

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**MONOGRAFÍA DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**



**TÍTULO: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA
CUANTIFICACIÓN DE CARBOXIMETILCISTEÍNA SOLUCIÓN ORAL
50 mg/mL POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN (CLAR), LABORATORIOS SOLKA S.A; ENERO -
MARZO 2016.**

Autores: Bra. Katherine Danelia Castillo Morales

Bra. Yeribeth Elisa Rodríguez Martínez

Tutora: PhD. Carla Martínez Algaba

Managua, Noviembre 2016

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo:

A Dios, quién supo guiarnos por el buen camino, darnos las fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándonos a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A nuestros padres, quienes nos brindaron su apoyo en todo momento por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que nos han permitido ser personas de bien, pero más que nada, por su amor.

A nuestra tutora, PhD. Carla Martínez Algaba, por su gran apoyo durante este trabajo monográfico, por habernos transmitidos los conocimientos obtenidos durante nuestros estudios profesionales.

A nuestros familiares, que siempre nos ofrecieron su apoyo de forma directa o indirectamente. Por ello dedicamos este trabajo monográfico con todo el amor y cariño que se merecen.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios por brindarnos la oportunidad de vivir, por permitirnos disfrutar cada momento de nuestras vidas y guiarnos por el camino que él ha trazado para nosotras.

A nuestros padres, por ser el apoyo más grande durante nuestra educación universitaria, ya que sin ellos no hubiese sido posible lograr nuestras metas. Por ser nuestro ejemplo a seguir, por enseñarnos a seguir aprendiendo sin importar las circunstancias y el tiempo.

Agradecemos especialmente a nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por el tiempo y dedicación brindado durante la elaboración del presente trabajo monográfico.

A Laboratorios SOLKA S.A. principalmente al Lic. Sergio Ruíz, Gerente de Operaciones y al Ing. José María Ortiz Sequeira, responsable del Área de Estabilidad, por el apoyo y colaboración brindada en la realización de esta monografía.

OPINIÓN DEL TUTOR

MSc. Rosa María González.

Dir. Dpto. de Química.


UNAN-Managua

El trabajo realizado por las Bachilleres Katherine Danelia Castillo Morales y Yeribeth Elisa Rodríguez Martínez, titulado "Validación de la técnica analítica para cuantificación de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)", para optar al título de Licenciatura en Química Farmacéutica, se ha llevado a cabo con autonomía investigativa, iniciativa y liderazgo.

Cabe mencionar que esta investigación dará pauta a continuar en el campo de validación de métodos de análisis en la industria farmacéutica, prioridad indispensable ante la demanda de la misma y como requisitos del Ministerio de Salud de Nicaragua para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos, además abrirá las puertas a otros temas relacionado a la industria farmacéutica, basada en las normativas establecidas por el ente regulador de la salud Nicaragüenses. Además es la base para la innovación de nuevos proyectos de interés nacional.

Por tanto hago constar que las Bras Castillo y Rodríguez, han realizado esta investigación, fortaleciendo sus habilidades de abstracción, además de invertir recursos económicos y horas de sueño. Por tanto avalo a las Bras antes mencionadas, para que realicen los trámites de presentación y defensa del trabajo.

Sin más le saludo cordialmente.


Ph.D. Carla Martínez Algaba
Doctora en Farmacia
Tutora

RESUMEN

Carboximetilcisteína con nombre químico (2R)-2-amino-3-[(carboximetil) sulfanil] ácido propanóico, es un medicamento mucolítico y mucoregulador con efecto fluidificante, indicado como coadyuvante en el tratamiento de desórdenes agudos y crónicos del tracto respiratorio alto y bajo, en la prevención de cuadros agudos asociados a bronquitis obstructiva crónica.

El presente trabajo se llevó a cabo en Laboratorios SOLKA S.A, con el objetivo de validar la técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de carboximetilcisteína, partiendo de trabajos anteriores ya que no existe una metodología de análisis para producto terminado de carboximetilcisteína en las Farmacopeas de referencia, ajustando las condiciones cromatográficas de trabajo.

Se utiliza un Cromatógrafo de líquidos marca YLClarity, modelo 9100 con Número de serie 9110, con inyector manual, con detector de arreglo de diodos a longitud de onda fija de 210 nm, trabajando en el rango de concentraciones 80% a 120%, utilizando como fase móvil Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02M y metanol (95:5).

Para la validación de la técnica se evalúan los parámetros estadísticos de desempeño, aptitud del sistema, linealidad, precisión, exactitud, robustez, especificidad, para cumplir con los requisitos del Reglamento Técnico Centroamericano Armonizado (RTCA 11.03.39:06), "Productos farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la evaluación de la Calidad de los Medicamentos".

La técnica analítica demuestra ser lineal, precisa y exacta, obteniéndose resultados para $r^2 = 0.9999$, con un coeficiente de variación $< 2\%$ y con porcentajes de recuperación de 99.94%, por lo tanto, puede emplearse como método de rutina en el control de calidad del medicamento.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. ASPECTOS GENERALES

1.1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.2.	OBJETIVOS	3
1.2.1.	Objetivo general.....	3
1.2.2.	Objetivos específicos.....	3
1.3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.4.	JUSTIFICACIÓN	5
1.5.	ANTECEDENTES	6

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1.	Validación de métodos analíticos	10
2.1.1.	Adecuación del sistema	12
2.1.2.	Linealidad e intervalo	13
2.1.3.	Exactitud	15
2.1.4.	Precisión	15
2.1.5.	Especificidad	17
2.1.6.	Límite de detección (Iod)	18
2.1.7.	Límite de cuantificación (loq).....	19
2.1.8.	Robustez.....	19
2.1.9.	Documentación de validación	20
2.2.	Carboximetilcisteína	21
2.2.1.	Propiedades físico químicas de carboximetilcisteína.....	21
2.2.2.	Propiedades farmacológicas.....	22
2.2.3.	Farmacocinética y farmacodinamia de carboximetilcisteína.....	23
2.3.	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	23
2.3.1	Definiciones cromatográficas	25
2.4	Laboratorios SOLKA S.A	28

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS

3	Hipótesis.....	30
---	----------------	----

CAPÍTULO IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1	Descripción del ámbito de estudio	32
4.2	Tipo de estudio	32
4.3	Población y muestra	33
4.3.1	Población	33
4.3.2	Muestra	33
4.3.2.1.	Criterios de inclusión.....	33
4.3.2.2.	Criterios de exclusión.....	33
4.4	Variables y operacionalización	33
4.4.1	Variables independientes	33
4.4.2	Variables dependientes.....	33
4.4.3	Operacionalización de las variables.....	34
4.5	Material y método	37
4.5.1	Materiales para recolectar información	37
4.5.2	Materiales para procesar la información	37
4.5.3	Método de análisis	37
4.5.3.1	Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	38
4.5.3.1.1	Condiciones cromatográficas	38
4.6	Preparación de soluciones	39
4.6.1	Soluciones reactivos	39
4.6.2	Fase móvil.....	39
4.6.3	Preparación del estándar de carboximetilcisteína 499.5 µg/ml (100%).....	40
4.6.5	Preparación del placebo	43
4.6.5.1.	Solución placebo cargado 80%.....	44
4.6.5.2.	Solución placebo cargado 100%.....	44
4.6.5.3.	Solución placebo cargado 120%.....	44
4.6.6	Parámetros de validación de la técnica analítica para la cuantificación de principio activo carboximetilcisteína	45

4.7	Parámetros para la validación del método para la cuantificación de carboximetilcisteína S.O 50 mg/ml	49
4.7.1	Parámetros estadísticos para linealidad del método.....	49
4.7.2	Parámetros estadísticos para precisión del método.....	50
4.7.3	Parámetros estadísticos para exactitud del método.....	51
4.7.4	Parámetros estadísticos para robustez del método	52
4.8	Reactivos, equipos y materiales	53

CAPÍTULO V.ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

5.1	Análisis de los resultados	56
5.1.1	Técnica cromatográfica de líquidos de alta resolución (clar) con bomba binaria.....	56
5.1.2	Adecuación de sistema	56
5.1.3	Linealidad del sistema.....	58
5.1.4	Ecuación de la recta de la linealidad del sistema.....	60
5.1.5	Test de linealidad del sistema: test de student para la pendiente (b) en CLAR.....	64
5.1.6	Test de proporcionalidad del sistema: test de student para el intercepto (a) en CLAR	66
5.1.7	Test de cochran para el sistema	67
5.1.8	Análisis de varianza del sistema en CLAR.....	71
5.1.9	Precisión del sistema en CLAR.....	74
5.1.10	Exactitud del sistema en CLAR.....	77
5.1.11	Linealidad del método (carboximetilcisteína)	82
5.1.12	Test de linealidad del método: test de student para la pendiente (b) en CLAR.....	87
5.1.13	Test de proporcionalidad del método: test de student para el intercepto (a) en CLAR.....	89
5.1.14	Test de g de cochran del método.....	91
5.1.15	Coeficiente de variación de los factores de respuesta para el método.....	93
5.1.16	Análisis de varianza del método en CLAR.....	94
5.1.17	Repetibilidad del método en CLAR	97

5.1.18	Precisión intermedia del método en CLAR.....	100
5.1.19	Exactitud del método de carboximetilcisteína	107
5.1.20	Robustez del método	111
6	CONCLUSIONES	115
7	RECOMENDACIONES	116
	BIBLIOGRAFIA	117
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Especificaciones	Página
Tabla 2.1.1	Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos y potencia microbiológica	11
Tabla 2.2.	Parámetros estadísticos de calidad de los métodos analíticos	12
Tabla 2.1.5.1.	Criterios de aceptación recomendables para especificidad	18
Tabla 2.2.1.1.	Propiedades físico químicas carboximetilcisteína	11
Tabla 2.2.2.1.	Farmacología de carboximetilcisteína 50 mg/mL solución oral	22
Tabla 2.3.1.1.	Terminología y ecuaciones cromatográficas	25
Tabla 4.5.3.1.1.1.	Condiciones del equipo CLAR	38
Tabla 4.6.6.1.1.	Parámetros estadísticos para adecuación del sistema	45
Tabla 4.6.6.2.1.	Parámetros estadísticos para linealidad del sistema	46
Tabla 4.6.6.3.1.	Parámetro estadístico para repetibilidad del sistema	47
Tabla 4.6.6.4.1.	Criterio de aceptación para evaluación de especificidad del sistema	48
Tabla 4.6.6.5.1.	Parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del sistema	49
Tabla 4.7.1.1.	Parámetros estadísticos para linealidad del método	50
Tabla 4.7.2.1.	Parámetro estadístico para evaluar la repetibilidad del método	51
Tabla 4.7.2.2.	Parámetros estadísticos para evaluar precisión intermedia del método	51
Tabla 4.7.3.1.	Parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del método	51
Tabla 4.7.4.1.	Condiciones de trabajo para la evaluación	52

	estadística de robustez del método	
Tabla 4.7.4.2	Parámetros estadísticos para evaluar la robustez del método	52
Tabla 5.1.2.1.	Tratamiento estadístico de adecuación del sistema	57
Tabla 5.1.3.1.	Ecuaciones para el análisis estadístico de la linealidad	59
Tabla 5.1.4.1.	Análisis de mínimos cuadrados de la linealidad del sistema en CLAR	61
Tabla 5.1.7.1.	Test de Cochran para el análisis de varianza de los factores de respuesta del sistema en CLAR	69
Tabla 5.1.8.1.	Análisis de varianza del sistema en CLAR	72
Tabla 5.1.9.1.	Evaluación de la repetibilidad del sistema en CLAR	75
Tabla 5.1.10.1.	Evaluación estadística de la exactitud del sistema en CLAR	78
Tabla 5.1.10.1.1.	Evaluación de la exactitud del sistema aplicando el test de Cochran para porcentaje de recuperación	80
Tabla 5.1.11.1.	Evaluación de la linealidad del método de carboximetilcisteína 50 mg/mL en	82
Tabla 5.1.11.1.1.	Análisis de mínimos cuadrados para linealidad del método en CLAR	85
Tabla 5.1.14.1.	Test de Cochran para el análisis de varianza de los factores de respuesta del método en CLAR	92
Tabla 5.1.16.1.	Análisis de varianza del método en CLAR	96
Tabla 5.1.17.1.	Evaluación de repetibilidad del método en CLAR	98
Tabla 5.1.18.1.	Respuestas obtenidas de la precisión intermedia, inter analista e inter día en CLAR (Analista A)	101
Tabla 5.1.18.1.1.	Respuestas obtenidas de la precisión intermedia, inter analista e inter día en CLAR (Analista B)	102
Tabla 5.1.18.1.2.	Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR (Analista A vs Analista B)	103

Tabla 5.1.18.1.3.	Evaluación estadística para la precisión intermedia del método en CLAR	104
Tabla 5.1.18.1.4.	Precisión intermedia Analista A	105
Tabla 5.1.18.1.5.	Precisión intermedia Analista B	105
Tabla 5.1.18.1.6.	Precisión intermedia Analista A vs B, día 1	106
Tabla 5.1.18.1.7.	Precisión intermedia analista A vs B, día 2	106
Tabla 5.1.18.1.8.	Precisión intermedia, interdía e interanalista en CLAR, t estadígrafo Student	107
Tabla 5.1.19.1.	Porcentaje de recuperación del método de carboximetilcisteína S.O. 50 mg/mL	109
Tabla 5.1.19.1.2.	Test de Cochran del método en CLAR para porcentaje de recuperación	110
Tabla 5.1.20.1.	Evaluación de la robustez del método en CLAR	112
Tabla 5.1.20.2.	Resumen de los resultados de la validación en CLAR	114

ÍNDICE DE ESQUEMA

Número	Especificaciones	Página
Esquema 2.1.4.1.	Tipos de estudios de precisión	17
Esquema 2.1.9.1.	Documentación de validación	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Especificaciones	Página
Figura 2.3.1.	Componentes principales de un CLAR	24
Figura 4.5.3.1.1.2	Cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR) YL9100CLARITY	39

Número	ÍNDICE DE DIAGRAMA Especificaciones	Página
Diagrama 4.6.3.1.1.	Preparación de la curva de calibrado del estándar de carboximetilcisteína	41
Diagrama 4.6.4.1.1.	Preparación de la curva de calibrado de la muestra de carboximetilcisteína	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Número	Especificaciones	Página
Gráfico 5.1.3.2.1.	Curva de calibrado para la linealidad del sistema	60
Gráfico 5.1.4.1.1.	Análisis residual de la linealidad del sistema	62
Gráfico 5.1.11.2.	Linealidad del método de cuantificación de carboximetilcisteína 50 mg/mL, S.O	84
Gráfico 5.1.11.1.2	Análisis de residuales de la linealidad del método	86

INDICE DE ANEXOS

Número	Especificaciones
Anexo I	Glosario
Anexo II	Listado de siglas
Anexo III	Listado de abreviaturas
Anexo IV	Listado de ecuaciones
Anexo V	Cálculos
Anexo VI	Idoneidad del método en CLAR
Anexo VII	Curva de calibrado del sistema de CLAR
Anexo VIII	Exactitud en CLAR de carboximetilcisteína 50 mg/mL
Anexo IX	Precisión intermedia del método de carboximetilcisteína 50 mg/mL (día 1)
Anexo X	Precisión intermedia del método de carboximetilcisteína 50 mg/mL (día 2)
Anexo XI	Balanza analítica y Bomba al vacío
Anexo XII	Dispositivo de Nylon para jeringa 0.45µm
Anexo XIII	Certificado de análisis de carboximetilcisteína del proveedor
Anexo XIV	Certificado de análisis de carboximetilcisteína de Laboratorios SOLKA S.A.
Anexo XV	Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11:03:39.06
Anexo XVI	Capítulo general Cromatografía Líquida Alta Resolución USP 36
Anexo XVII	Capítulo general Validación de Procedimientos Farmacopeicos USP 36
Anexo XVIII	Tabla de t-Student
Anexo XIX	Tabla de G-Cochran
Anexo XX	Tabla de f-Fisher

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES



1.1 INTRODUCCIÓN

En Nicaragua son muchas las enfermedades que han afectado a la población en estos últimos años, las más comunes son: las infecciones respiratorias agudas (IRA) y neumonía, según el reporte del MINSA, las IRA ocupan el primer lugar con un total de 245,188 casos y 26,554 casos de neumonía, debido a las condiciones climatológicas y los cambios bruscos de temperatura, por la ubicación geográfica de Nicaragua zona climática IV, siendo los niños los más afectados por estas enfermedades respiratorias.

