar al sistema de bombeo. Los disolventes empleados para cromatografía de líquidos deben tener las siguientes características:

- * Ser puro sin contaminantes. (Grado cromatográfico).
- * No reaccionar con el empaque.
- * Ser compatible con el detector.
- * Disolver la muestra.
- * Tener baja viscosidad.
- * Estar comercialmente disponible a bajo precio.
- * Si es mezcla, ser compatible entre ellos. (18, 20)

b) Sistema de bombeo.

Las bombas para cromatografía de líquidos, impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde ahí hacia la columna. Su flujo de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida.

Básicamente existen dos tipos de bomba: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del disolvente. (20)

c) Sistema de inyección.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Actualmente la totalidad de los inyectores de cromatografía de líquidos son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar, las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente. (20)

d) Columna.

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que en esta es donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer. (8)

Existen dos tipos de columnas:

- i) Columnas analíticas.
- ii) Columnas preparativas.

i) Columnas analíticas.

Normalmente son tubos cilíndricos de un material inerte, capaz de resistir altas presiones. El material más utilizado es el acero inoxidable, también se emplea el tubo de vidrio, pero las conexiones metal-vidrio a altas presiones no sellan herméticamente. El diámetro interno de las columnas varía entre 1 y 6 mm, en la mayoría de los casos es de 3 a 4 mm. La longitud varía de 7 a 50 cm, en algunos casos, sobre todo en el método de permeación en gel suelen ser de mayor longitud. Este tipo de columnas se utilizan en los métodos analíticos. Generalmente las columnas de mayor eficacia son de diámetro pequeño (3mm) y efectúan análisis muy rápidos. (9)

ii) Columnas preparativas.

Empleadas para separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente para su uso posterior, éstas columnas pueden tener más de 1 cm de diámetro interno. La separación se realiza en forma más lenta con una eficiencia menor que las columnas de diámetro menor. (9)

e) Detector

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores deben reunir ciertas características, entre ellas.

- * Tener amplio rango dinámico de respuesta.
- * Poseer una respuesta lineal.
- * No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- * Responder a los solutos.
- * Tener la sensibilidad apropiada.

* Poseer una buena relación señal/ruido.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura, por ejemplo, detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV, que produce una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia.

i) Detectores generales

Detector de índice de Refracción

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal (ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente) y no destructivo. Como contrapartida es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura.

ii) Detectores selectivos.

Detector UV

Es el detector más empleado en HPLC. Pusee buena sensibilidad y rango lineal y permite detectar analitos en el orden de nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 1 a 12 microlitros. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y temperatura. El detector UV opera en un rango de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/visible. La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la Ley de Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot C$, donde A es la absorbancia, ϵ es la absorptividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda medido en cm y C es la concentración de analito en la muestra expresada en moles/l.

iii) Detector de fluorescencia

El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas.

iii) Detector electroquímico

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector UV y altamente selectivo. La selectividad se debe, no solo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

f) Registrador de señales.

La salida de información de un detector de cromatografía líquida es en forma de una señal eléctrica.

Esta señal puede ser manejada de diversas maneras. La manera más simple de disponer de la información es un cromatograma en papel, que se obtiene a partir de las separaciones en la columna bajo condiciones en las cuales los coeficientes de distribución de los diversos componentes de la muestra son constantes, en estas condiciones, los solutos migran a lo largo de una columna en forma de bandas simétricas, con una distribución normal de concentraciones, que al salir de la columna son detectadas y representadas gráficamente por picos gaussianos. De los cuales se citan los siguientes: registrador gráfico, integrador y computadora. (10)(20)

B. DESCRIPCIÓN DE LOS FARMACOS, PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

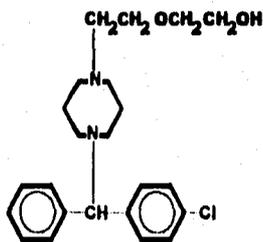
1. Clorhidrato de hidroxicina. (12)

Nombre:

Clorhidrato de hidroxicina es designado como etanol, 2-[2-[4-(4-clorofenil)fenilmetil]-1-piperazinil]etoxil-dihidrocloreto. Los nombres comerciales son atarax, cartrax, enarax, marax y visiaril.

Propiedades físicoquímicas:

Fórmula desarrollada:



Peso molecular: 447.83 g/mol

Fórmula condensada: $(\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{HCl}$

El clorhidrato de hidroxicina es un polvo cristalino blanco, inodoro, solubilidad 700 mg/ml de agua; 60 mg/ml de cloroformo; 2 mg/ml de acetona y menos de 0.1 mg/ml de éter. Su punto de ebullición es de 196 A 204° C, con descomposición. Constante de ionización, $\text{pka} = 2.0$. Se extrae con solventes orgánicos con soluciones acuosas alcalinas.

Propiedades farmacológicas:

Es un agente ansiolítico, se utiliza en el tratamiento de los estados de malestar emocional leves o moderados, en tensiones nerviosas y cuando se necesita un relajante muscular. También es utilizado en el tratamiento de asma, útil en el tratamiento de la neurosis y en personas normales que reaccionan adversamente al estrés ambiental.

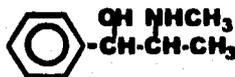
2. Sulfato de efedrina. (13)

Nombre

Sulfato de efedrina.

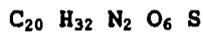
Propiedades fisicoquímicas:

Fórmula desarrollada:



Peso molecular: 428 g/mol.

Fórmula condensada:



Cristales o polvo cristalino incoloro o blanco, con oscurecimiento a la luz. Es soluble 1 g en 2 ml de agua y 1 g en 60 ml de etanol. Tiene un punto de ebullición 258° C, con descomposición. Puede ser extraído por disolventes orgánicos con soluciones alcalinas acuosas, es volátil y puede ser separada por destilación con soluciones alcalinas.

Propiedades farmacológicas:

Es un agente adrenérgico, utilizado en patología asmática (broncodilatador), para mantenimiento de la presión arterial en la anestesia raquídea, control de la hipotensión postural, descongestión nasal. (11)

C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Una vez desarrollado un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, al igual que toda técnica analítica, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables. En un método de validación deben considerarse los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y estabilidad de la muestra para un método de control de calidad.

1. DEFINICION.

La validación de métodos analíticos se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicaciones analíticas deseadas. (15)

2. PROCEDIMIENTO DE VALIDACION, PARAMETROS ESTADISTICOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION.

a) Especificidad.