El uso de los mucolíticos es esencial para el tratamiento de dichas infecciones, el jarabe de carboximetilcisteína posee esta acción farmacológica y podrá ser indicado en este tipo de afecciones. Laboratorios SOLKA S.A es la única industria farmacéutica nacional en la actualidad que formula carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL, no todos los laboratorios cuentan con el equipo necesario que algunos métodos modernos exigen para el análisis del producto terminado, por lo cual tienen que disponer de métodos de análisis alternativos, que sean rápidos, seguros, confiables y económicos.

Todo método analítico debe cumplir con las exigencias contempladas por la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas del Ministerio de Salud de Nicaragua y el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 "Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos", el cual indica las directrices que deben aplicarse a todos los métodos analíticos no oficiales y oficiales utilizados para el control de calidad de medicamentos.

La Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 36), no contemplan ninguna monografía para carboximetilcisteína como principio activo y producto terminado, las únicas referencias bibliográficas para principio activo se



encuentran en la Farmacopea Europea (5ta ed.) y la Farmacopea Británica (6ta ed.); este trabajo pretende validar el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL mediante la evaluación de los parámetros de desempeño, exactitud, precisión, linealidad e intervalo, con la única finalidad de garantizar la calidad y la seguridad del medicamento.



1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Validar la técnica analítica para la cuantificación de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en el laboratorio SOLKA S.A Enero- Marzo 2016.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar la idoneidad del sistema para la cuantificación del producto terminado de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).
- Evaluarlos parámetros de desempeño para la validación del método analítico: linealidad, precisión, exactitud, robustez, límite de cuantificación y límite de detección, para la cuantificación de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).



1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria farmacéutica actúa en busca de la calidad de los medicamentos y de los procesos de fabricación, ya que es importante que el medicamento sea seguro y eficaz esto se puede garantizar mediante la validación ya que es un procedimiento de medida que certifica mediante estudios de laboratorio que las características de dicho método cumplen con las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

Es necesario establecer una metodología de validación para carboximetilcisteína 50 mg/mL solución oral ya que no existe una metodología establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 36); únicamente en la Farmacopea Británica (Sexta edición) y Farmacopea Europea (Quinta edición) se define la técnica de valoración para principio activo y no para producto terminado.

Todo laboratorio farmacéutico tiene como principal objetivo la producción de datos analíticos de alta calidad por medio de uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas. La validación de un método analítico es un instrumento importante para poder garantizar la calidad del medicamento, puesto que les confiere fiabilidad a los resultados en el análisis, asegurando así que cumplan con los parámetros de calidad establecidos. La validación permite conocer las características del funcionamiento del método lo que garantizará un alto grado de confianza en el mismo y de los resultados obtenidos.

Todo lo anterior nos lleva a la siguiente pregunta ¿La técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es adecuada para la validación del producto terminado Carboximetilcisteína solución oral de 50 mg/mL?



1.4. JUSTIFICACIÓN

En los laboratorios farmacéuticos es necesario saber si la materia prima, los procesos, productos terminados o el almacenamiento, se encuentran bajo las normas legales o los parámetros establecidos a nivel nacional e internacional, para el aseguramiento de la calidad. Es importante utilizar métodos de análisis rápidos, altamente eficientes y no contaminantes, por tal razón es necesario validar cada uno de los métodos de análisis, aplicando los principios de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

La importancia de la realización de este trabajo de investigación se debe al aporte que suministra el método empleado, al reunir condiciones idóneas para la obtención de resultados precisos, exactos, confiable, con menos tiempo y costo en su aplicación. De la misma manera ser útil para el fortalecimiento del conocimiento farmacéutico relacionado con la validación de métodos analíticos.

La molécula de carboximetilcisteína fue seleccionada por el interés del Laboratorios SOLKA S.A, por lo que dicha molécula es adecuada para el tratamiento de las enfermedades del tracto respiratorio, así mismo al no contemplarse la metodología analítica en la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 36), y no estar validado este método para la cuantificación del producto terminado, se procede a validar el método a través de CLAR, para convertirse en un método oficial para la industria nacional.



1.5. ANTECEDENTES

A nivel internacional se encontraron algunos trabajos sobre validaciones de productos terminados de Carboximetilcisteína. En Nicaragua no existen estudios de validación de la técnica analítica para la cuantificación del producto terminado Carboximetilcisteína solución oral de 50mg/mL.

Internacionales:

2012:"Estabilidad del método indicando rendimiento cromatográfico líquido ultra veloce (UPLC) para la determinación de ensayo de carbocisteína en diversos productos de formulación". Ravindhar Burugu, g. Venkateshwarlu. Departamento de Química, College de Nizam de Hyderabad, Revista Internacional de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas; Oct 2012 Suplemento, Vol. 4, p653.

“El método fue desarrollado y validado para la determinación de carbocisteína mediante HPLC en fase inversa, el cual indica estabilidad rápida, precisa y exacta; la carbocisteína es un medicamento mucolítico y expectorante con una estructura de aminoácidos, el método fue desarrollado y validado en jarabes, cápsulas y tabletas comerciales. El método ha demostrado una separación adecuada para las impurezas principales asociadas a la carbocisteína y productos de degradación. La separación se logró con una columna Nucleosil C₁₈ de 3 μ , con un diámetro 100 mm de largo x 4.6 mm de ancho, usando una fase móvil que consiste en una solución amortiguadora de orto dihidrógeno fosfato de amonio 0.01 M (pH 2.6) con un caudal de 1 mL/min y detección UV a 210 nm. La linealidad del método propuesto fue investigada en el rango de 0.1-0.3, el límite de detección fue 0.007 μ g/mL y el límite de cuantificación fue de 0.021 μ g/mL. Los productos de degradación producidos como resultado de los estudios no interfirieron en la detección del ensayo lo que indica estabilidad del método”.



2010: "Cromatografía líquida de alta presión fase inversa técnica para la determinación de carbocisteína de formulación farmacéutica". RELE R.V.et al. Chem Pharm. Res., 2, 2010 (4): 24-30. D. G. Ruparel College, Matunga, Mumbai.

“El método de HPLC se utiliza para la estimación de carbocisteína el ingrediente activo farmacéutico, la reproducibilidad, repetibilidad y exactitud del método resultó ser satisfactorio, ya que se manifiesta con valores bajos de desviación estándar y desviación de estándar relativa porcentual. La separación de la droga se logró en APS-2 (Amino propil silano) hypersil, con una columna de 5 μ con una diámetro (250 mm X 4.6 mm). La fase móvil consistió en una mezcla de tampón y metanol (65: 35 v/v). El búfer era una mezcla de 0.02 M dihidrógeno fósforo de potasio monobásico y 0.01 M 1-hexano sulfónico ácido sal sódica anhidra. La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 210 nm. La solución tampón que contiene 0.02 M dihidrógeno fosfato de potasio monobásico y 0.01 M 1-hexano sulfónico ácido sal sódica anhidra se utiliza como diluyente. Para el método se validó la idoneidad del sistema, linealidad, exactitud, precisión, robustez, estabilidad de la solución de la muestra. El método se ha utilizado con éxito para analizar carbocisteína de formulación farmacéutica”.

2007: "Determinación de vida útil jarabe carbocisteína por método de Arrhenius". Josélia Larger Manfio. Universidad Federal De Rio Grande De Sul. Facultad de farmacia. Programa de posgrado en ciencias farmacéuticas". Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas. vol.43 no.4 São Paulo Oct. /Dec. 2007.

“La vida útil del jarabe carbocisteína se determinó con el método de Arrhenius, se ha validado el método de ensayo para el jarabe mediante la linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y robustez. La muestra fue expuesta a drásticas condiciones tales como 40°C, 50°C, 60°C y 70°C, los resultados fueron analizados con la ecuación de Arrhenius y a través del método gráfico, la vida útil del jarabe



carbocisteína dura aproximadamente 109.28 días cuando la forma de dosificación es almacenada en condiciones prohibidas. La fase móvil consistió en acetonitrilo y solución tampón de fosfato monobásico de sodio 10 mM (1:99) en el flujo de 1,5 mL/min. La detección fue realizada en 240 nm. La concentración de 2 mg/mL”.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO



2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Según el RTCA 11.03.39:06 se define validación como el “establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos”. La validación implica la demostración de fuentes de variabilidad del error sistemático y aleatorio de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Los métodos analíticos que pueden ser validados se clasifican en: ensayos de identificación, ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica, ensayos para la determinación de características farmacotécnicas, ensayos de límites de impurezas y de cuantificación de impurezas, ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales y ensayos microbiológicos.

Según el RTCA 11.03.39:06 se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos:

- Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).



- Categoría IV: Pruebas de identificación. Para cada categoría, se requiere diferente información analítica

Los parámetros de calidad cuantitativos utilizados para definir si un método es adecuado para resolver un problema analítico determinado, son:

Tabla 2.1.1 Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos

Categoría de prueba Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
	Principio(s) activo(s)	Prueba de límite Cuantitativa	Prueba de límite Cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de Detección	No	No	Si	*	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo

Fuente:(Reglamento Técnico Centroamericano [RTCA] 11.03.39:06).

La validez de un procedimiento analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la conclusión exitosa de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un procedimiento es adecuado para sus aplicaciones previstas.



Los parámetros de calidad para determinar el desempeño del procedimiento analítico se evalúan estadísticamente de la siguiente manera:

Tabla 2.2. Parámetros estadísticos de calidad de los métodos analíticos

Características	Parámetro de calidad
Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación y varianza
Exactitud	Error absoluto, error relativo, porcentaje de recuperación
Sensibilidad	Pendiente de recta de calibrado
Selectividad	Coeficiente de selectividad
Robustez	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación y varianza

Fuente:(Gómez Ruiz, S., Quintanilla Pérez, D., Ruiz, I., & Sierra, A., 2009, p. 5-19).

Un método analítico será validado con el objetivo de cumplir con los requisitos de normas internacionales: RTCA 11.03.39:06, BPM, Norma ISO (Organización Internacional de Normalización) 17025 (Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración), Organismos Internacionales como FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), USP y otras Farmacopeas, OMS (Organización Mundial de la Salud), ICH (Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (Arriola, L., 2012, p.7)

2.1.1. ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento



específico dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando (Farmacopea de los Estados Unidos de América [USP 36], 2013, <1225 >, p. 1093-1097).

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, estos ensayos demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis y también permiten establecer criterios para modificar las condiciones analíticas con el fin de alcanzar la idoneidad.

Los parámetros de evaluación de los ensayos de idoneidad se agrupan en tres categorías:

- Precisión
- Parámetros cromatográficos:
 - Factor de capacidad (K')
 - Numero de platos teóricos (N)
 - Factor de asimetría o de cola (B/A)
 - Resolución (R)
- Límites de detección y cuantificación (AEFI, 2001, p. 68-94)

Como regla general la prueba de idoneidad del sistema contendrá como mínimo parámetros pertenecientes a dos categorías. La precisión del test de idoneidad se evalúa estadísticamente mediante el cálculo del coeficiente de variación inferior al 2% para respuestas analíticas, para cada inyección se recomienda calcular: número de platos teóricos y factor de cola.

2.1.1.2. LINEALIDAD E INTERVALO

Según RTCA 11.03.39:06 define linealidad de un procedimiento analítico como “la capacidad de obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado”.



El Intervalo es la amplitud entre la concentración inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método según se describe (RTCA, 11.03.39:06). La linealidad mide el grado en que la respuesta analítica, respecto a la concentración del analito se ajusta a una función lineal (Harris D, 2007, p.723-729)

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos mínimos especificados que se indican a continuación:

- Valoración de un Fármaco (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.
- Determinación de una Impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.
- Para Uniformidad del Contenido: un mínimo de 70 % a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica.
- Para Pruebas de Disolución: ± 20 % por encima del intervalo (USP 36, 2013, <1225>, p. 1093-1097).

La mayoría de los métodos analíticos se basan en una curva de calibración en la que una medida “y” se representa en función de la concentración conocida de “x” de una serie de patrones (Skoog, D., West, D., Holl, F., & Crouch, S, 2003, p. 37-60)

La relación de ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = bx + a$, donde “b” es la pendiente, “x” es la concentración del analito y “a” la ordenada al origen, obtenida por un método de ajuste. La



pendiente “b” se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor será la sensibilidad (AEFI, 2001, p. 68-94).

2.1.3. EXACTITUD

Se define exactitud según el RTCA 11.03.39:06 como “la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero”.

Se recomienda un mínimo de tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado, es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración. La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadido sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza (AEFI, 2001, p. 68-94).

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente esté comprendido dentro de un intervalo alrededor de 1.0; o alternativamente, que el valor de la pendiente sea cercano a 1.0 (USP 36, 2013, <1225>, p. 1093-1097).

2.1.4. PRECISIÓN

RTCA 11.03.39:06 define precisión como “el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas”. La precisión mide el error aleatorio de un método.



La precisión puede estimarse de tres maneras:

- Repetibilidad del método: grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por un único analista en un tiempo breve.
- Precisión intermedia: grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por dos analistas en distintos días.
- Reproducibilidad: grado de concordancia de los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a la misma muestra repetidas veces por analistas distintos en laboratorios diferentes y distintos días (Gómez Ruiz, S., Quintanilla Pérez, D., Ruiz, I., & Sierra, A., 2009, p. 5-19)

Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba (USP 36, 2013, <1225>, p. 1093-1097).

Otra manera de evaluar la precisión es a tres niveles de concentración, por lo general 80 %, 100 % y 120% de la concentración esperada del analito en la muestra, analizando tres porciones representativas de una muestra de cada nivel.

Los criterios de aceptación para el coeficiente de variación de un método analítico preciso son:

CV ≤ 2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

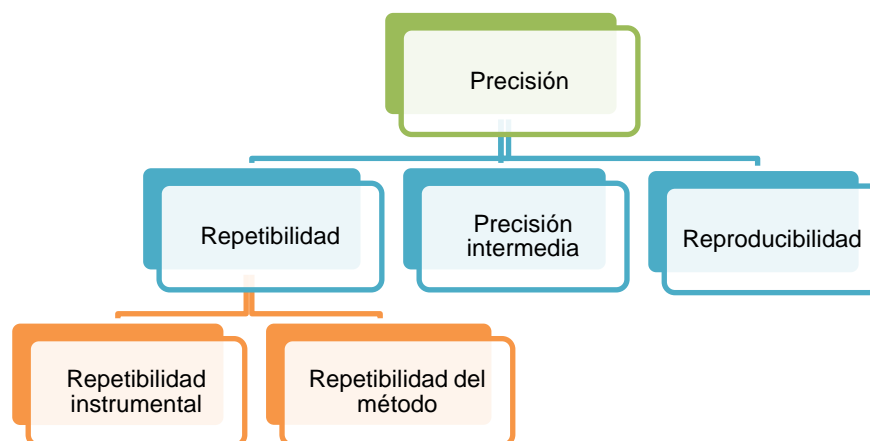
CV ≤ 3% para métodos químicos o espectrofotométricos

CV ≤ 5% para métodos biológicos

No mayor a la magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra (Guía de Validación de Métodos Analíticos, s.f.)