Establece en qué grado la medición obtenida se debe exclusivamente a la sustancia a evaluar y no a otros componentes que puedan estar presentes en el material a ser analizado.

Para determinar este parámetro, deberán realizarse las siguientes pruebas con el método propuesto:

- Analizar el placebo del producto.
- Identificar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s), y si procede de los excipientes y/o de otras sustancias presentes. (15)

Criterio:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

b) Linealidad.

Es la medida del grado en el cual la curva de calibración del método se aproxima a la linealidad, para asegurar que el resultado obtenido es proporcional a la concentración del principio activo a evaluar, dentro de un intervalo de concentraciones definido. (14, 15)

b.1.) Linealidad del sistema.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida), utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución, normalmente entre el 50% y 150% del valor normal ensayado. (14, 15, 16)

Criterio:

$CV \leq 1.5\%$ para un método cromatográfico.

$r \geq 0.99$

$r^2 \geq 0.98$

b.2.) Linealidad del método.

Se determina a partir de placebo adicionados de cuando menos 5 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado. Normalmente entre el 50% y el 150% del valor normal ensayado.

Criterio:

El método analítico se designará lineal, cuando la curva encontrada en el método, demuestre ser una línea recta a través de los siguientes parámetros:

$m = 1$

$b = 0$

$r \geq 0.99$

$r^2 \geq 0.98$

Donde:

$t \text{ calc } m < t \text{ tab } (n-1, 0.95)$

$t \text{ calc } b < t \text{ tab } (n-1, 0.95) \quad (14, 15, 16)$

El método de cuantificación cromatográfica debe tener un promedio de recobro de 98 al 102% y un $CV \leq 2\%$

c) Exactitud.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras, a las que se le ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. Se determina de cuando menos 6 placebo cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés, para obtener la concentración del 100%. Utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio:

Para un método cromatográfico el promedio de recobro debe oscilar entre el 98% y 102% y tener un coeficiente de variación menor o igual al 2%. (15)

d) Precisión (Reproducibilidad).

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos

de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación. (14, 15)

d.1.) Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas por un mismo analista, utilizando el mismo equipo y métodos. Se determina utilizando 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto y haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. (15)

Criterio:

C.V. < 2 % para un método cromatográfico y un porcentaje de recobro del 98 al 102%.

d.2.) Reproducibilidad.

Es la precisión de un método de análisis expresado como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas, en distintos días y/o laboratorios, utilizando los mismos y/o diferentes equipos. Debe trabajarse de manera independiente y con una muestra homogénea del producto. Se determina con una muestra del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado. (14, 15, 16)

Criterio:

C.V. \leq 2 % para un método cromatográfico

Donde:

$F_{cale} < F_{tab}(0.95)$

e) Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad físico-química y la concentración de la sustancia de interés. Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. (15)

Criterio:

media de la muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda el siguiente porcentaje para un método cromatográfico del +/- 2%.

III. Planteamiento del problema.

Dentro de las enfermedades respiratorias se encuentra el asma, el cual suele agudizarse tanto en la temporada invernal como en las ciudades en donde es alta la contaminación, el padecimiento asmático se manifiesta a través de ataques de tos, espasmos y secreción, mismos que se originan por procesos inflamatorios de las vías respiratorias, éstos se acentúan ante diversos factores, como sustancias químicas, ejercicios físicos, cambios de temperatura (períodos invernales), fármacos y crisis emocionales. La padecen personas de todas las edades en el mundo, con una incidencia que varía del 5 al 10% de la población general y dependiendo, en gran parte, de la situación geográfica y de la concentración urbana donde vivan. En cuanto a la edad, existe un predominio de aproximadamente un 70% en niños y el otro porcentaje se presenta en adolescentes y adultos.

Para evitar este proceso, en los tratamientos asmáticos el médico prescribe entre otros medicamentos la teofilina acompañada de sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina, cuyas acciones farmacológicas son el estímulo de la respiración, relajamiento de la musculatura lisa, incluyendo los bronquios y vasos sanguíneos. (17)

Estos activos se encuentran en formulaciones farmacéuticas que deben de estar contenidos en una concentración específica a fin de que puedan tener su acción farmacológica efectiva, y para poder asegurar esta concentración en las presentaciones farmacéuticas, se debe de contar con métodos analíticos sencillos, que nos permitan de manera precisa y exacta cuantificarlos.

En el laboratorio donde se realizó la parte experimental se produce un jarabe que contiene sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina, para el cual no se cuenta con un método analítico, por lo que se tiene que enviar el producto a analizar en un laboratorio de tercera lo cual es costoso y tardado, es por esto que se creyó conveniente desarrollar y validar un método analítico tomando en cuenta que las propiedades fisicoquímicas son las siguientes: son compuestos con peso molecular intermedio, esto es mayor de 300 y menor de 2000 g/mol, tienen tamaño molecular semejante, son poco polares, tienen la capacidad de poder suprimir la ionización o ionizarlos, pueden absorber en la región ultravioleta y difieren en su cadena hidrocarbonada con tales características se puede ocupar la cromatografía de líquidos de alta resolución por ser una herramienta que sirve mucho en el análisis de estos productos con multicomponentes, con un mínimo de preparación de muestra, por ser rápido, tener bajo costo de análisis y buena reproducibilidad garantizando este método mediante una validación.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, para la cuantificación de sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina en un jarabe, que sea utilizado como método de rutina para control de calidad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Seleccionar experimentalmente, la fase móvil y la fase estacionaria óptimas para la separación del sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina en el jarabe.

Seleccionar las condiciones analíticas y operativas adecuadas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Validar el método analítico desarrollado, evaluando estadísticamente al sistema y método, cubriendo los siguientes parámetros: especificidad, precisión, exactitud, linealidad y estabilidad de la muestra.

V. HIPOTESIS

Si se toman en cuenta las propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de hidroxicina y del sulfato de efedrina contenidos en un jarabe, entonces se podrá cuantificar la cantidad presente de los mismos con un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, de una manera exacta, precisa, con costo y tiempo de análisis bajo.

VI. MATERIAL Y METODO.

A) Material, Equipo, Reactivos y Preparación de Soluciones.

A.1.) MATERIAL

Matraces volumétrico de baja transmitancia Kimax.

Pipetas volumétricas y graduadas.

Membranas hidrofílicas de 0.45 micras.

Papel filtro del número 4.

Embudos de filtración.

A.2.) EQUIPO

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Beckman:

- Sistema de distribución de disolventes Beckman modelo 114m.
- Inyector manual Beckman.
- Detector de longitud de onda variable, Beckman, modelo 163.
- Integrador Beckman modelo 427.