Esquema 2.1.4.1. Tipos de estudios de precisión



Fuente:(AEFI 2001, p. 68-94)

2.1.5. ESPECIFICIDAD

El RTCA 11.03.39:06 define especificidad como “la Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra”.

La especificidad se determina como el grado de diferencia que se obtiene al comparar los resultados analíticos de muestras contaminadas con impurezas, con los resultados de la muestra sin contaminar. La interferencia se determina como la diferencia obtenida de los resultados de los grupos de las muestras, la especificidad implica realizar ensayos de identificación, pruebas de pureza y valoraciones.

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad (se debe manejar una escala reducida, que permita observar bien las impurezas o productos de degradación) y los picos



deberán identificarse adecuadamente, aquellas impurezas desconocidas deberán ser identificadas con el tiempo de retención relativo, tomando como referencia el activo, la resolución o la relación altura / valle, cromatográficos entre los picos próximos al pico de interés debe ser mayor de 1.0.

Tabla 2.1.5.1. Criterios de aceptación recomendables para especificidad

Parámetro	Criterio de aceptación propuesto
Capacidad de discriminación del procedimiento	Suficiente
Desviación frente a la determinaciones sin interferencias	< 2% (< 4%)
Resolución cromatográfica entre picos cercanos	> 1.5 (> 2)
Factor de cola cromatográfico	< 2
Nº de platos teóricos cromatográficos	> 2000
Identidad del pico Pureza de pico, ausencia de coelución	
Nota: Los valores indicados entre paréntesis hacen referencia a los criterios máximos aceptables en determinados casos.	

Fuente:(AEFI 2001, p. 68-94)

2.1.6. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 define al límite de detección como mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite se expresa habitualmente como concentración de analito en la muestra, una manera de detectar el LOD, para un nivel de confianza del 95 % se basa en detectar la mínima señal analítica distinguible como la señal del blanco analítico, procedente de al menos 20 medidas, más un múltiplo de 3 de la desviación estándar del blanco.



Los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blancos. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 o 3:1. (USP 36, 2013, <1225>, p. 1093-1097).

2.1.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 define al límite de cuantificación como “mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de, impurezas y productos de degradación”.

El LOQ es un término cuantitativo puede considerarse como el límite inferior del intervalo lineal o rango, su cálculo se puede realizar a partir de la señal mínima cuantificable que es la señal medida del blanco analítico procedente de al menos 20 medidas, más un múltiplo de 10 de la desviación estándar del blanco.

2.1.8. ROBUSTEZ

La USP 36 define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros indicados en la documentación y provee una indicación de su actitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. El estudio de la robustez se realiza para evaluar la variabilidad de los resultados obtenidos, expresada como desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa o coeficiente de variación de los mismos.

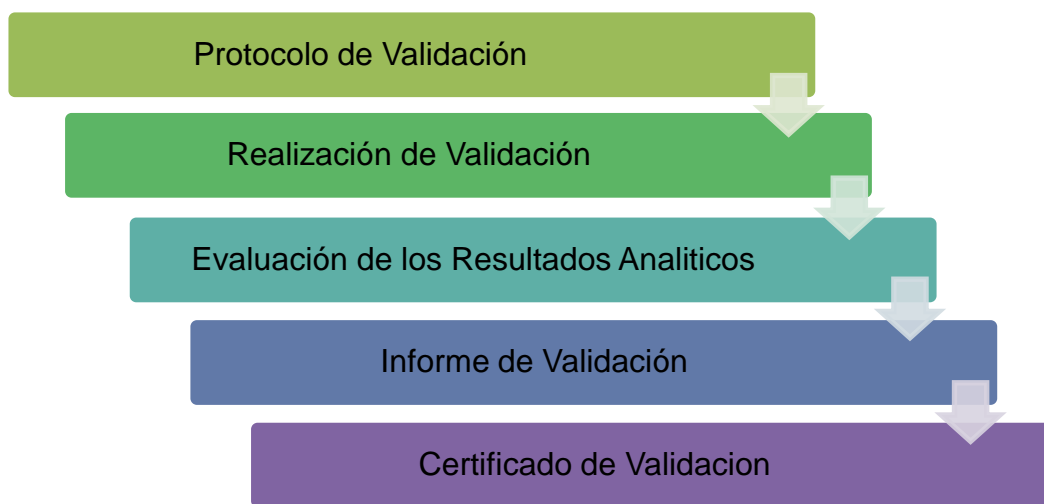


Para evaluar la robustez del método hay que identificar cuáles son los factores experimentales críticos en dicho método mediante el cual es posible conocer cuál de los factores bajo estudio ejercen una influencia más significativa (Soledad, B.,2009, p. 14).

2.1.9. DOCUMENTACIÓN DE VALIDACIÓN

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 define Validación como el establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Esquema 2.1.9.1. Documentación de validación



Fuente: (AEFI, 2001, p. 68-94).

Una vez realizado el proceso de validación es importante su documentación para que el método sea implementado de manera clara y sin equivocaciones. Los métodos documentados son parte importante de los sistemas de gestión de calidad y deben estar sujetos a los requisitos establecidos para el control de la documentación del Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio.



2.2. CARBOXIMETILCISTEÍNA

La carboximetilcisteína es un mucolítico. Actúa disminuyendo la viscosidad de la secreción mucosa.

2.2.1. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICA DE CARBOXIMETILCISTEÍNA

Tabla 2.2.1.1. Propiedades físico químicas carboximetilcisteína

Nombre propio	Carboximetilcisteína
Sinónimos	Carbocisteína, S-(Carboximetil)-1-Cisteína
Nombre sistemático IUPAC	(2R)-2-amino-3-[(carboximetil)sulfanil]ácido propanóico
Formula molecular	C ₅ H ₉ NO ₄ S
Formula estructural	$\begin{array}{ccccccc} \text{HO} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2 & - & \text{S} & - & \text{CH}_2 & - & \text{CH} & - & \text{C} & - & \text{OH} \\ & & & & & & & & & & & & & & \\ & & \text{O} & & & & & & & & \text{NH}_2 & & \text{O} & & \end{array}$
Peso molecular	179.2 g/mol
Descripción	Polvo blanco, cristalino
Solubilidad	Insoluble en agua y en alcohol. Se disuelve en ácidos minerales diluidos y en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos
LogP	-3.2, -3.3
pKa	-0.92 (ácido fuerte), 1.84 (base fuerte)



2.2.2. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Tabla 2.2.2.1. Farmacología de carboximetilcisteína 50 mg/mL solución oral

Mecanismo de acción	Acción específica sobre células mucosecretoras. Activa la sialiltransferasa favoreciendo la síntesis de sialomucina; restablece la funcionalidad del epitelio bronquial y el perfil secretor normal. La capacidad de inducir la fluidez del moco, mediante la desorganización de la red de fibrillas de mucina. La reducción de la viscosidad facilita la expectoración
Indicación	Coadyuvante de enfermedades respiratoria que cursa con secreción mucosa excesiva o espesa. Proceso catarral y gripal, sinusitis, rinofaringitis subaguda y crónica, y otitis media. EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica), bronquitis aguda, subaguda y crónica, bronquitis asmática, bronquitis del fumador, enfisema, atelectasias, bronquiectasias, regeneración posneumónica, neumoconiosis y fibrosis quística.
Posología	Oral. Niños 2-5 años: 100-125 mg/6-12 h. Niños 6-12 años: 200-250 mg/8 h. Adultos y niños > 12 años: 500 mg/12 h- 750 mg/8 h
Administración	Vía oral
Efectos adversos	Nauseas, diarrea, gastralgia
Contraindicaciones	Hipersensibilidad a productos relacionados con cisteína; asma; insuficiencia respiratoria grave; úlcera gastroduodenal; niños < 2 años.



2.2.3. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE CARBOXIMETILCISTEÍNA

La carboximetilcisteína actúa como agente mucoregulador que normaliza la viscosidad de las secreciones facilitando su expectoración, disminuyendo la producción de fucomucinas y aumentando la de las sialomucinas, que son más ácidas. Estas proteínas, a su vez, podrían mejorar la depuración mucociliar. La mayor parte del fármaco es eliminada en forma intacta por excreción urinaria.

Es absorbida rápidamente y sus máximas concentraciones séricas se alcanzan en 2 horas aproximadamente. Después de la administración de 1.5 g los niveles máximos son de 13 a 16 mg/mL. La vida media plasmática es de 1.5 a 2 horas y el volumen aparente de distribución es de 60 litros. La carbocisteína penetra en el tejido pulmonar y se acumula en el mucus respiratorio.

2.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación que consta de una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, que generalmente es una combinación de disolventes. En la fase estacionaria las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada, comúnmente se usan sílice modificada o las microperlas de polímero (Farmacopea de los Estados Unidos de América [USP 36], 2013, <621>, p. 292-295).

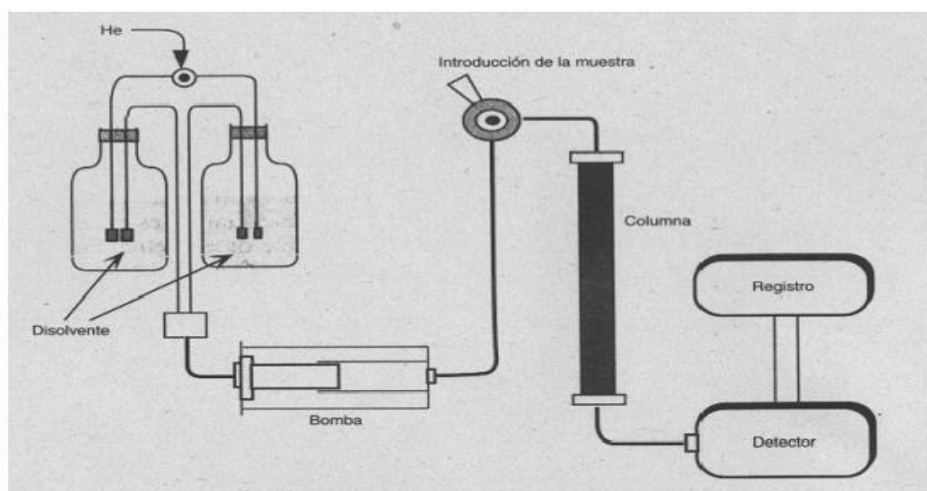
La fase estacionaria para cromatografía consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrófobos, la sílice presenta la ventaja que resiste grandes presiones sin contraerse y no se expande en contacto con los solventes, una de sus desventajas es que suele presentar inestabilidad a pH menor de 3.



Las columnas cromatográficas pueden estar fabricadas de acero inoxidable, acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, o rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro de la columna afectan la separación de los componentes. (USP 36, 2013, <621>, p. 292-295). Durante la cromatografía es necesario definir el gradiente de elución a manera que cambie el componente del disolvente continuamente.

Los equipos cromatográficos están constituidos por: recipientes que contiene la fase móvil, una bomba que fuerza el paso de la fase móvil, inyector de la muestra, una columna cromatográfica, un dispositivo recolector de datos y un detector.

Figura 2.3.1. Componentes principales de un CLAR



Fuentes: martes 29 de diciembre del 2015. Extraído desde: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19630/Capitulo2.pdf>



2.3.1 DEFINICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tabla 2.3.1.1. Terminología y ecuaciones cromatográficas

Terminología	Concepto	Ecuación
Volumen de residencia (D)	Es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna	
Tiempo muerto (t_M)	El tiempo muerto es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido	
Volumen muerto (V_M)	El volumen muerto es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido	$V_M = t_M \times F$ (Ecuación 1) F : velocidad de flujo t_M : tiempo muerto
Tiempo de retención (t_R)	Se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima	
Número de Platos Teóricos (N)	Es una medida de eficiencia de la columna.	$N: 16(t_R / W)^2$ (Ecuación 2) t_R : tiempo de retención W : ancho del pico en su base
Pico	El pico es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna.	

Fuente: USP 36, 2013, <621>. Cromatografía. Definiciones e interpretación de cromatogramas. 292-295



Terminología	Concepto	Ecuación
Relación Pico/Valle (p/v):	Se pueden emplear como un criterio de aptitud del sistema en una prueba de sustancias relacionadas cuando no se logra la separación entre dos picos en la línea base	$p/v = H_p/H_v$ (Ecuación 3) H_p : altura del pico menor por encima de la línea base extrapolada H_v : altura en el punto más bajo de la curva que separa los picos menor y mayor por encima de la línea base extrapolada
Retardo Relativo (R_{ret})	Es el cociente de la distancia recorrida por el analito y la distancia recorrida simultáneamente por un compuesto de referencia. Se usa en un cromatograma planar	$R_{ret} = b/c$ (Ecuación 4) b : muestra c : referencia
Tiempo de Retención Relativo (RRT)	También conocido con tiempo relativo no ajustado: Es la razón entre los tiempos de retención corregidos del componente considerado, t_{R2} , y de otro, t_{R1} , que se toma como patrón de referencia	$RRT = t_{R2}/t_{R1}$ (Ecuación 5)
Factor de Retardo (R_F)	Cociente entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil y se usa en cromatografía planar.	$R_F = b/a$ (Ecuación 6)

Fuente: USP 36, 2013, <621>. Cromatografía. Definiciones e interpretación de cromatogramas. 292-295



Terminología	Concepto	Ecuación
Factor de Retención (k)	También se le conoce como el factor de capacidad: es una medida del tiempo de retención, en unidades del tiempo, que es el tiempo que precisa la fase móvil o un soluto no retenido para atravesar la columna	$k = (t_R - t_M)/t_M$ (Ecuación 7)
Volumen de Retención (V_R)	Es el volumen de fase móvil requerido para la elución de un componente	$V_R = t_R \times F$ (Ecuación 8)
Resolución (R_s)	La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla	$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(W_1 + W_2)$ (Ecuación 9) t_{R2} y t_{R1} : tiempos de retención de los dos componentes W_2 y W_1 : Anchos correspondientes en las bases de los picos
Factor de Separación (α)	Es la retención relativa calculada para dos picos adyacentes	$\alpha = k_2/k_1$ (Ecuación 10)
Factor de Simetría (A_s) ²	También conocido como factor de asimetría	$A_s = W_{0.05}/2f$ (Ecuación 11) $W_{0.05}$: ancho del pico al 5% de la altura f : Es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico.

Fuente: USP 36, 2013, <621>. Cromatografía. Definiciones e interpretación de cromatogramas. 292-295



2.4 LABORATORIOS SOLKA S.A

Laboratorios SOLKA está ubicado en el km 16 ½ carretera Masaya-Managua, fue fundado por el Dr. Porfirio Solórzano Bermúdez, el 20 de Noviembre de 1931, el nombre de SOLKA es una combinación de los apellidos Solórzano Cabrera, registrada en Escritura Pública de la ciudad de Managua, Nicaragua. La calidad de sus preparaciones queda comprobada con la producción de líneas de sueros para Laboratorios ABBOT. SOLKA logró un crecimiento asombroso a partir de 1972, que permitió extender sus exportaciones a Centroamérica.

Este laboratorio fabrica un total de 84 fármacos para subsanar las necesidades de los consumidores, entre los cuales están: líquidos orales de llenado estéril, así como antibióticos y comprimidos de cualquier naturaleza, incluso de preparación en ambiente de humedad controlada. Es uno de los principales distribuidores de productos farmacéuticos a farmacias privadas y estatales a nivel nacional.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS



3 HIPÓTESIS

Si se aplica el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de carboximetilcisteína solución oral de 50 mg/mL, será esta una metodología adecuada para cuantificar el producto terminado sometido a análisis, cumplirá con los parámetros de validación establecidos y proporcionará datos precisos, reproducibles y confiables.