Baño ultrasónico Mettler.

Bomba de vacío waters.

Columna cromatográfica ODS, 15 cm. X 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 micras, SpherisOrb.

A.3.) REACTIVOS

Fosfato monobásico de potasio grado reactivo Merck.

Hidróxido de potasio grado reactivo Merck.

Metanol grado HPLC Merck.

Acetonitrilo grado HPLC Merck.

Sulfato de efedrina estándar secundario.

Clorhidrato de hidroxycina estándar secundario.

Hidróxido de amonio concentrado Merck.

Agua destilada.

A.4.) PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución buffer de fosfatos

Se pesaron 680 mg de fosfato monobásico de potasio y transferieron a un matraz volumétrico de 500 ml, se disolvieron y se aforaron con agua. Se ajustó el pH de la solución a 5.8 +/- 0.1 con una solución de hidróxido de potasio 0.5 N.

Solución de metanol al 50%

Se preparó una solución 1:1 con metanol HPLC y agua.

Preparación de la fase móvil

Se midió volumétricamente: 20 ml de solución buffer de fosfatos pH 5.8 Y 15 ml de acetonitrilo HPLC. Se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml. Se aforó con metanol HPLC y se mezcló con barra magnética.

Se filtró por membrana hidrofílica de 0.45 micras y se colocó en un baño ultrasónico por 5 minutos.

B) METODO

PREPARACION DEL ESTANDAR

Se pesaron 125 mg de sulfato de efedrina estándar secundario y 50 mg de clorhidrato de hidroxicina estándar secundario, en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver con 40 ml de agua. Llevar a un baño ultrasónico por 3 minutos. Llevar al aforo con agua y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml. Agregar 1 ml de hidróxido de amonio concentrado. Colocar en un baño ultrasónico por 15 minutos. Aforar con metanol HPLC y mezclar. Filtrar por papel filtro del No.4. Tomar una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml. Aforar con la solución de metanol al 50%. Filtrar por membrana hidrofílica de 0.45 micras e inyectar al sistema.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Homogenizar el contenido de por lo menos 3 frascos de jarabe con barra magnética. Tomar una alícuota de 5 ml de jarabe y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, dejar drenar la pipeta por 5 minutos. Adicionar 1 ml de hidróxido de amonio concentrado. Mezclar y colocar en un baño ultrasónico por 15 minutos. Aforar con metanol HPLC y mezclar. Filtrar por papel filtro del No.4. Tomar una alícuota de 10 ml y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml. Aforar con la solución de metanol al 50% y mezclar. Filtrar por membrana hidrofílica de 0.45 micras e inyectar al sistema.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- * Longitud de onda: 220 nm
 - * Velocidad de flujo: 1.2 ml/min.
 - * Volumen de inyección: 40 microlitros.
 - * Columna cromatográfica: SpherisOrb ODS de 15 cm. X 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 micras.
 - * Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Beckman o equivalente.
 - * Tiempos de retención aproximados
- Clorhidrato de hidroxicina: 4.60 minutos
Sulfato de efedrina: 6.99 minutos

VII. RESULTADOS

Se obtuvo la separación cromatográfica del sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina en un jarabe (ver figura 5)

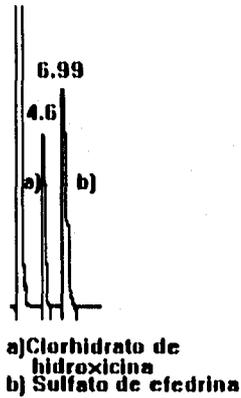


Figura 5. Cromatograma para sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

Condiciones cromatográficas:

Columna: SpherisOrb ODS (5 micras).

Fase móvil: Acetonitrilo-metanol-buffer de fosfatos 0.01 M pH 5.8 (15:64:21).

Flujo: 1.2 ml/min.

Detector: UV 220 nm.

Tiempos de retención:

Clorhidrato de hidroxicina 4.6min

Sulfato de efedrina 6.99 minutos.

1. CLORHIDRATO DE HIDROXICINA.

a) Especificidad

El método está exento de interferencias en los principios activos de interés (ver figura 6).

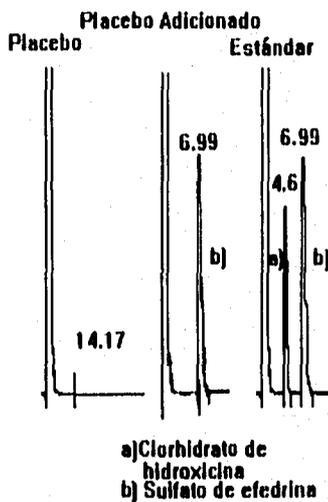


Figura 6. Especificidad para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

b) Linealidad y precisión del sistema para clorhidrato de hidroxicina.

Los resultados y los parámetros estadísticos evaluados se presentan en la tabla 2 y en la gráfica 1 para clorhidrato de hidroxicina.

Parámetros estadísticos de la linealidad del sistema para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

Intercepto (b): -433.2564

Pendiente (m): 13136.8154

Coefficiente de relación (r): 0.9999

Coefficiente de determinación (r^2): 0.9998

Error estándar de regresión (syx): 1062.1591

Pendiente relativa (pr): 1.0020

Prueba de hipótesis para el intercepto:

t exp. = -0.5312 t tablas (16, 0.95) = 2.12

Intervalo de confianza para el intercepto:

-433.2564 +/- 1729.2470 -2162.50 a 1295

Parámetros estadísticos de la precisión del sistema para clorhidrato de hidroxicina.

No. de réplicas (n) = 6

Media (\bar{x}) = 262766.833

Desviación estándar (DE) = 1238.182

Coefficiente de variación (CV) = 0.47%

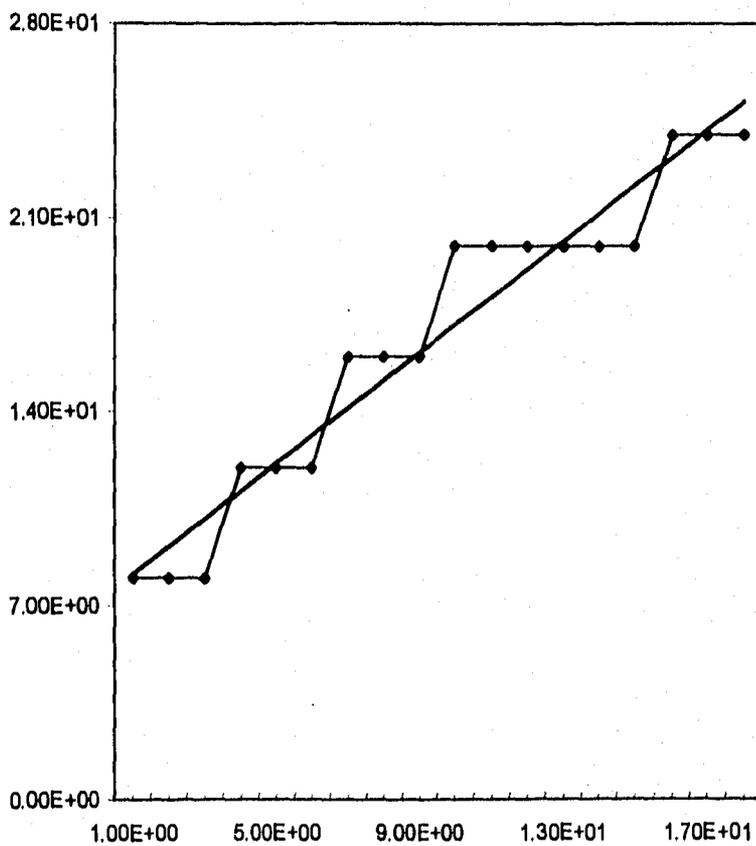
TABLA 2. Resultados de la linealidad y precisión del sistema para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

CONCENTRACION mg/ml	RESPUESTA AREAS
8	104812
8	103160
8	105932
12	157429
12	157213
12	156312
16	209877
16	209638
16	209534
20	261117
20	263697
20	263732
20	263712
20	260931
20	263412
24	314612
24	313214
24	314918

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA
EN UN JARABE

X: mcg/ml Y: areas

GRAFICA 1



c) Linealidad del método para el clorhidrato de hidroxicina

Los resultados y parámetros estadísticos evaluados se presentan en la tabla 3 y la gráfica 2.

d) Exactitud y repetibilidad al 100% para clorhidrato de hidroxicina.

Los resultados del tratamiento estadístico están incluidos en la tabla 3.

Parámetros estadísticos de la linealidad del método para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

$$(b) = -0.0010$$

$$(m) = 0.9978$$

$$(r) = 0.9996$$

$$(r^2) = 0.9991$$

$$(s_{yx}) = 0.0156$$

Prueba de hipótesis para intercepto:

$$t_{exp} = -0.0536$$

$$t_{teórica (16, 0.95)} = 2.12$$

Intervalo de confianza para intercepto:

$$-0.0010 \quad +/- \quad 0.038270$$

$$-0.0392 \quad A \quad 0.0373$$

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$t_{exp} = -0.2890$$

$$t_{teórica (16, 0.95)} = 2.12$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$0.99780 \quad +/- \quad 0.01610$$

$$0.98170 \quad A \quad 1.01391$$

Parámetros estadísticos para la exactitud y repetibilidad al 100% de clorhidrato de hidroxiclina.

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 99.81\%$$

$$DE = 0.72$$

$$CV = 0.72\%$$

Prueba de hipótesis para la media:

$$t_{\text{exp}} = -1.6500$$

$$t_{\text{teórica}}(17, 0.95) = 2.1100$$

Intervalo de confianza para la media:

99.74	+/-	0.3371
99.40	A	100.07%

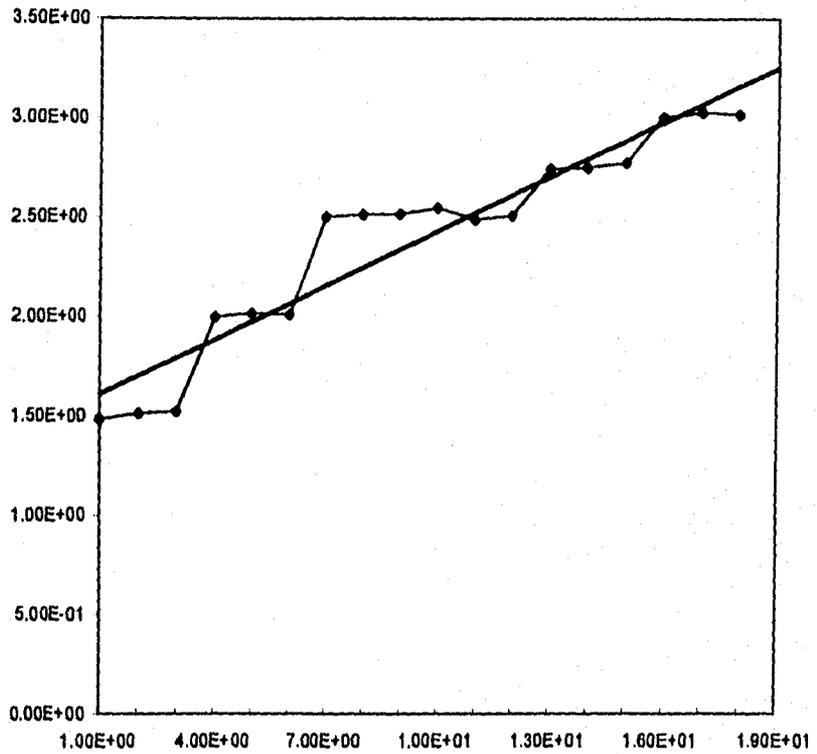
Tabla 3. Resultados para la linealidad del método y exactitud al 100% de clorhidrato de hidroxicina.

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECUPERADO
1.512	1.484	98.15
1.512	1.513	100.07
1.512	1.523	100.73
2.016	2.002	99.31
2.016	2.019	100.15
2.016	2.014	99.90
2.520	2.503	99.33
2.520	2.517	99.88
2.520	2.519	99.96
2.520	2.550	101.19
2.520	2.491	98.85
2.520	2.511	99.64
2.772	2.748	99.13
2.772	2.755	99.39
2.772	2.778	100.22
3.024	3.004	99.34
3.024	3.031	100.23
3.024	3.018	99.80

**LINEALIDAD DEL METODO PARA CLORHIDRATO DE HIDROXICINA
EN UN JARABE.**

X: mg ADICIONADOS Y: mg RECUPERADOS

GRAFICA 2



e) Reproducibilidad del método.

Los resultados junto con el análisis de varianza, se presentan en la tabla 4 y 5.

Tabla 4. Reproducibilidad del método para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe

DIA	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)
1	100.23	100.89
1	100.21	100.39
1	100.22	100.03
2	100.81	100.96
2	100.97	100.48
2	100.50	100.96

Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del clorhidrato de hidroxicina.