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO



4.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio es realizado en Laboratorios SOLKA S.A ubicado en el km 16 ½ carretera Masaya-Managua, posee 5 hectáreas (123 acres) de terreno con una construcción de 11.240.00 mt², cuenta con 9 áreas que a continuación se mencionan:

- Gerencia General
- Gerencia de Operaciones
- Departamento de Formulación
- Planificación y Control de Producción
- Departamento de Producción: Comprimidos, Semi Sólidos, Líquidos y Productos de Venta Libre
- Almacenes de: Materia prima, Envase, Empaque y Productos Terminados.
- Departamento de Mantenimiento
- Seguridad e Higiene Industrial
- Intendencia de Planta

4.2 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es descriptivo cuantitativo ya que mediante los resultados obtenidos de la valoración analítica de carboximetilcisteína se realizará el análisis estadístico para la validación del método, también se cataloga como estudio experimental de corte transversal; experimental porque el análisis se realiza de forma práctica y de corte transversal ya que el procedimiento se realiza en un determinado tiempo en Laboratorios SOLKA S.A.



4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

4.3.1 POBLACIÓN

La población en estudio está definida por Laboratorios SOLKA S.A, el cual proporciona los frascos de solución oral de carboximetilcisteína de 50 mg/mL para realizar el estudio por CLAR. Partiendo de una población de 3 frascos goteros de prueba piloto del mismo lote de carboximetilcisteína de 50 mg/mL, donde N es el tamaño de la población o universo, el valor de $N = 3$.

4.3.2 MUESTRA

Aplicando la fórmula estadística (ecuación 12) en el anexo IV para determinar la muestra de poblaciones finitas se define que la muestra a evaluar para $n = 3$, siendo n: número de muestras. La muestra será igual a la población.

4.3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Frasco de solución oral de carboximetilcisteína de 50 mg/mL.

4.3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Frasco de solución oral de carboximetilcisteína de concentración distinta a la establecida para el estudio.

4.4 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

4.4.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

Concentración

4.4.2 VARIABLES DEPENDIENTES

Linealidad

Precisión

Exactitud

Límite de detección

Límite de cuantificación

Robustez

Especificidad



4.4.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable		Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Tipo de variable
Independiente	Concentración	Se define como el número de pesos moleculares - gramo, o moles de especie disuelta en un litro de solución (RTCA 11.03.39:06).	Especificación para productos terminado.	98.5 – 101.0 %	Intervalo
	Linealidad	Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a concentración de analito en muestras en un intervalo dado (RTCA 11.03.39:06).	Coeficiente de determinación Coeficiente de correlación test de linealidad Test de proporcionalidad Test de Cochran Coeficiente de variación	$r^2 \geq 0.98$ $r \geq 0.999$ $t_{exp} > t_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$ $G_{exp} < G_{tab}$ $CV \leq 2 \%$	Intervalo
Dependiente	Precisión	Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero. (RTCA 11.03.39:06).	Desviación estándar Coeficiente de variación (CV) Límite de confianza del 95 %	$CV \leq 2\%$	Intervalo



Variable		Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Tipo de variable
Dependiente	Exactitud	Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas (RTCA 11.03.39:06).	Porcentaje de recuperación Coeficiente de variación	98.5 – 101.0 % CV ≤ 2 %	Intervalo
	Límite de detección (LOD)	Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. (RTCA 11.03.39:06).	Pendiente de la recta de calibrado y desviación estándar de la respuesta	LOD < LOQ	Intervalo
	Límite de cuantificación (LOQ)	Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. (RTCA 11.03.39:06).	Pendiente de la recta de calibrado y desviación estándar de la respuesta	LOQ > LOD	Intervalo



Variable		Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Tipo de variable
	Robustez	Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros. (RTCA 11.03.39:06).	Factor de capacidad(k'), Número de platos teóricos(N), Factor de cola (T) Resolución (R)	$k' > 1$ $N > 2000$ $T < 2$ $R > 1.5$	Intervalo
Dependiente	Especificidad	Capacidad de evaluar e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de excipientes presentes en la matriz de la muestra. (RTCA 11.03.39:06).	Factor de cola cromatográfica Nº de platos teóricos	< 2 $\text{>} 2000$	Intervalo



4.5 MATERIAL Y MÉTODO

4.5.1 MATERIALES PARA RECOLECTAR INFORMACIÓN

El método para recolectar información es a través de consultas en el “Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39:06. Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos”, Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Europea y Farmacopea Británica, Asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI 2001) y sitios Web.

4.5.2 MATERIALES PARA PROCESAR LA INFORMACIÓN

Los materiales para procesar la información son programas estadísticos: Microsoft Excel 2010, utilizando la herramienta de análisis de datos del programa (Regresión, t Student, Fisher, Análisis de varianza y Correlación), se diseñarán las hojas de cálculo con las fórmulas correspondientes para verificar estadísticamente los datos específicos para tal fin, presentando la información obtenida a través de cuadros y gráficos en Microsoft Word 2010.

4.5.3 MÉTODO DE ANÁLISIS

El método de análisis utilizado es una adaptación del artículo “Determinación de vida útil jarabe carbocisteína por método de Arrhenius”. Josélia Larger Manfio. Universidad Federal Do Rio Grande Do Sul. Facultad de Farmacia. Programa de posgrado en ciencias farmacéuticas”. Dichas adaptaciones en las condiciones cromatográficas son realizadas en base a los reactivos disponibles en Laboratorios SOLKA S.A. Las modificaciones fueron: cambios de la proporción de la fase móvil y el solvente orgánico dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M y metanol (95:5) y cambio en la longitud de onda estableciéndose lecturas a 210 nm.



4.5.3.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

4.5.3.1.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Tabla 4.5.3.1.1.1. Condiciones del equipo CLAR

Equipo	Cromatografo Líquido de Alta Resolución (CLAR)
Marca	YL9100CLARITY System Modelo High Performance Liquid Chromatograph
Columna	C ₁₈ 150 mm x 4 mm
Fase móvil	Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M y metanol (95:5)
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Presión	180 ± 10 Bar
Sistema	Cuaternaria
Volumen de inyección	5 µL
Jeringa	Nipro de 100 µL
Temperatura del termostato	25 °C
Sistema de detección	UV
Longitud de onda	210 nm
Tiempo de retención	2.59 Minutos
Tiempo de recorrido	12 Minutos
Concentración al 100%	499.5 µg/mL
Modo de inyección	Manual

Figura 4.5.3.1.1.2. Cromatografo Líquido de Alta Resolución (CLAR)

YL9100CLARITY



Fuente: extraído 13 de julio del 2016, desde: http://old.younglin.com/eng/images/product/YL9100%20system2_small.jpg

4.6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

4.6.1 SOLUCIONES REACTIVOS

4.6.1.1 DIHIDRÓGENO FÓSFATO MONOBÁSICO DE SODIO 0.02 M (NAH₂PO₄.H₂O)

Se pesó 2.7588 g de NaH₂PO₄.H₂O y se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL limpio y seco, posteriormente se adicione 250 mL de H₂O destilada y agito manualmente por 2 minutos, luego se agregaron los otros 250 mL de H₂O hasta aforo, seguido de filtración al vacío. (Anexo V)

4.6.2 FASE MÓVIL

La fase móvil para el sistema CLAR estaba compuesta por solución amortiguadora de dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M y metanol grado CLAR, cada solución fue filtrada al vacío y fueron desgasificadas por el



equipo para evitar inconvenientes durante el procedimiento analítico. La mezcla de solución tampón fue 100 % dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M.

El sistema de fase móvil era cuaternario, pero solo se hace uso de dos reservorios A y B, ya que el método propuesto utiliza una mezcla binaria asignando las siguientes proporciones a cada una:

A: Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M 95 %

B: Metanol 5 %

C: 0 %

D: 0 %

4.6.3 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE CARBOXIMETILCISTEÍNA 499.5 µg/mL (100%)

Se pesó 50.556 mg de carboximetilcisteína equivalente a 50 mg de carboximetilcisteína, se transfirió a un matraz de 100 mL y se agregó $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, aplicando agitación mecánica y simultáneamente sometido a baño María a temperatura de 40 °C, hasta la disolución completa del principio activo; posteriormente se aforo, obteniéndose una concentración final de 499.5 µg/mL.

4.6.3.1 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE CARBOXIMETILCISTEÍNA PARA CURVA DE CALIBRADO

Para preparar la solución estándar se utilizó estándar de trabajo, con un porcentaje de pureza de 98.9 % según el certificado de análisis del proveedor y el certificado de análisis proporcionado por el área de control de calidad del Laboratorios SOLKA S.A., dichos certificados mencionados anteriormente se aprecian en el anexo XIII y XIV.

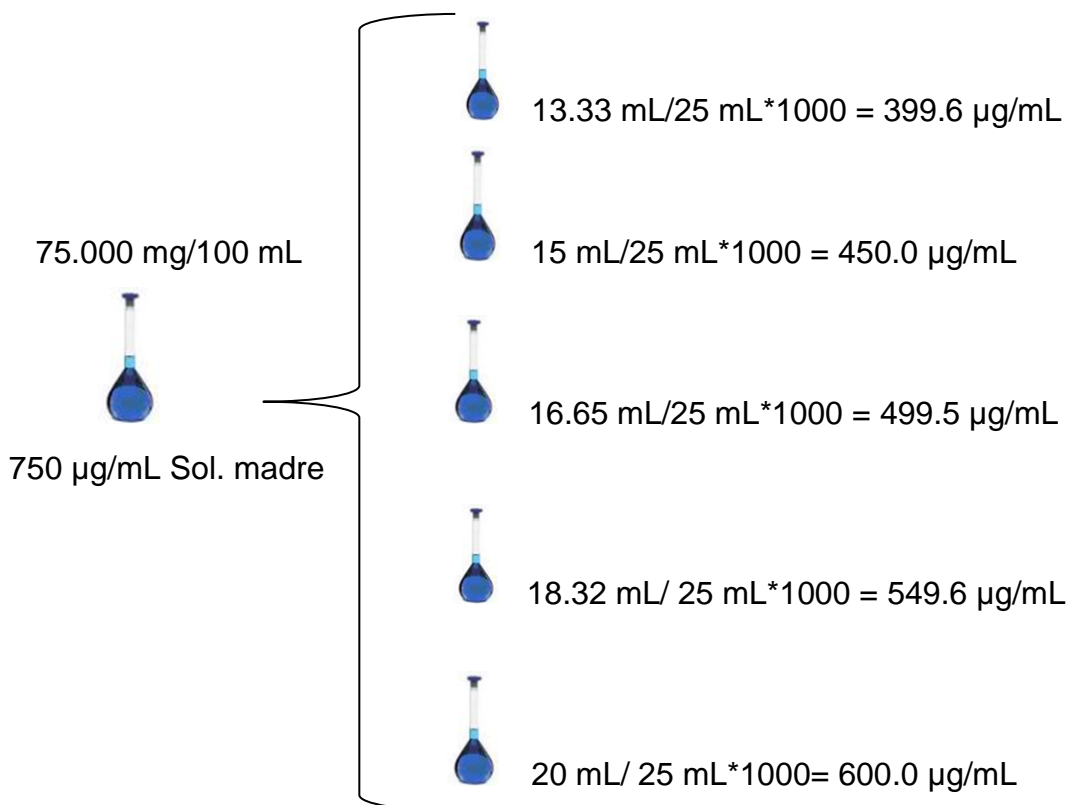
Se pesó con exactitud en una balanza analítica 75.834 mg de carboximetilcisteína y teniendo en consideración la pureza del estándar de trabajo



98.9 % se obtiene un peso real de 75 mg de carboximetilcisteína, los cuales se transfirieron inmediatamente a un matraz de 100 mL, y se disolvieron en $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, con agitación mecánica y simultáneamente fue sometido a baño María a temperatura de 40 °C, hasta la disolución completa del principio activo posteriormente se afora, obteniéndose una concentración de 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Anexo V)

Se preparó a partir de la solución madre, 5 concentraciones distintas para la curva de calibrado a las siguientes concentraciones: 399.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 450.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 499.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 549.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %) todas con $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M en matraces de 25 mL, con agitación manual por 3 minutos para homogenizar la solución. (Anexo V). Posteriormente se filtraron las muestras con dispositivos para jeringa de 0.45 μm (Anexo XII), para su lectura.

Diagrama 4.6.3.1.1. Preparación de la curva de calibrado del estándar de Carboximetilcisteína





4.6.4 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CARBOXIMETILCISTEÍNA 50 mg/mL

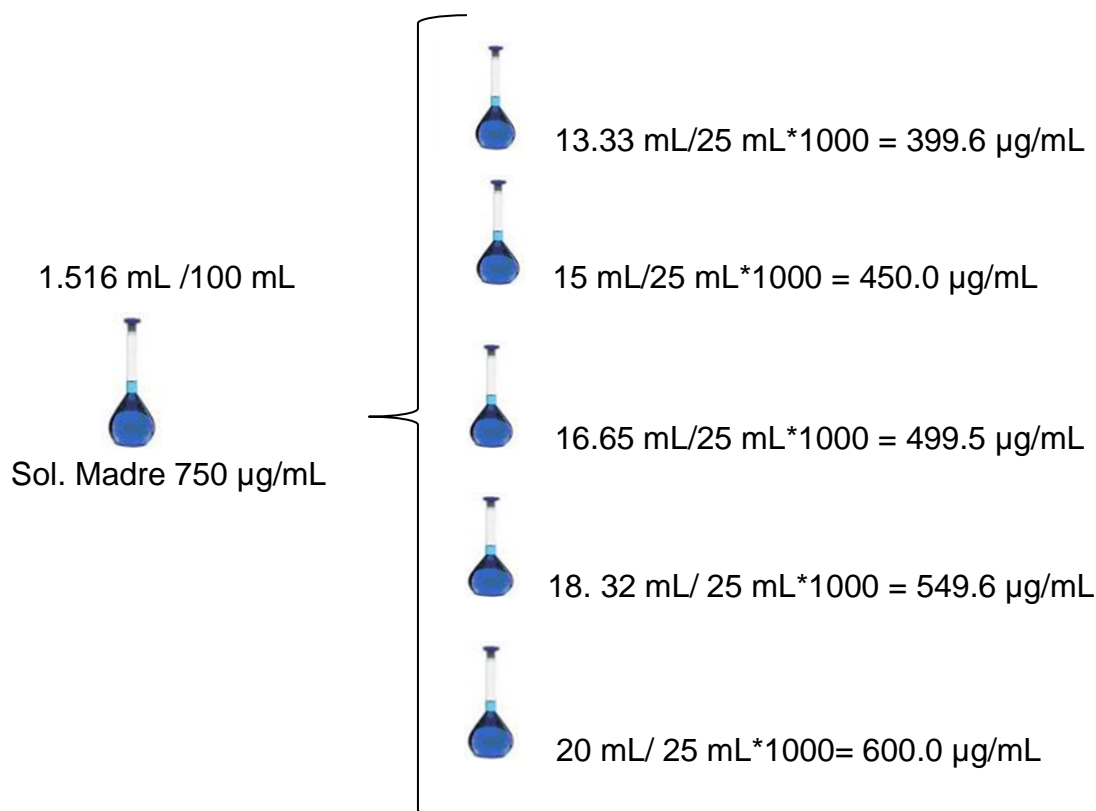
Se tomó 1.011 mL de la solución oral de carboximetilcisteína equivalente a 50 mg de carboximetilcisteína y se transfirió a un matraz de 100 mL, se disolvió con $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, homogenización de la solución con agitación manual durante 2 minutos, concentración final de 499.5 $\mu\text{g/mL}$. (Anexo V)

4.6.4.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CARBOXIMETILCISTEÍNA 50 mg/mL PARA CURVA DE CALIBRADO

Para preparar la solución muestra madre se tomó 1.516 mL de la solución oral de carboximetilcisteína 50 mg/mL y se transfirió a un matraz de 100 mL, disolviéndose en $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, teniendo una concentración final de 750 $\mu\text{g/mL}$. (Anexo V)

De la solución madre preparada anteriormente se tomaron las siguientes alícuotas para cada una de las concentraciones de la curva de calibrado: 399.6 $\mu\text{g/mL}$, 450.0 $\mu\text{g/mL}$, 499.5 $\mu\text{g/mL}$, 549.6 $\mu\text{g/mL}$ y 600.0 $\mu\text{g/mL}$ (80%, 90%, 100%, 110% y 120%); se filtraron las muestras con dispositivos para jeringa (Anexo XII) de 0.45 μm , para su lectura, cada una se analizó por triplicado.

Diagrama 4.6.4.1.1. Preparación de la curva de calibrado de la muestra de carboximetilcisteína



4.6.5 PREPARACIÓN DEL PLACEBO

Se prepararon 200 mL del placebo de carboximetilcisteína, del cual se tomó una alícuota de 1.011 mL, se transfirió a un matraz de 100 mL, se aforó con $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M se agitó manualmente por 2 minutos, obteniéndose una concentración final igual al producto terminado, posteriormente se filtra con dispositivos para jeringa de 0.45 µm.

Nota: la preparación del placebo no se describe por normas internas del laboratorio.



4.6.5.1 SOLUCIÓN PLACEBO CARGADO AL 80%

Se pesó 40.44 mg de estándar de carboximetilcisteína equivalente a 40 mg de carboximetilcisteína y se tomó con una pipeta volumétrica 0.810 mL del placebo, transfiriéndose a un matraz de 100 mL, se agregó $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, se agito mecánicamente y simultáneamente fue sometido a baño María a temperatura de 40 °C, hasta disolución completa del principio activo, se aforo y se obtuvo una concentración final de 399.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Anexo V)

4.6.5.2 SOLUCIÓN PLACEBO CARGADO AL 100%

Se pesó 50.556 mg de estándar de carboximetilcisteína equivalente a 50 mg de carboximetilcisteína y se tomó con una pipeta volumétrica 1.011 mL del placebo, transfiriéndose a un matraz de 100 mL, se agregó $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M, se agito mecánicamente y simultáneamente fue sometido a baño María a temperatura de 40 °C, hasta disolución completa del principio activo, se aforo, y se obtuvo una concentración final de 499.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Anexo V)

4.6.5.3 SOLUCIÓN PLACEBO CARGADO AL 120%

Se pesó 60.67 mg de estándar de carboximetilcisteína equivalente a 60 mg de carboximetilcisteína y se tomó con una pipeta volumétrica 1.213 mL del placebo, transfiriéndose a un matraz aforado de 100 mL, se agrega $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 M se agita mecánicamente y simultáneamente sometido a baño María a temperatura de 40 °C, hasta disolución completa del principio activo, se aforo y se obtuvo una concentración final de 600.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Anexo V)



4.6.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO CARBOXIMETILCISTEÍNA

4.6.6.1 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA IDONEIDAD DEL SISTEMA

Se evalúa la idoneidad del método analítico observando que el sistema de medición funciona apropiadamente, y que es capaz de identificar al analito de forma inequívoca sin la interferencia de otro compuesto que esté presente en la muestra también permite verificar que el sistema de medición funciona correctamente independientemente de las condiciones ambientales.

Para evaluar estadísticamente la idoneidad del sistema se prepara una solución estándar al 100 %, y se inyectan manualmente 5 μ L, realizando 10 lecturas de manera independiente y se evalúan los siguientes parámetros (tabla 4.6.6.1.1):

Tabla 4.6.6.1.1. Parámetros estadísticos para adecuación del sistema

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación	$CV \leq 2 \%$
Factor de cola	< 2
Número de platos teóricos	> 2000



4.6.6.2 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se preparan 5 soluciones a distintas concentraciones 399.6 µg/mL (80 %), 450.0 µg/mL (90 %) 499.5 µg/mL (100 %), 549.6 µg/mL (110 %) y 600.0 µg/mL (120 %) a partir de la solución madre de 750 µg/mL analizando por triplicado cada una de ellas para evaluar los siguientes parámetros estadísticos:

Tabla 4.6.6.2.1. Parámetros estadísticos para linealidad del sistema

Parámetros estadísticos	Criterios de aceptación
Coeficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2 \%$
Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.9990$
Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir al 1
Test de Student (t) para evaluar la significación estadística de la desviación está d r del intercepto (test de proporcionalidad)	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tabulado}}$
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero
Test de Student (t) para evaluar la significación estadística del estándar de la pendiente (test de linealidad)	$t_{\text{intercepto}} > t_{\text{tabulado}}$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos no debe reflejar ninguna tendencia y sus puntos deben ser aleatorios.



4.6.6.3 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión se evalúa mediante la repetibilidad, para esta se prepara una solución estándar al 100 % y se realizan 10 lecturas de la solución estándar de manera independiente.

Tabla 4.6.6.3.1. Parámetro estadístico para repetibilidad del sistema

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coefficiente de variación	$CV \leq 2 \%$

Posteriormente se determina el límite de detección y cuantificación matemáticamente según la ecuación 33 y 34.

4.6.6.4 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la especificidad del sistema se preparan 3 soluciones distintas que corresponde a la solución muestra, solución estándar y solución placebo todas ellas preparadas a la concentración del punto medio de la curva de calibrado, es decir al 100 %. Se analiza cada una de ellas por duplicado y se comparan las señales obtenidas en la muestra y el placebo con las señales obtenidas para el estándar, con el fin de demostrar que no existe interferencia de los excipientes en la determinación del principio activo.



Tabla 4.6.6.4.1. Criterio de aceptación para evaluación de especificidad del sistema

Para cada solución deben obtenerse los siguientes resultados

Solución A1 y A2 (estándar y muestra)	Identificación positiva
Solución B (placebo)	Identificación negativa

4.6.6.4.1 ESPECIFICIDAD FRENTE A EXCIPIENTES DEL SISTEMA

Se preparan tres soluciones de placebo y tres soluciones placebo cargado, se realizan lecturas por triplicado de cada solución preparada, posteriormente se compara las señales obtenidas de la solución placebo y placebo cargado con respecto al estándar. Es aceptable la respuesta cuando presente el siguiente comportamiento:

- Solución placebo no debe interferir con la señal obtenida con el estándar.
- Solución placebo cargado su señal debe coincidir con la respuesta del estándar.

4.6.6.5 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA EXACTITUD DEL SISTEMA

Para evaluar la exactitud es recomendable realizar un mínimo de 9 determinaciones a 3 niveles de concentración que representen el punto mínimo, medio y máximo (80 %, 100 %, 120 %) de la curva de calibrado. La exactitud se evalúa en base al porcentaje de recuperación para ello se trabaja con soluciones de placebo cargado aplicando el análisis de mezclas de excipientes, cada lectura se realiza por triplicado a cada nivel de concentración.



Tabla 4.6.6.5.1. Parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del sistema

Parámetro estadístico	Criterios de aceptación
% recuperación promedio	98.5 % - 101.0 %
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tab}$
Test de Student	$t_{exp} < t_{tab}$

4.7 PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CARBOXIMETILCISTEÍNA S.O 50 mg/mL

4.7.1 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se preparan 5 muestras de carboximetilcisteína 50 mg/mL a distintas concentraciones indicadas de 399.6 µg/mL, 450.0 µg/mL, 499.5 µg/mL, 549.6 µg/mL y 600.0 µg/mL (80 %,90 %,100 %,110 %, 120 %) como se describe anteriormente, se realizan lecturas por triplicado. Una vez obtenidos los datos se procesan los datos y se realiza el análisis estadístico.

**Tabla 4.7.1.1. Parámetros estadísticos para linealidad del método**

Parámetros estadísticos	Criterios de aceptación
Coeficiente de variación de los factores de respuesta	$CV \leq 2 \%$
Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.9990$
Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir a 1
Test de Student (t) para evaluar la significación estadística de la desviación estándar del intercepto (test de proporcionalidad)	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tabulado}}$
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero
Test de Student (t) para evaluar la significación estadística del estándar de la pendiente (test de linealidad)	$t_{\text{intercepto}} > t_{\text{tabulado}}$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos no debe reflejar ninguna tendencia y sus puntos deben ser aleatorios.

4.7.2 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión se evalúa mediante la repetibilidad del método realizando 10 lecturas consecutivas de una solución muestra al 100 % y evaluando la precisión intermedia realizando lecturas de soluciones muestras a 3 concentraciones distintas representando el punto mínimo, medio y máximo (80 %, 100 % y 120 %) de la curva de calibrado realizando lecturas por triplicado e interanalista e interdía.

**Tabla 4.7.2.1. Parámetro estadístico para evaluar la repetibilidad del método**

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación	$CV \leq 2 \%$

Tabla 4.7.2.2. Parámetros estadísticos para evaluar precisión intermedia del método

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación global	$CV \leq 2$
Análisis de varianza test de Fisher	$F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$
Número de platos teóricos	> 2000

4.7.3 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA EXACTITUD DEL MÉTODO

Para evaluar la exactitud es recomendable realizar un mínimo de 9 determinaciones a 3 niveles de concentración que representan el punto mínimo, medio y máximo (80 %, 100 %, 120 %) de la curva de calibrado. La exactitud se evalúa en base al porcentaje de recuperación, cada lectura se realiza por triplicado a cada nivel de concentración.

Tabla 4.7.3.1. Parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del método

Parámetro estadístico	Criterios de aceptación
% recuperación promedio	98.5 % - 101.0 %
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
Test de Student	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$



4.7.4 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Se evalúa la robustez del método realizando modificaciones en las condiciones de trabajo establecidas

Tabla 4.7.4.1. Condiciones de trabajo para la evaluación estadística de robustez del método

Condiciones normales de trabajo	Modificaciones
Flujo 0.5 mL/min	Cambio de flujo: 0.5 mL/min a 0.4 mL/min 0.5 mL/min a 0.6 mL/min
Longitud de onda 210 nm	Cambio de longitud: 210 nm a 208 nm 210 nm a 212 nm
Fase móvil: Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M y Metanol (95:5)	Cambio de proporciones de fase móvil: Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M y Metanol (90:10)

Tabla 4.7.4.2. Parámetros estadísticos para evaluar la robustez del método

Parámetros estadísticos	Criterio de aceptación
Coeficiente de variación para cada condición	$CV \leq 2\%$
Factor de capacidad (K')	> 1
Numero de platos teóricos (N)	> 2000
Factor de cola	< 2



4.8 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES

Reactivos

Nº	Nombres	Fórmula Química	Marca	Grado	Lote	Procedencia	Fecha de vencimiento
1	Agua Destilada	H ₂ O	-	-	-	Laboratorios Solka S.A.	-
2	Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	Scharlab S.L.	CLAR	G34523	Productos el Sol	4 / 2016
3	Metanol	CH ₄ O	Fisher Scientific	CLAR	147456	Productos el Sol	8 / 2016

Equipos

Nº	Nombres	Marca	Modelo	Nº Serie	Muestra de verificación de calibración
1	pH-metro	Cole-Parmer	6201	001049	25-05-2016
2	Bomba al vacío	Value	V-i220SV	394494	-
3	Balanza Analítica	Kern	ACS 220-4	WB0900280	10-12-2015
4	Cromatógrafo Líquido de alta resolución	YL Clarity	YL 9100	9110	07-07-2015
5	Computadora	BenQ	VL2040	P621206	-
6	Agitador magnético y cocina	Ikamag Reo	LM-420D	130304	-
7	Conductímetro	Oakton	473621	180020	-



Materiales

Cantidad	Materiales	Capacidad	Marca	Clase / Tolerancia
3	Matraz aforado	1000 mL	Pyrex	A / \pm 0.400 mL
2	Matraz aforado	500 mL	Duran	A / \pm 0.2 mL
1	Matraz aforado	200 mL	Kimax	A / \pm 0.10 mL
4	Matraz aforado	100 mL	Kimax	A / \pm 0.10 mL
2	Matraz aforado	50 mL	Pyrex	A / \pm 0.060 mL
4	Matraz aforado	25 mL	Duran	A / \pm 0.040 mL
1	Beaker	250 mL	Pyrex	A
1	Beaker	100 mL	Pyrex	A
1	Beaker	50 mL	Pyrex	A
1	Pipeta volumétrica	20 mL	Fisherbrand	A / 0.03 mL
1	Micropipeta	20 μ L	Thermo Scientific	F1
1	Micropipeta	1000 μ L	Thermo Scientific	F1
1	Probeta	100 mL	Duran Germany	A / 0.5 mL
1	Calculadora científica	-	Casio fx-82 MS	-
1	Columna C18	150 mm x 4 mm	Knauf	-
2	Espátula de acero inoxidable	-	Fisherbrand	-
1	Termómetro (-20 ^o C + 110 ^o C)	-	Fisherbrand	-

CAPÍTULO V
ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE
RESULTADOS



5.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

5.1.1 TÉCNICA CROMATOGRÁFICA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) CON BOMBA BINARIA

Los parámetros se evalúan bajo un nivel de confianza del 95%.

5.1.2 ADECUACIÓN DE SISTEMA

Para la evaluación de la adecuación del sistema, se preparó una solución al 100% y se realizaron 10 lecturas a 210nm, con un tiempo de retención de 2.59 minutos para la muestra de carboximetilcisteína. Los ensayos realizados para demostrar la adecuación del sistema cumplen con las especificaciones para la cual se ha desarrollado y validado dicha técnica de análisis.

En la tabla 5.1.2.1. Se demuestra que el sistema cumple con los parámetros establecidos, ya que los cromatogramas presentan un coeficiente de variación menor al 2%, la eficiencia de la columna supera los 2000 platos teóricos establecidos, el factor de cola para el pico de analito no es mayor de 2 y la desviación estándar para inyecciones repetitivas no excede el 2%.



Tabla 5.1.2.1. Tratamiento estadístico de adecuación del sistema

Concentración µg/mL %	Tiempo de Retención (T_R)	Área (mV.s)*	Altura (mV)*	Número de Platos Teóricos (N)	Factor de Cola (B/A)*
499.5 µg/mL 100 %	2.5900	2825.6020	288.8060	4245.4650	0.3537
499.5µg/mL 100 %	2.5930	2825.4620	288.7850	4309.3408	0.3630
499.5µg/mL 100 %	2.6000	2824.5210	288.6610	4278.3118	0.3628
499.5µg/mL 100 %	2.5990	2824.3310	288.3930	4329.3068	0.3620
499.5µg/mL 100 %	2.5970	2823.6650	288.0830	4268.4444	0.3625
499.5µg/mL 100 %	2.5980	2823.3020	288.0780	4218.5025	0.3634
499.5µg/mL 100 %	2.5960	2823.0890	288.0280	4265.1579	0.3632
499.5µg/mL 100 %	2.5900	2822.5500	288.0150	4299.3751	0.3664
499.5µg/mL 100 %	2.6000	2821.1270	287.9650	4278.3118	0.3652
499.5µg/mL 100 %	2.5950	2821.0380	287.8820	4261.8726	0.3659
Promedio	2.5958	2823.4687	288.2696	4275.4089	0.3628
Desviación estándar (S)	0.0038	1.5924	0.3589	31.8318	0.0036
Coefficiente de variación (CV%)	0.1451	0.0564	0.1245	0.7445	0.9786

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: VerAnexo III



5.1.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad se prepararon 5 soluciones estándares con concentraciones de 399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %), 450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90%), 499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100%), 549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110%), 600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120%), se realizaron lecturas por triplicado de cada solución a la longitud establecida de 210nm, obteniéndose los siguientes resultados que se observan en la tabla 5.1.3.2., para verificar los datos se procedió a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r), para el cual se utilizaron las ecuaciones 13, 14, 15 y 16, (Ver Anexo IV).