(n) = 12
(\bar{X}) = 100.56%
(DE) = 0.33
(CV) = 0.33%

**Tabla 5. Análisis de varianza (ANADEVA)
para clorhidrato de hidroxicina.**

Fuente de variación	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	M.C.	F	F (0.95)
DIA	0.7624	2	0.3812	1.2664	4.41
ANALISTA	0.4826	1	0.4826	1.6033	18.5
INTERACCION	0.301	1	0.301	0.6651	5.32
ERROR	3.62	8	0.4525		
TOTAL	1.3249	11			

f) Estabilidad de la muestra

Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Estabilidad de la muestra para clorhidrato de hidroxicina en un jarabe.

Muestra inicial(%)	Muestra en refrigeración por 24 hrs. (%)
99.83	99.33
100.22	99.80
100.34	99.88

Intervalo de confianza:

-0.21 +/- 1.4946 -1.7046 a 1.2846

Factor Y:

100.91%

2. SULFATO DE EFEDRINA.

a) Especificidad.

El método está exento de interferencias. Ver figura 7

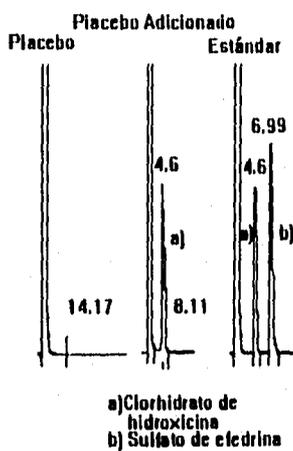


Figura 7. Cromatogramas de placebo y placebo adicionado para sulfato de efedrina y clorhidrato de hidroxicina.

b) Linealidad y precisión del sistema para sulfato de efedrina.

Los resultados y los parámetros estadísticos evaluados se presentan en la tabla 7 y la gráfica 3 para sulfato de efedrina.

Parámetros estadísticos de la linealidad del sistema para sulfato de efedrina.

(b): -576.1026
(m): 4565.1118
(r): 0.9998
(r^2): 0.9995
(syx): 1446.9331
(pr): 1.0030

Prueba de hipótesis para el intercepto:

$t_{exp} = -0.5185$ $t_{tablas} (16, 0.95) = 2.12$

Intervalo de confianza para el intercepto:

-576.1026 +/- 2355.6780 -2931.78 a 1779

Parámetros estadísticos de la precisión del sistema para sulfato de efedrina.

n = 6
 \bar{x} = 228157
DE= 2180
CV= 0.96%

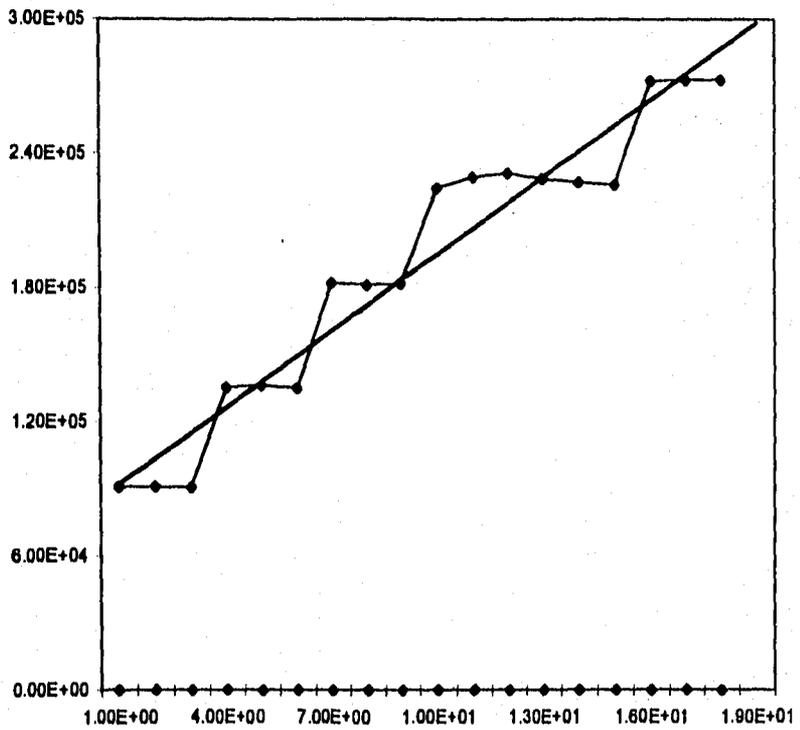
Tabla 7. Resultados de la linealidad y precisión del sistema para sulfato de efedrina en un jarabe.

CONCENTRACION mg/ml	RESPUESTA AREAS
20	91124
20	91031
20	90932
30	135457
30	136501
30	135272
40	182314
40	181435
40	181938
50	224865
50	229736
50	231488
50	228951
50	227477
50	226427
60	272632
60	273000
60	272884

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA SULFATO DE EFEDRINA.

X: mcg/ml Y: AREAS

GRAFICA 3



c) Linealidad del método para sulfato de efedrina.

Los resultados y parámetros estadísticos evaluados se presentan en la tabla 8 y la gráfica 4.

d) Exactitud y repetibilidad del método al 100% para sulfato de efedrina.

Los resultados del tratamiento estadístico están incluidos en la tabla 8.

Parámetros estadísticos empleados en la linealidad del método analítico para sulfato de efedrina.

$$(b) = 0.0651$$

$$(n) = 0.9868$$

$$(r) = 0.9995$$

$$(r^2) = 0.9990$$

$$(s_{yx}) = 0.0407$$

Prueba de hipótesis para intercepto:

$$t_{exp} = 1.3846$$

$$t_{teórica (16, 0.95)} = 2.12$$

Intervalo de confianza para intercepto:

$$-0.0651 \quad +/- \quad 0.099665$$

$$-0.0346 \quad A \quad 0.1648$$

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$t_{exp} = -1.6548$$

$$t_{teórica (16, 0.95)} = 2.12$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$0.98682 \quad +/- \quad 0.01689$$

$$0.96992 \quad A \quad 1.0371$$

Parámetros estadísticos empleados para la exactitud y repetibilidad al 100% del sulfato de efedrina.

$$(n) = 6$$

$$(\bar{x}) = 99.49\%$$

$$(DE) = 0.73$$

$$(CV) = 0.74\%$$

Prueba de hipótesis para la media:

$$t_{exp} = -1.0061$$

$$t_{teórica}(17, 0.95) = 2.1100$$

Intervalo de confianza para la media:

99.84	+/-	0.3380
99.50	A	100.18%

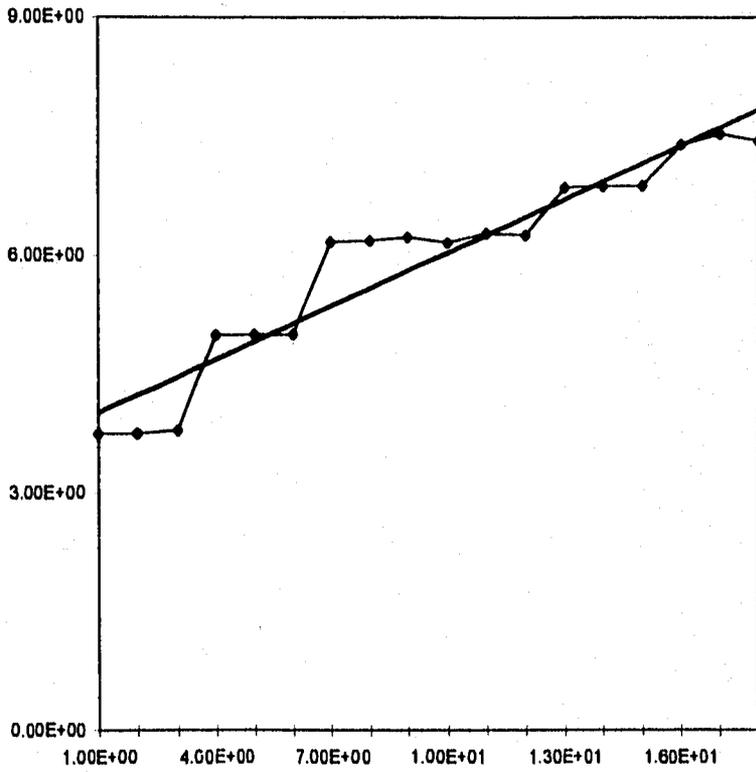
Tabla 8. Resultados de la linealidad del método y exactitud al 100% para sulfato de efedrina en un jarabe.

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado
3.754	3.757	100.08
3.754	3.759	100.13
3.754	3.801	101.25
5.005	5.003	99.96
5.005	5.008	100.06
5.005	5.012	100.14
6.257	6.178	98.74
6.257	6.196	99.03
6.257	6.241	99.74
6.257	6.173	98.66
6.257	6.292	100.56
6.257	6.271	100.22
6.882	6.873	99.87
6.882	6.886	100.06
6.882	6.891	100.13
7.508	7.411	98.71
7.508	7.542	100.45
7.508	7.456	99.31

LINEALIDAD DEL METODO PARA SULFATO DE EFEDRINA.

X: mg ADICIONADOS Y: mg
RECUPERADOS

GRAFICA 4



e)Reproducibilidad del método.

Los resultados junto con el análisis de varianza, se presentan en la tabla 9 y 10.

Tabla 9

**Reproducibilidad del método
para sulfato de efedrina en un jarabe**

DIA	ANALISTA 1 (%)	ANALISTA 2 (%)
1	101.82	102.77
1	101.45	102.57
1	101.13	102.67
2	101.64	101.82
2	101.73	101.99
2	101.02	101.18

Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del sulfato de efedrina.

$$(n) = 12$$

$$(\bar{x}) = 101.65\%$$

$$(DE) = 0.44$$

$$(CV) = 0.44\%$$

Tabla 10. Análisis de varianza (ANADEVA)

para sulfato de efedrina.

Fuente de variación	S.C.	g.l.	M.C.	F (cal)	F (0.95)
DIA	0.088	2	0.044	0.517	4.41
ANALISTA	0.407	1	0.407	4.788	18.5
INTERACCION	0.085	1	0.085	0.380	5.32
ERROR	1.789	8	0.224		
TOTAL	2.369291	11			

f) Estabilidad de la muestra.

Los resultados se muestran en la tabla 11

Tabla 11. Estabilidad de la muestra.

Muestra inicial(%)	Muestra en refrigeración por 24 hrs.(%)
101.36	100.42
101.12	100.54
101.24	10.86

Intervalo de confianza:

-1.2 +/- 1.5136 -2.7136 a 0.3136

Factor Y:

99.14%

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.

Se desarrolló un método para cuantificar clorhidrato de hidroxicina y sulfato de efedrina por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Para la validación, los cálculos fueron realizados por medio de una microcomputadora, con un sencillo programa de Lotus 123.

El método analítico se validó evaluando los siguientes parámetros: especificidad del método, linealidad del sistema, linealidad del método, reproducibilidad, exactitud y estabilidad de la muestra.

Con respecto a la especificidad para un método de control de calidad se obtuvo que el método es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencias de otras sustancias presentes (ver figuras 6 y 7).

En la evaluación de la linealidad y precisión del sistema se obtuvieron los siguientes resultados:

Principios activos	C.V.	r	r ²	Pendiente relativa
Clorhidrato de hidroxicina	0.47	0.9999	0.9998	1.0020
Sulfato de efedrina	0.96	0.9998	0.9995	1.0030

El sistema es lineal.

Para la evaluación de la linealidad del método se obtuvo:

Principios activos	m	b	r	r ²	Recobro (%)	C.V. (%)
Clorhidrato de hidroxicina	0.9978	-0.001	0.9996	0.9991	99.81	0.72
Sulfato de efedrina	1.9868	0.0651	0.9995	0.999	99.49	0.74

Estos resultados demuestran que se tiene una pendiente cercana a uno y una ordenada al origen cercana a cero, con un coeficiente de determinación y de correlación mayor de 0.99 y 0.98 respectivamente, por lo que el método es lineal en el rango de concentración de 8 a 24 mcg/ml para el clorhidrato de hidroxicina, y de 20 a 60 mcg/ml para el sulfato de efedrina.

En el caso de la exactitud y repetibilidad al 100% se obtuvo:

Principios activos	C.V.	% Recuperado
Clorhidrato de hidroxicina	0.72	98.40 a 100.07
Sulfato de efedrina	0.74	99.50 a 100.18

Donde el coeficiente de variación es menor al 2% y el porcentaje recuperado cae dentro del 98 al 102%, por lo que el método es exacto y repetible.

Para la estabilidad de la muestra se obtuvo lo siguiente:

Principios activos	Intervalo de confianza	Efecto (%)
Clorhidrato de hidroxicina	-1.7046 a 1.2846	100.91
Sulfato de efedrina	-2.7136 a 0.3136	99.14

Por lo que los resultados cumplieron con los criterios, donde para el intervalo de confianza se concluye el valor de cero y el efecto para un método cromatográfico entró en el intervalo de 98 a 102%, por lo que la muestra es estable por 24 horas.