Tabla 5.1.3.1. Evaluación de la curva de calibrado del sistema

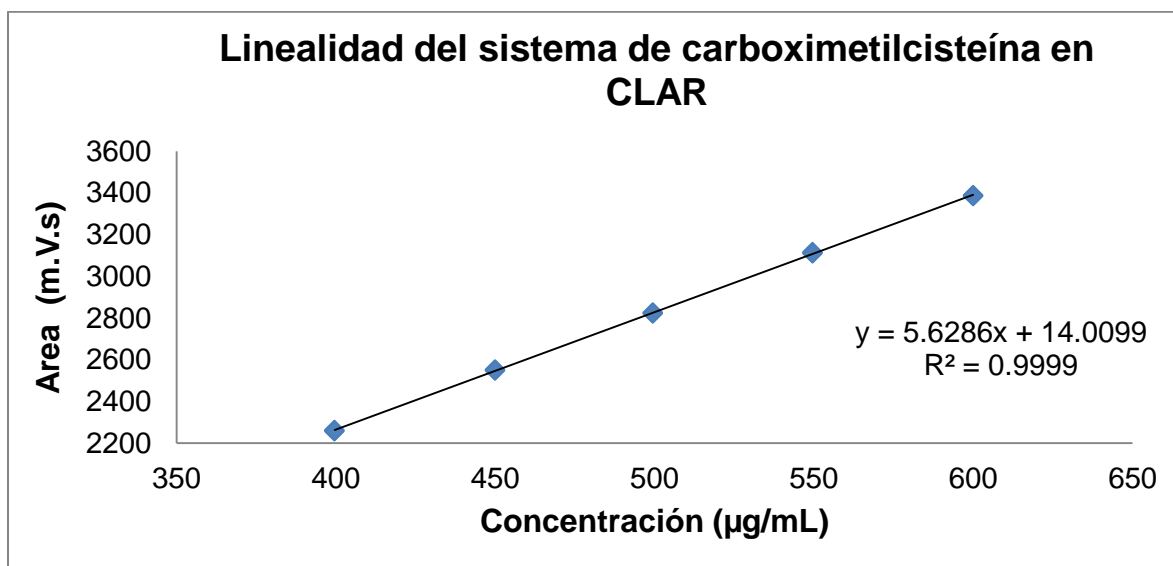
Nº de muestras	Concentración $\mu\text{g/mL}$ (%)	Área (mV.s)*	Platos teóricos (N)	Tiempo de retención (T_R)	Factor de capacidad (K')	Factor de cola (B/A)*
1	399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2262.7260	4302.6957	2.5910	1.1592	0.3695
2	399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2259.8900	4335.9724	2.6010	1.1496	0.3838
3	399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2257.4230	4212.0100	2.5960	1.1455	0.3924
4	450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2552.5420	4242.1873	2.5890	1.1611	0.3369
5	450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2549.9920	4228.2506	2.6010	1.1496	0.3404
6	450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2548.5880	4322.6464	2.5970	1.1642	0.3518
7	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2825.4570	4271.7323	2.5980	1.1471	0.3623
8	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2824.1050	4315.9910	2.5950	1.1535	0.3627
9	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2821.6400	4238.9108	2.5880	1.1513	0.3626
10	549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3115.8970	4286.1054	2.5860	1.1568	0.3449
11	549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3113.4660	4312.6653	2.5940	1.1527	0.3520
12	549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3110.1870	4261.8726	2.5950	1.1625	0.3564
13	600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3389.9700	4231.5025	2.6020	1.1683	0.3245
14	600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3386.4130	4325.9760	2.5980	1.1507	0.3303
15	600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3384.2590	4252.0242	2.5920	1.1510	0.3293
Pendiente (b)		5.6286				
Intercepto(a)		14.0099				
Coefficiente de Correlación (r)		0.9999				
Coefficiente de Determinación (r^2)		0.9999				

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: VerAnexo III



Gráfico 5.1.3.2.1. Curva de calibrado para la linealidad del sistema



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

5.1.4 ECUACIÓN DE LA RECTA DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se utilizó el método de mínimos cuadrados, que consiste en ajustar “b”, “x” y “a” para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Skoog, D., West, D., Holl, F., & Crouch, S, 2003, p. 37-60)

Los resultados obtenidos del análisis de los mínimos cuadrados se observan en la tabla 5.1.4.1.



Tabla 5.1.4.1. Análisis de mínimos cuadrados de la linealidad del sistema en CLAR

Concentración µg/mL (%) (<i>x_i</i>)	Área (mV.s)*(<i>y_i</i>)	<i>x_i</i> - \bar{x}	(<i>x_i</i> - \bar{x}) ²	<i>y_i</i> - \bar{y}	(<i>y_i</i> - \bar{y}) ²	(<i>x_i</i> - \bar{x})(<i>y_i</i> - \bar{y})	$\sum x_i^2$ *	$\hat{y} = b * x + a *$	<i>e_i</i> = (\hat{y} - <i>y_i</i>) residuales
399.6 µg/mL (80 %)	2262.7260	-100.1400	10028.0196	-564.1110	318221.2203	56490.0755	159680.1600	2263.1909	0.4649
399.6 µg/mL (80 %)	2259.8900	-100.1400	10028.0196	-566.9470	321428.9008	56774.0726	159680.1600	2263.1909	3.3009
399.6 µg/mL (80 %)	2257.4230	-100.1400	10028.0196	-569.4140	324232.3034	57021.1180	159680.1600	2263.1909	5.7679
450.0 µg/mL (90 %)	2552.5420	-49.7400	2474.0676	-274.2950	75237.7470	13643.4333	202500.0000	2546.8714	-5.6706
450.0 µg/mL (90 %)	2549.9920	-49.7400	2474.0676	-276.8450	76643.1540	13770.2703	202500.0000	2546.8714	-3.1206
450.0 µg/mL (90 %)	2548.5880	-49.7400	2474.0676	-278.2490	77422.5060	13840.1053	202500.0000	2546.8714	-1.7166
499.5 µg/mL (100 %)	2825.4570	-0.2400	0.0576	-1.3800	1.9044	0.3312	249500.2500	2825.4861	0.0291
499.5 µg/mL (100 %)	2824.1050	-0.2400	0.0576	-2.7320	7.4638	0.6557	249500.2500	2825.4861	1.3811
499.5 µg/mL (100 %)	2821.6400	-0.2400	0.0576	-5.1970	27.0088	1.2473	249500.2500	2825.4861	3.8461
549.6 µg/mL (110 %)	3115.8970	49.8600	2486.0196	289.0600	83555.6836	14412.5316	302060.1600	3107.4781	-8.4189
549.6 µg/mL (110 %)	3113.4660	49.8600	2486.0196	286.6290	82156.1836	14291.3219	302060.1600	3107.4781	-5.9879
549.6 µg/mL (110 %)	3110.1870	49.8600	2486.0196	283.3500	80287.2225	14127.8310	302060.1600	3107.4781	-2.7089
600.0 µg/mL (120 %)	3389.9700	100.2600	10052.0676	563.1330	317118.7757	56459.7146	360000.0000	3391.1585	1.1885
600.0 µg/mL (120 %)	3386.4130	100.2600	10052.0676	559.5760	313125.2998	56103.0898	360000.0000	3391.1585	4.7455
600.0 µg/mL (120 %)	3384.2590	100.2600	10052.0676	557.4220	310719.2861	55887.1297	360000.0000	3391.1585	6.8995
$\bar{x} = 499.7400$	2826.8370	0.0000	5008.0464	0.0000	158678.9773	28188.1952	254748.1140	2826.8370	
$\sum = 7496.1000$	42402.5550	0.0000	75120.6960	0.0000	2380184.6599	422822.9277	3821221.7100	42402.5550	

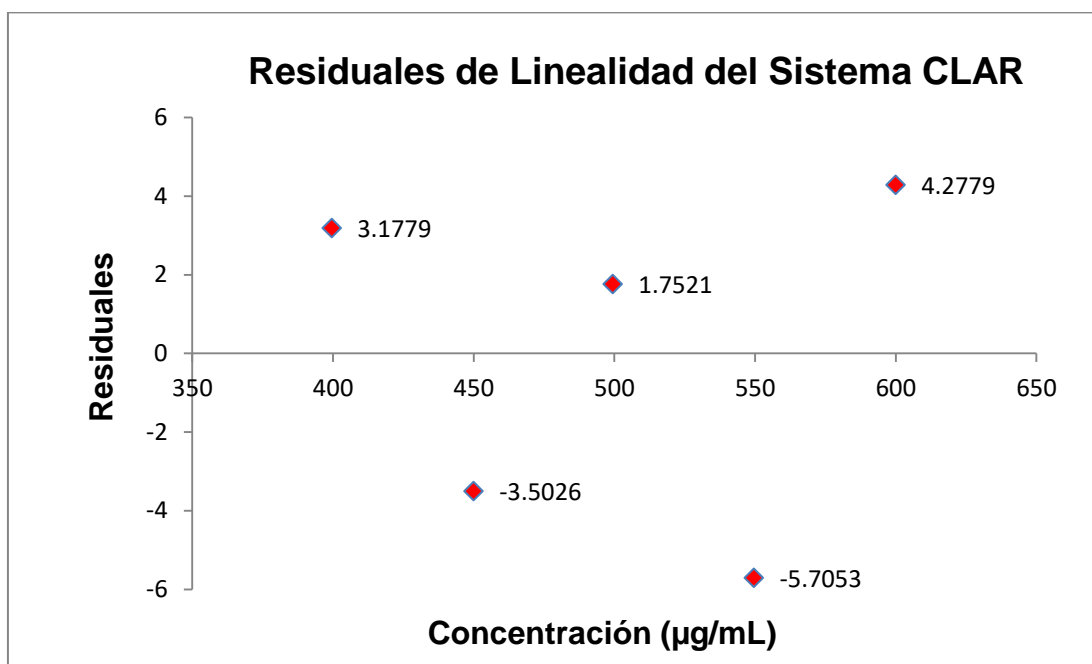
Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



El análisis de los residuales de la linealidad del sistema CLAR, presenta una distribución aleatoria y no refleja tendencias como se observa en el gráfico 5.1.4.1.1, demostrándose la ausencia de error sistemático y por lo tanto el sistema es válido.

Gráfico 5.1.4.1.1. Análisis residual de la linealidad del sistema



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Cálculos para análisis estadístico de la linealidad del sistema:

Pendiente (b)

$$S_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2 = 75120.6960$$

$$S_{xy} = \sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 422822.9277$$

Dónde:

S_{xx} : Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de x.



S_{xy} : Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de x e y.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$b = 422822.9277 / 75120.6960 = 5.62858 \approx 5.6286$$

Intercepto (a)

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = 42402.5550 / 15 = 2826.8370$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = 7496.1000 / 15 = 499.74$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$a = 2826.8370 - 5.62858 (499.7400) = 14.0099$$

Coefficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$$r = 0.9999$$

Coefficiente de determinación (r)²

$$r^2 \equiv (r)^2 \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$r^2 = (0.9999)^2 = 0.9998$$

Análisis de los mínimos cuadrados del sistema:

- 1) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de x:

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 75120.6960$$

Dónde:

x_i = pares de datos individuales de x.

\bar{x} = valor medio o promedio de la variable (x)



2) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de y:

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 18})$$

$$s_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 2380184.6599$$

Dónde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de la variable (y)

3) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de x e y:

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$s_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 422822.9277$$

Dónde:

y_i = pares de datos individuales de y.

\bar{y} = valor medio o promedio de la variable (y)

5.1.5 TEST DE LINEALIDAD DEL SISTEMA: TEST DE STUDENT PARA LA PENDIENTE (b) EN CLAR

El test de linealidad se realiza con objetivo de demostrar que existe una pendiente significativa distinta de cero, se utiliza el test de Student con un grado de significación igual 95 %, con el que se demuestra que los intervalos de confianza no incluyen el cero. Para determinar el t_{exp} de dos colas, para n-2 grados de libertad igual a 13 con un nivel de confianza del 95% con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.95, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución t Student es 2.160.

Para esta prueba debe cumplirse el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$; hipótesis:



$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

Para calcular el t_{exp} se utilizó la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 20})$$

Para encontrar el t_{exp} es necesario calcular la desviación estándar de la regresión (S_r) para obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Cálculo de la desviación estándar de la regresión (S_r) del sistema:

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{2380184.6599 - (5.6286)^2(75120.6990)}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{2380184.66 - 2379909.2290}{15 - 2}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{275.4313}{13}} = \sqrt{21.1870} = 4.6029$$

Cálculo de la desviación estándar de la pendiente (S_b) del sistema

Debe de cumplir el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$:

Hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

$$S_b = \sqrt{\frac{S_r^2}{S_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$S_b = \sqrt{\frac{(4.6029)^2}{75120.6960}} = \sqrt{2.82 \times 10^{-4}} = 0.0167$$

Se obtiene un t_{exp} :



$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{|5.6286|}{0.0167} = 335.1548$$

Dónde:

$|b|$ = Valor absoluto de la pendiente

S_b = Desviación estándar de la pendiente.

Se obtiene un $t_{exp} > t_{tab}$ comprobando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero siendo: $335.1548 > 2.160$, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (H_1) el intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student: $b \pm t * S_b$

$$\begin{aligned} b \pm t * S_b &= 5.6286 \pm 2.160 * 0.0167 \\ &= 5.6286 \pm 0.0360 \\ &= [5.5926 \text{ a } 5.6646] \end{aligned}$$

5.1.6 TEST DE PROPORCIONALIDAD DEL SISTEMA: TEST DE STUDENT PARA EL INTERCEPTO (a) EN CLAR

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de las coordenadas, determinando si la variable independiente (x) es significativa a cero. Para evaluar este test de proporcionalidad se recurre a una prueba mediante el test de Student como en el caso anterior.

Para esta prueba debe cumplirse el siguiente criterio de aceptación en el cual el $t_{exp} < t_{tab}$; hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

Para calcular el t_{exp} se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} \quad \text{(Ecuación 23)}$$

Dónde:

$|a|$ = Valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto



Para encontrar el t_{exp} para el intercepto es necesario calcular la desviación estándar de la regresión $S_r = 4.6029$ y la desviación estándar de la pendiente (S_b).

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$S_a = 4.6029 * \sqrt{\frac{1}{15 - (7496.1000)^2 / 3821221.7100}}$$

$$S_a = 4.6029 * \sqrt{\frac{1}{15 - 14.7051}} = 4.6029 * \sqrt{\frac{1}{0.2948}}$$

$$S_a = 4.6029 * \sqrt{3.3911} = 4.6029 * 1.8415 = 8.4763$$

Se obtiene un t_{exp} :

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{|14.0099|}{8.4763} = 1.6528$$

Se obtuvo un $t_{exp} < t_{tab}$ comprobando estadísticamente que existe una variable x diferente de cero siendo: $1.6528 < 2.160$, y que la recta pasa por el origen de las coordenadas, y el intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student: $a \pm t * S_a$

$$a \pm t * S_a = 14.0099 \pm 2.160 * 8.4763$$

$$14.0099 \pm 18.3088$$

$$[-4.2989 \text{ a } 32.3187]$$

5.1.7 TEST DE COCHRAN PARA EL SISTEMA

El test de Cochran se emplea con el objetivo de demostrar que las variaciones de las concentraciones son homogéneas, por lo tanto, el $G_{exp} < G_{tab}$. El valor crítico de Cochran se determina $C = (K, v, \alpha)$



Dónde:

K = es el número de datos o número de réplicas

U =grados de libertad definido como $n_{\max}-1$, donde n_{\max} es el mayor de los tamaños de las muestras.