Para el caso de la Precisión (Reproducibilidad) se obtuvo:

Principio activo	Coefficiente de variación
Clorhidrato de hidroxicina	0.33
Sulfato de efedrina	0.44

ANDEVA para Clorhidrato de hidroxicina.

Fuente de variación	F calculada	F tablas (0.95)
Día	1.2664	4.41
Analista	1.6033	18.5
Interacción	0.6651	5.32

ANAVEVA para Sulfato de efedrina.

Fuente de variación	F calculada	F tablas (0.95)
Día	0.517	4.41
Analista	4.78	18.5
Interacción	0.38	5.32

Se cumple con el criterio utilizado, donde el coeficiente de variación debe ser menor al 2% y $F_{cal} < F_{tab}$, por lo que el método analítico es reproducible.

IX. Conclusión.

Al término del presente trabajo, se logró cumplir con los objetivos descritos originalmente. La hipótesis planteada se confirmó como verdadera. Por lo tanto se concluye que el método analítico desarrollado y validado para la cuantificación simultánea de clorhidrato de hidroxicina y sulfato de efedrina en un jarabe, cumple en forma satisfactoria con todos los parámetros establecidos, demostrando en los resultados de la validación que el método es lineal, preciso, exacto, específico y estable por 24 horas en refrigeración; por lo que puede ser utilizado como un método de control de calidad, asegurando que los resultados obtenidos son confiables.

X. Sugerencias.

Se sugiere que se realicen las siguientes pruebas para la validación: límite de detección, límite de cuantificación, pruebas de estabilidad y tolerancia del sistema; a fin de comprobar si el método podría servir también como indicativo de estabilidad.

ANEXO.

A. CALCULOS ESTADISTICOS.

A.1. LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION.

DESVIACION ESTANDAR:

$$DE = \left[\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Donde:

(DE) = Desviación Estándar.

(x) = Cada una de las lecturas individuales.

(\bar{x}) = Promedio de las lecturas.

(n) = Número de las lecturas.

$$LD = \frac{3DE \cdot c}{\bar{x}}$$

$$LQ = \frac{10DE \cdot c}{\bar{x}}$$

Donde:

(DE) = Desviación estándar.

(c) = Concentración.

(LD) = Limite de detección.

(LQ) = Limite de cuantificación.

A.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

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

$$\sum x = n(x_1 + x_2 + \dots + x_i)$$

$$\sum y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{i1} + y_{i2} + \dots + y_{in}$$

$$\sum x^2 = n \left(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_i^2 \right)$$

$$\sum y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{i1}^2 + y_{i2}^2 + \dots + y_{in}^2$$

$$\sum xy = x_1(y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2(y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_i(y_{i1} + y_{i2} + \dots + y_{in})$$

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

$$r^2 = (r)^2$$

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación.

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

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

$$F'_{11} = \frac{y_{11}}{x_1} \qquad F'_{12} = \frac{y_{12}}{x_1} \qquad F'_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

$$F'_{i1} = \frac{y_{i1}}{x_i} \qquad F'_{i2} = \frac{y_{i2}}{x_i} \qquad F'_{in} = \frac{y_{in}}{x_i}$$

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

$$\sum F = F'_{11} + F'_{12} + F'_{1n} + \dots + F'_{i1} + F'_{i2} + F'_{in}$$

$$\sum F^2 = F'^2_{11} + F'^2_{12} + F'^2_{1n} + \dots + F'^2_{i1} + F'^2_{i2} + F'^2_{in}$$

$$\bar{F} = \frac{\sum F}{N}$$

N = Número de puntos de la linealidad del sistema.

Cálculos finales para el coeficiente de variación.

$$DE = \left[\frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \cdot 100$$

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

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

Criterio:

$$CV < \hat{\sigma} = 1.5\%$$

$$r > \hat{\sigma} = 0.99$$

$$r^2 > \hat{\sigma} = 0.98$$

$$m \geq 1.0$$

$$b \geq 0.0$$

A.3. PRECISION DEL SISTEMA

Cálculos preliminares:

$$\sum y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\sum y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$y = \frac{\sum y}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

Cálculos finales para el coeficiente de variación:

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

CRITERIO:

$$CV < 6 = 1,5 \%$$

A.4. LINEALIDAD DEL METODO.

t = Número de cantidades adicionadas.

n = Número de repeticiones (cantidad recuperada) por cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos es necesario que el número de cantidades recuperadas de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

Calculos preliminares:

$$\sum x = (t)(x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{t1} + x_{t2} + \dots + x_{tn})$$

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

$$\sum x^2 = (t)(x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2)$$

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

$$\sum xy = x_{11}y_{11} + x_{12}y_{12} + \dots + x_{1n}y_{1n} + x_{21}y_{21} + x_{22}y_{22} + \dots + x_{2n}y_{2n} + \dots + x_{t1}y_{t1} + x_{t2}y_{t2} + \dots + x_{tn}y_{tn}$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cálculos finales:

PENDIENTE

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

ORDENADA

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

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

$$r = [r^2]^{1/2}$$

Calcular el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación.

$$R = (y/x) \cdot 100$$

Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = (ER) / N$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

Coefficiente de variación:

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

CRITERIO:

$$m \cong 1$$

$$h \cong 0$$

$$r^2 > 0.98$$

$$\bar{R} = 97-103\%$$

$$CV < 3\%$$

Estadígrafo de contraste para la pendiente:

$$t_{\text{cal}} = \frac{(m - m_0) S_x (n-1)}{\hat{S}_{y/x}}$$

$$S_{y/x} = \left[\frac{(\sum y^2) - \frac{(\sum y)^2}{N} - n(\sum xy)^2}{N} \right]^{1/2}$$

Error típico modificado:

$$\hat{S}_{y/x} = \left[\frac{N}{N-2} \right]^{1/2} (S_{y/x})$$

Estadígrafo de contraste para la ordenada:

$$t_{\text{cal}} = \frac{B_{\text{cal}} - b_0}{\hat{S}_{Y/X} \frac{\sum X^2}{[N \sum (X_i - \bar{X})^2]^{1/2}}}$$

CRITERIO:

Si $t_{\text{cal}} < t_{\alpha/2}$ se acepta H_0

ORDENADA:

$$b \pm t_{\alpha/2} \hat{S}_{Y/X} \left[\frac{\sum X^2}{N \sum (X_i - \bar{X})^2} \right]^{1/2}$$

PENDIENTE:

$$m \pm t_{\alpha/2} \frac{\hat{S}_{Y/X}}{S_X (N-1)^{1/2}}$$

A.5 PRECISION (REPETIBILIDAD)

Tabular los resultados del porcentaje recuperado.