α = nivel de significancia 0.05



Tabla 5.1.7.1. Test de Cochran para el análisis de varianza de los factores de respuesta del sistema en CLAR

Concentración $\mu\text{g/mL}$ (%)	Área (mV.s)*	Factor de Respuesta $F=y/x$	Promedio de $F=y/x$	Desviación Estándar(S) de $F=y/x$	Varianza (S^2) de $F=y/x$
399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2262.7260	5.6625	5.6557	0.0066	4.40×10^{-05}
399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2259.8900	5.6554			
399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %)	2257.4230	5.6492			
450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2552.5420	5.6723	5.6675	0.0045	1.98×10^{-05}
450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2549.9920	5.6666			
450.0 $\mu\text{g/mL}$ (90 %)	2548.5880	5.6635			
499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2825.4570	5.6566	5.6531	0.0039	1.50×10^{-05}
499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2824.1050	5.6539			
499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2821.6400	5.6489			
549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3115.8970	5.6694	5.6645	0.0052	2.71×10^{-05}
549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3113.4660	5.6650			
549.6 $\mu\text{g/mL}$ (110 %)	3110.1870	5.6590			
600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3389.9700	5.6500	5.6448	0.0048	2.31×10^{-05}
600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3386.4130	5.6440			
600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %)	3384.2590	5.6404			
Promedio (\bar{x})			5.6571	$\Sigma S_i^2 = 0.0001$	
Desviación Estándar (S)			0.0091		
Coefficiente de Variación (CV%)			0.1609		

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: VerAnexo III

La hipótesis es:

$$H_0 = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

El valor de G_{exp} se calcula con la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ Máxima}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Dónde:

S^2 Máxima: varianza máxima de los grupos.

$\sum S_i^2$: Sumatoria de las varianzas de cada grupo.

Se calculó el valor de G_{exp} :

$$G_{exp} = \frac{4.40 \times 10^{-5}}{0.0001} = 0.4400$$

Al realizar la comparación del valor experimental con el valor crítico se obtiene que el $G_{exp} 0.4400 < G_{tab} 0.841$, cumpliendo la hipótesis nula donde se comprueba que x o el factor de respuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados, el valor crítico se calcula determinando el valor de: $\alpha = 0.05$, $K = 5$ y $n = 2$.



5.1.7.1 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA PARA EL SISTEMA

El factor de respuesta expresa la relación de la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad del calibrado (AEFI2001, p. 68-94). Los valores recomendables son los inferiores al 2 % para demostrar la linealidad, para calcular el coeficiente de variación se aplicó la siguiente fórmula:

$$CV \% = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 26})$$

Según la tabla 5.1.7.1 del Test de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR, el valor que se obtiene para el coeficiente de variación es: $0.1609 < 2 \%$ demostrando la adecuada linealidad del sistema.

5.1.8 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL SISTEMA EN CLAR

Para realizar el análisis de varianza es necesario cumplir con la: homogeneidad de las varianzas y normalidad de los residuales. Según la AEFI 2001, el análisis de la varianza se fundamenta en la suma de los cuadrados totales (tabla 5.1.8.1) la cual se descompone como la suma de los cuadrados residuales y la regresión:

$$SCT = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 27})$$



Tabla 5.1.8.1. Análisis de varianza del sistema en CLAR

Concentración µg/mL (%)	Área (mV.s)*	Análisis Residual			Análisis de Regresión	
		$\hat{y} = b * x + a *$	$yi - \hat{y}$	$(yi - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
399.6 µg/mL (80 %)	2262.7260	2263.1985	-0.4725	0.2232	-563.6385	317688.4099
399.6 µg/mL (80 %)	2259.8900	2263.1985	-3.3085	10.9459	-563.6385	317688.4099
399.6 µg/mL (80 %)	2257.4230	2263.1985	-5.7755	33.3559	-563.6385	317688.4099
450.0 µg/mL (90 %)	2552.5420	2546.8799	5.6621	32.0594	-279.9571	78375.9809
450.0 µg/mL (90 %)	2549.9920	2546.8799	3.1121	9.6852	-279.9571	78375.9809
450.0 µg/mL (90 %)	2548.5880	2546.8799	1.7081	2.9176	-279.9571	78375.9809
499.5 µg/mL (100 %)	2825.4570	2825.4956	-0.0386	0.0015	-1.3414	1.7994
499.5 µg/mL (100 %)	2824.1050	2825.4956	-1.3906	1.9338	-1.3414	1.7994
499.5 µg/mL (100 %)	2821.6400	2825.4956	-3.8556	14.8656	-1.3414	1.7994
549.6 µg/mL (110 %)	3115.8970	3107.4885	8.4085	70.7036	280.6515	78765.2389
549.6 µg/mL (110 %)	3113.4660	3107.4885	5.9775	35.7310	280.6515	78765.2389
549.6 µg/mL (110 %)	3110.1870	3107.4885	2.6985	7.2821	280.6515	78765.2389
600.0 µg/mL (120 %)	3389.9700	3391.1699	-1.1999	1.4397	564.3329	318471.6159
600.0 µg/mL (120 %)	3386.4130	3391.1699	-4.7569	22.6280	564.3329	318471.6159
600.0 µg/mL (120 %)	3384.2590	3391.1699	-6.9109	47.7605	564.3329	318471.6159
Promedio (\bar{x})	2826.8370	SC_{RES} = 291.5332			SC_{REG} = 2379909.1350	

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

* : VerAnexo III



La AEFI 2001, refleja que la ecuación aplicada para el cálculo de la varianza residual ($S_{y,x}^2$) se determina a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

$$V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2} \quad (\text{Ecuación 28})$$

Cálculo de la varianza residual (V_{RES}) del sistema:

$$V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{291.5332}{13} = 22.4256$$

$$SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$$

$$SCT = 291.5332 + 2379909.1350$$

$$SCT = 2380200.668$$

Cálculo de la varianza residual del sistema:

$$V_{REG} = S_{y^*}^2 = \frac{\sum(\hat{y}^* - \bar{y})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 29})$$

$$V_{REG} = S_{y^*}^2 = \frac{2379909.1350}{15} = 158660.609$$

Realizados una vez los cálculos de las varianzas y de los residuales se calcula el valor de Fisher, donde el $F_{exp} > F_{tab}$ el cual prueba estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero. La hipótesis plantea que:

$$H_0: F_{exp} > F_{tab}$$

$$H_1: F_{exp} < F_{tab}$$

Para calcular el F_{exp} se aplica la siguiente fórmula:

$$F_{exp} = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad (\text{Ecuación 30})$$

$$F_{exp} = \frac{158660.609}{22.4256} = 7074.9772$$

Por lo tanto, $F_{exp} = 7074.9772 > F_{tab}(0.05, 1, n-2) = 4.666$, cumpliendo el criterio de aceptación $H_0: F_{exp} > F_{tab}$ demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero,



Se valida la linealidad del sistema, realizando diferentes pruebas y test estadísticos como: el análisis de mínimos cuadrados para el ajuste de la curva de calibrado, obteniendo valores para la pendiente y el intercepto con sus respectivas desviaciones estándar, demostrando diferencia significativa mediante el uso del test de Student.

También se recurre al test de Cochran para demostrar la homogeneidad de la varianza, se evalúan los residuales y se determina estadísticamente que existe independencia y una distribución normal, demostrando que la relación concentración y área es lineal.

5.1.9 PRECISIÓN DEL SISTEMA EN CLAR

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más o menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo (AEFI 2001, p. 68-94). Para evaluar la precisión de sistema se trabaja con muestras estándar al 100 %, mediante la repetibilidad y la precisión intermedia del sistema. La precisión de un método analítico se expresa mediante el coeficiente de variación de una serie de medidas.

El estudio de repetibilidad se realiza mediante la evaluación de 10 determinaciones con concentraciones de trabajo al 100 %, se determinan los valores medios, la desviación estándar y los coeficientes de variación en función al factor de respuesta. La guía ICH recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión.



Tabla 5.1.9.1. Evaluación de la repetibilidad del sistema en CLAR

Número de lecturas	Concentración $\mu\text{g/mL}$ %	Área (mV.s)*	Factor de Respuesta F(Y/X)	Datos del factor de respuesta		Tiempo de Retención (T_R)	Número de platos teóricos (N)
				Media	Desviación Estándar(S)		
1	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2825.6110	5.6569	5.6522	0.0028	2.6040	4291.4859
2	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2825.1130	5.6559			2.5880	4186.0900
3	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2824.3230	5.6543			2.6020	4339.3072
4	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2823.9870	5.6536			2.5870	4235.6356
5	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2823.1340	5.6519			2.6030	4342.6432
6	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2822.9360	5.6515			2.6040	4238.0100
7	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2822.4280	5.6505			2.5850	4229.0890
8	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2822.0890	5.6498			2.5910	4248.7440
9	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2821.8060	5.6493			2.5990	4221.7506
10	449.5 $\mu\text{g/mL}$ 100 %	2821.5590	5.6488			2.5890	4296.0558
Coefficiente de variación (CV%)			0.0495				

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

* : VerAnexo III



5.1.9.1 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA EN CLAR

Se obtienen los siguientes datos, a partir de los valores a los cuales se les realiza la evaluación estadística para la repetibilidad:

Media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 31})$$

$$\bar{x} = 5.6522$$

Desviación estándar (S):

La repetibilidad como parte de evaluación estadística de la precisión al determinar su desviación estándar se obtiene un valor de 0.0141 indicando que no existe diferencia significativa.

$$S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 32})$$

$$S = 0.0028$$

Coefficiente de variación (CV %):

El coeficiente de variación para el análisis estadístico no debe excederse del 2% que es el criterio de aceptación, el objetivo de calcular S es proporcionar información de la relación existente que hay ante la desviación de la muestra y la media. Para calcular el CV % se utiliza la ecuación 26.

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

$$CV = 0.0495 \%$$

Límite de detección (LOD)

Es la concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, se calcula con la siguiente fórmula:

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{b} \quad (\text{Ecuación 33})$$



Dónde:

σ : Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra.

b: Es la pendiente de la curva de calibración para linealidad.

Cálculo del LOD:

$$\text{LOD} = \frac{3.3(0.0028)}{5.6286} = 1.64 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$$

Límite de cuantificación (LOQ)

Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{b} \quad (\text{Ecuación 34})$$

Dónde:

σ : Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra.

b: Es la pendiente de la curva de calibración para linealidad

Cálculo del LOQ:

$$\text{LOQ} = \frac{10 (0.0028)}{5.6286} = 4.97 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$$

5.1.10 EXACTITUD DEL SISTEMA EN CLAR

La exactitud se evalúa a 3 niveles de concentración 399.6 $\mu\text{g/mL}$ (80 %), 499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %) y 600.0 $\mu\text{g/mL}$ (120 %), mediante muestras de placebo cargado con estándar de trabajo de carboximetilcisteína, los cuales corresponden al punto mínimo, medio y máximo de la curva de calibrado.



Tabla 5.1.10.1. Evaluación estadística de la exactitud del sistema en CLAR

Número de lecturas	Concentración µg/mL %	Área (mV.s)*	Factor de Respuesta F=Y/X	Promedio F=Y/X	Desviación Estándar F=Y/X	Varianza (S ²) F=Y/X
1	399.6µg/mL 80 %	2260.6310	5.6572	5.6516	0.0050	2.51x10 ⁻⁰⁵
2	399.6 µg/mL 80 %	2257.7900	5.6501			
3	399.6 µg/mL 80 %	2256.7660	5.6476			
4	499.5 µg/mL 100 %	2825.0310	5.6557	5.6534	0.0026	6.83x10 ⁻⁰⁶
5	499.5 µg/mL 100	2824.1130	5.6539			
6	499.5 µg/mL 100	2822.4560	5.6506			
7	600.0 µg/mL 120 %	3389.6130	5.6494	5.6457	0.0037	1.38x10 ⁻⁰⁵
8	600.0 µg/mL 120 %	3387.4030	5.6457			
9	600.0 µg/mL 120 %	3385.1590	5.6419			
Promedio			5.6502	ΣS² = 0.00005		
Desviación Estándar (S)			0.0049			
Coefficiente de Variación (CV%)			0.0863			

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: VerAnexo III



5.1.10.1 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA EXACTITUD DEL SISTEMA

Se determina la media y la desviación estándar aplicando la ecuación 18 y 19 respectivamente:

Media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = 5.6502$$

Desviación estándar (S):

$$S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} = 0.0049$$

Test de proporcionalidad de Cochran:

Se debe de cumplir que:

$$G_{exp} < G_{tab}$$

Se determina el G_{exp} haciendo uso de la ecuación 12:

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ Máxima}}{\sum S_i^2} = \frac{2.51 \times 10^{-5}}{0.00005} = 0.5020$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05\%$ a 3 niveles de concentración ($k = 3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966. Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtiene un $G_{exp} 0.5020 < G_{tab} 0.966$, por lo tanto se cumple con el criterio de aceptación donde se comprueba que X o factor de respuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados.



Tabla 5.1.10.1.1. Evaluación de la exactitud del sistema aplicando el test de Cochran para porcentaje de recuperación

Nº de lecturas	Concentración µg/mL %	% Recuperación	Promedio % de Recuperación	S	Si ²
1	499.5 µg/mL 100 %	100.0157	99.9903	0.0222	0.0005
2	499.5 µg/mL 100 %	99.9746			
3	499.5 µg/mL 100 %	99.9807			
4	499.5 µg/mL 100 %	100.0112	99.9880	0.0202	0.0004
5	499.5 µg/mL 100 %	99.9744			
6	499.5 µg/mL 100 %	99.9785			
7	499.5 µg/mL 100 %	100.0140	100.0013	0.0129	0.0002
8	499.5 µg/mL 100 %	99.9883			
9	499.5 µg/mL 100 %	100.0017			
Promedio (\bar{X})		99.9932	$\Sigma Si^2 = 0.0011$		
Desviación Estándar (S)		0.0174			
Coefficiente de variación (CV%)		0.0174			

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad del método: test de Cochran

Debe de cumplir con el $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\Sigma S_i^2} = \frac{0.0005}{0.0011} = 0.4545$$



Al comparar el valor experimental con el valor tabulado se cumple la hipótesis nula que el $G_{exp} 0.4545 < G_{tab} 0.996$, comprobando que el factor de respuesta no tiene influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Test de Student

Como criterio de aceptación para el test de Student debe cumplir que el $t_{exp} < t_{tab}$, el valor crítico tabulado para n-1 grados de libertad y 95 % de confianza el $t_{tab} = 4.303$.