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

DESVIACION ESTANDAR:

$$DE = \left[\frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

COEFICIENTE DE VARIACION:

$$CV = (DE/R) 100$$

A.6 PRECISION (REPRODUCIBILIDAD).

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días, dos analistas y tres determinaciones.

Cálculos preliminares:

$$\sum y = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + \dots + y_{223}$$

$$\sum y^2 = y^2_{111} + y^2_{112} + y^2_{113} + y^2_{121} + \dots + y^2_{223}$$

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

$$DE = \left[\frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

COEFICIENTE DE VARIACION:

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

CRITERIO:

$$CV < \delta = 3\%$$

Una prueba estadística adicional para la prueba de precisión específicamente de la reproducibilidad es la siguiente:

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Calcular la suma para cada analista:

$$Y_1 = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_2 = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Calcular la suma total de (y...):

$$y_{...} = y_1 + y_2$$

Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y^2_{ij} = (y_{11})^2 + (y_{12})^2 + (y_{21})^2 + (y_{22})^2$$

Calcular la suma del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$(\sum y_i)^2 = (y_1)^2 + (y_2)^2$$

Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y^2_{ijk} = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_i^2}{dr} - \frac{y^2}{adr}$$

CRITERIO:

Si $F_a < F_{gla,gl,d; 0.05}$

El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a > F_{gla,gl,d; 0.05}$

El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{gla,gl,e; 0.05}$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d > F_{gla,gl,e; 0.05}$

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

A.7. EXACTITUD AL 100%

Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

DESVIACION ESTANDAR

$$DE = \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)}$$

COEFICIENTE DE VARIACION

$$CV = (DE/R) \cdot 100$$

CRITERIO:

$$\bar{R} = 97 - 103\%$$

$$CV < \delta = 3\%$$

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE.

$$DE = \frac{\bar{R} - 100}{\frac{DE}{[N]^{1/2}}}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA.

$$IC = R \pm t(g.l.n.-2., 0.05) \frac{DE}{[N]^{1/2}}$$

CRITERIO:

$$t_{cal} < 0 = t_{g.l.n.-2., 0.95}$$

A.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Inicial	Condición / Tiempo.	
	1	2
y_1	y_4	y_7
y_2	y_5	y_8
y_3	y_6	y_9

2. Calcular preliminares para el intervalo de confianza:

\bar{y}_0	\bar{y}_1	\bar{y}_2	MEDIA
S^2_0	S^2_1	S^2_2	VARIANZA

VARIANZA PONDERADA:

$$Sp^2_1 = \frac{2S^2_0 + 2S^2_1}{2(C+1)}$$

$$Sp^2_2 = \frac{2S^2_0 + 2S^2_2}{2(C+1)}$$

3. Intervalo de confianza.

$$IC = (\bar{y}_1 - \bar{y}_0) \pm t_{\alpha} [Sp^2_2 (2/3)]^{1/2}$$

4. Calculos para el coeficiente de variación.

$$I_1 = \frac{y_4}{y_1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{y_5}{y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{y_6}{y_3} \times 100$$

$$\bar{I} = \frac{\sum I}{N}$$

La media del factor Y debe tener un valor entre 97 - 103%, para que la muestra sea estable.

Tabla del análisis de varianza para reproducibilidad

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. cal
ANALISTA	$a-1$	$\frac{\sum y_i^2}{d \cdot r} - \frac{y^2}{a \cdot d \cdot r}$	$\frac{SCa}{gla}$	$\frac{MCa}{MCi}$
DIA	$d-1(a)$	$\frac{\sum Y_j^2}{d \cdot r} - \frac{Y^2}{a \cdot r \cdot d}$	$\frac{SCd}{gld}$	$\frac{Mcd}{MCi}$
INTERAC- CION	$(a-1)(d-1)$	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{r \cdot a} - \frac{\sum Y_i^2}{r \cdot d} - \frac{\sum Y_j^2}{a \cdot d \cdot a} + \frac{y^2}{r}$	$\frac{SCi}{gli}$	$\frac{MCi}{MCe}$
ERROR	$t(r-1)$	$\sum Y_{ijk} - \sum Y_{ij}$	$\frac{SEc}{gle}$	

a: número de analistas

d: número de dias

r: número de replicaciones

XI. Bibliografía.

1. Vulcarcel M., "Técnicas analíticas de separación" .Ed. Reverte, España, pp 333 1988.
2. Connors K.A., "Curso de análisis farmacéutico". Ed. Reverte, España, pp 403 1980.
3. García A.; Castillo B. "Cromatografía líquida de alta resolución". Ed. Limusa. México 1988.
4. Hadden and Baumann, "Basic Liquid Chromatography". Varian, 1972.
5. "Disolventes para HPLC", Leacsa S.A. De C.V. 1991.
6. Bello G. "La Cromatografía líquida de alta resolución" *Pharma News*, 2,6 pp 19-21, 1991.
7. Bello G. "La Cromatografía líquida de alta resolución" *Pharma News*, 2,2 pp 19-21, 1991.
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a edición, pp 116-120 1988.
9. "Estadística aplicada a la validación de métodos analíticos" Asociación Farmacéutica Mexicana. México 1991.
10. Curso de Cromatografía de Líquidos. Facultad de Química. Septiembre de 1993.
11. Locbi S.; Spratto G. "Manual de Farmacología" Ed. Limusa. México, pp 500-501; 347-355, 1986.
12. Florey F., "Profiles of Drug Substances" Ed. Academic press. New York. 7 pp 321-341, 1982.
13. Florey F., "Profiles of Drug Substances" Ed. Academic press. New York. 15 pp 233-281, 1982.
14. "Procedimiento de validación de métodos analíticos" Laboratorios Columbia S.A. de C.V.
15. "Validación de métodos analíticos" Dirección general de control de insumos para la salud S.S.A, 1991 .
16. Lual. "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos" *Pharma News* 4;32-34, 1993.
17. Pedrosa A., "Importante simposio sobre el asma y otras enfermedades respiratorias". Universal pp 12 1994.
18. Curso de introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Perkin Elmer. Belmar P. Francisco.
19. Curso de validación de métodos analíticos. Beckman. Gonzalez M. Héctor.
20. Andrizzi S., "Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica" Ed. Merck de México, 1990.