Para calcular el valor experimental se aplica la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{x}| * \sqrt{n}}{CV\%} \quad \text{(Ecuación 35)}$$

Dónde:

\bar{x} = Media del porcentaje de recuperación

CV = Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación

n = número de muestras 3

$$t_{exp} = \frac{|100 - 99.9932| * \sqrt{3}}{0.0174} = \frac{0.0068 * 1.7320}{0.0174} = 0.6768$$



5.1.11 LINEALIDAD DEL MÉTODO (CARBOXIMETILCISTEÍNA)

Para determinar la linealidad se realizan 5 soluciones muestras a distintas concentraciones como se menciona en el inciso 5.2.4.1. Se realizan análisis por triplicado para cada solución a una longitud de onda de 210 nm y los resultados obtenidos se presentan a continuación en la tabla 5.1.11.1.:

Tabla 5.1.11.1. Evaluación de la linealidad del método de carboximetilcisteína 50 mg/mL en CLAR

Concentración µg/mL (%)	Área (mV.s)*	Factor de Respuesta F=Y/X	Promedio	Desviación Estándar	Varianza	Varianza Máxima	G _{EXP}
399.6 µg/mL (80 %)	2249.9990	5.6306	5.6219	0.0080	6.39 x 10 ⁻⁵	0.0001	0.4060
399.6 µg/mL (80 %)	2245.8340	5.6202					
399.6 µg/mL (80 %)	2243.7160	5.6149					
450.0 µg/mL (90 %)	2537.5690	5.6390	5.6315	0.0084	7.02x 10 ⁻⁵		
450.0 µg/mL (90 %)	2534.8410	5.6330					
450.0 µg/mL (90 %)	2530.1120	5.6225					
499.5 µg/mL (100 %)	2819.7170	5.6451	5.6403	0.0045	2.04 x 10 ⁻⁵		
499.5 µg/mL (100 %)	2817.0970	5.6398					
499.5 µg/mL (100 %)	2815.2170	5.6361					
549.6 µg/mL (110 %)	3103.8110	5.6474	5.6441	0.0034	1.12 x 10 ⁻⁵		
549.6 µg/mL (110 %)	3102.0990	5.6443					
549.6 µg/mL (110 %)	3100.1250	5.6407					
600.0 µg/mL (120 %)	3379.1250	5.6319	5.6289	0.0027	7.12 x 10 ⁻⁶		
600.0 µg/mL (120 %)	3376.9550	5.6283					
600.0 µg/mL (120 %)	3375.9990	5.6267					
Variabilidad o Parámetros Estadísticos							
Pendiente (b)					5.6544		
Intercepto (a)					-10.2642		
Coefficiente de Correlación (r)					0.9999		
Coefficiente de Determinación (r²)					0.9999		

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: VerAnexo III



En la tabla 5.1.11.1 se presentan los resultados para la linealidad del método, para la comprobación de estos datos se procede a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r^2).

Cálculos para análisis estadístico de la linealidad:

Pendiente (b)

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$b = 424764.7771 / 75120.6960 = 5.6544$$

Dónde:

S_{xy} = Es la suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

S_{xx} = Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

Intercepto (a)

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$a = 2815.4811 - 5.6544 (499.7) = -10.2642$$

La pendiente es un factor que limita la sensibilidad, siendo el valor de la pendiente de 5.6544 y el sesgo es de -10.2642 indicado por el valor del intercepto.

Coeficiente de correlación (r)

$$r = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$$r = 0.9999$$

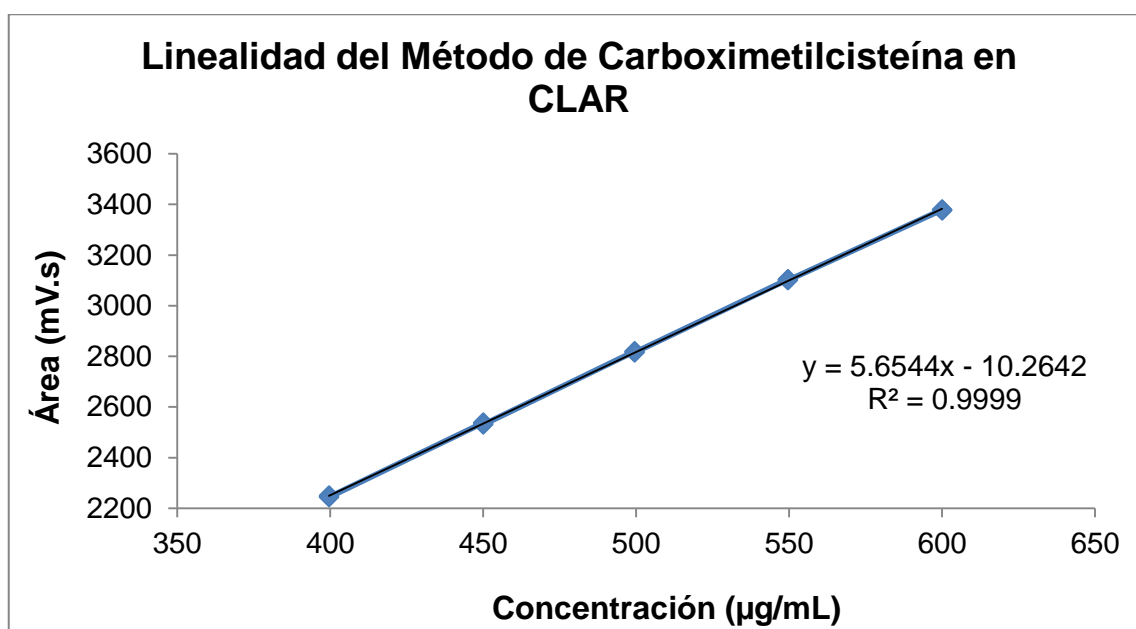


Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = (0.9999)^2 = 0.9998$$

A continuación, se presenta la curva de calibrado y la ecuación de la recta, en ella se puede observar proporcionalidad entre concentración y respuesta cromatográfica.

Gráfico 5.1.11.2. Linealidad del método de cuantificación de carboximetilcisteína 50 mg/mL, S.O



Fuente: Software YLClarity Chromatography SW, Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta para la curva de calibrado, se expresa según $y = 5.6544x - 10.2642$ con $r = 0.9999$ y $r^2 = 0.9998$

5.1.11.1 ECUACIÓN DE LA RECTA DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO EN CLAR

Se procede a realizar el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar dichos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales (Skoog, D., West, D., Holl, F., & Crouch, S., 2003, p. 37-60)



Tabla 5.1.11.1.1. Análisis de mínimos cuadrados para linealidad del método en CLAR

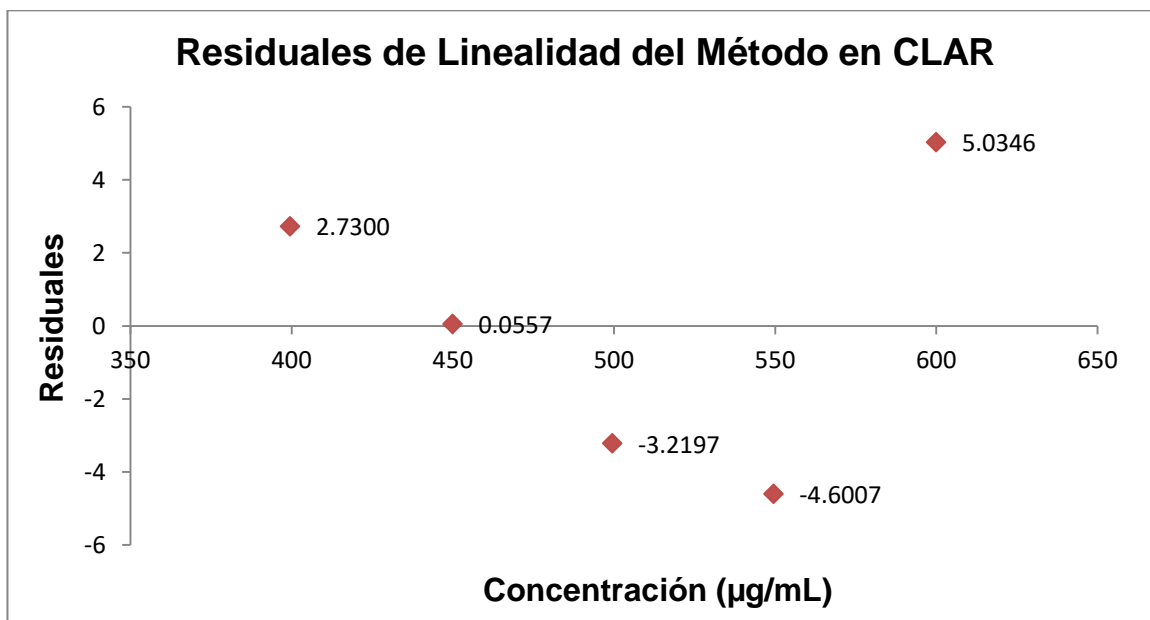
Concentración µg/mL (%) (xi)	Área (m.V.s)* (yi)	$xi - \bar{x}$	$(xi - \bar{x})^2$	$yi - \bar{y}$	$(yi - \bar{y})^2$	$(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})$	Σxi^2	$\hat{y} = b * x + a^*$	$ei = (\hat{y} - yi)$ residuales
399.6 µg/mL (80 %)	2249.9990	-100.1400	10028.0196	-565.4821	319769.9677	56627.3742	159680.1600	2249.2464	-0.7526
399.6 µg/mL (80 %)	2245.8340	-100.1400	10028.0196	-569.6471	324497.7806	57044.4573	159680.1600	2249.2464	3.4124
399.6 µg/mL (80 %)	2243.7160	-100.1400	10028.0196	-571.7651	326915.2915	57256.5538	159680.1600	2249.2464	5.5304
450.0 µg/mL (90 %)	2537.5690	-49.7400	2474.0676	-277.9121	77235.1168	13823.3462	202500.0000	2534.2297	-3.3393
450.0 µg/mL (90 %)	2534.8410	-49.7400	2474.0676	-280.6401	78758.8470	13959.0369	202500.0000	2534.2297	-0.6113
450.0 µg/mL (90 %)	2530.1120	-49.7400	2474.0676	-285.3691	81435.5042	14194.2574	202500.0000	2534.2297	4.1177
499.5 µg/mL (100 %)	2819.7170	-0.2400	0.0576	4.2359	17.9431	-1.0166	249500.2500	2814.1240	-5.5930
499.5 µg/mL (100 %)	2817.0970	-0.2400	0.0576	1.6159	2.6112	-0.3878	249500.2500	2814.1240	-2.9730
499.5 µg/mL (100 %)	2815.2170	-0.2400	0.0576	-0.2641	0.0697	0.0634	249500.2500	2814.1240	-1.0930
549.6 µg/mL (110 %)	3103.8110	49.8600	2486.0196	288.3299	83134.1505	14376.1305	302060.1600	3097.4110	-6.4000
549.6 µg/mL (110 %)	3102.0990	49.8600	2486.0196	286.6179	82149.8397	14290.7702	302060.1600	3097.4110	-4.6880
549.6 µg/mL (110 %)	3100.1250	49.8600	2486.0196	284.6439	81022.1688	14192.3465	302060.1600	3097.4110	-2.7140
600.0 µg/mL (120 %)	3379.1250	100.2600	10052.0676	563.6439	317694.4836	56510.9408	360000.0000	3382.3943	3.2693
600.0 µg/mL (120 %)	3376.9550	100.2600	10052.0676	561.4739	315252.9778	56293.3766	360000.0000	3382.3943	5.4393
600.0 µg/mL (120 %)	3375.9990	100.2600	10052.0676	560.5179	314180.3536	56197.5280	360000.0000	3382.3943	6.3953
$\Sigma = 7496.7$	42232.2160	0.0000	$\Sigma = 75120.6960$	0.0000	2402067.1058	424764.7771	$\Sigma = 3821221.7100$	$\Sigma = 42232.2160$	
$\bar{x} = 499.7$	2815.4811	0.0000	$\bar{x} = 5008.0464$	0.0000	160137.8071	28317.6518			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Gráfico 5.1.11.1.2. Análisis de residuales de la linealidad del método



Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

El análisis de los residuales para la linealidad del sistema CLAR, demuestra que la distribución es aleatoria y no presenta ninguna tendencia por lo tanto hay ausencia de error sistemático, lo que quiere decir que el sistema es válido.

Análisis de mínimos cuadrados del método

1) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

$$Sxx = \sum (xi - \bar{x})^2 = \sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Dónde:

xi = Pares de datos individuales de x.

\bar{x} = Valor medio o promedio de la variable (x)

$$Sxx = \sum (xi - \bar{x})^2 = 75120.6960$$



2) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la medida de los valores individuales de y

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Dónde:

y_i = Pares de datos individuales de y

\bar{y} = Valores medio o promedios de la variable (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 2402067.1058$$

3) Suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores de x e y

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 424764.7771$$

5.1.12 TEST DE LINEALIDAD DEL MÉTODO: TEST DE STUDENT PARA LA PENDIENTE (B) EN CLAR

Para realizar esta prueba se debe de cumplir con el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$;

Hipótesis

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 20})$$



Para determinar el t_{exp} primero se calcula la desviación estándar de la regresión (S_r) para obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Cálculo de la desviación estándar de la regresión (S_r) del método

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{2402067.1058 - (5.6544)^2(75120.6960)}{15 - 2}} = \sqrt{\frac{2402067.1058 - 2401776.873}{15 - 2}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{290.232}{13}} = \sqrt{22.3255} = 4.7250$$

Desviación estándar de la pendiente (S_b) del método

Esta prueba debe de cumplir con el criterio de aceptación que el $t_{exp} > t_{tab}$:

Hipótesis: $H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

$$S_b = \sqrt{\frac{S_r^2}{S_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$S_b = \sqrt{\frac{(4.7250)^2}{75120.6960}} = \sqrt{2.9720 \times 10^{-4}} = 0.0172$$

Se obtiene

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{|5.6544|}{0.0172} = 328.7442$$



Dónde:

$|b|$ = Valor absoluto de la pendiente

S_b = Desviación estándar de la pendiente

Se obtiene un t_{exp} 328.7442 > t_{tab} 2.160 demostrando estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero, el intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student en el cual la pendiente no incluye al cero. Intervalo de confianza (IC) para la pendiente, se calculó de la siguiente manera:

$$b \pm t * S_b = 5.6544 \pm 2.160 * 0.0172$$

$$5.6544 \pm 0.0372$$

$$[5.6172 \text{ a } 5.6916]$$

5.1.13 TEST DE PROPORCIONALIDAD DEL MÉTODO: TEST DE STUDENT PARA EL INTERCEPTO (A) EN CLAR

Esta prueba debe de cumplir con el criterio de aceptación que dice que el t_{exp} < t_{tab} ; Hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

Se calcula con la fórmula siguiente:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} \quad \text{(Ecuación 23)}$$

Dónde:

$|a|$ = Valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto

Para encontrar el t_{exp} para el intercepto hay que calcular la desviación estándar de la regresión (S_r), la cual fue calculada anteriormente dando un valor de $S_r = 4.7250$ y la desviación estándar de la pendiente (S_b).



Desviación estándar del intercepto (S_a)

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$S_a = 4.7250 * \sqrt{\frac{1}{15 - (7496.1000)^2 / 3821221.7100}}$$

$$S_a = 4.7250 * \sqrt{\frac{1}{15 - 14.7051}} = 4.7250 * \sqrt{\frac{1}{0.2949}}$$

$$S_a = 4.7250 * \sqrt{3.3909} = 4.7250 * 1.8414 = 8.7006$$

Se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{|-10.2642|}{8.7006} = -1.1797$$

Se obtiene un $t_{exp} -1.1797 < t_{tab} 2.160$ demostrando estadísticamente que la variable x es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de las coordenadas, el intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student.

Intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} a \pm t * S_a &= -10.2642 \pm 2.160 * 8.7006 \\ &= -10.2642 \pm 18.7933 \\ &= [-29.0575 \text{ a } 8.5291] \end{aligned}$$



5.1.14 TEST DE G DE COCHRAN DEL MÉTODO

El test G de Cochran determina si el factor de concentración tiene alguna influencia sobre la variable de respuesta. Si el criterio de aceptación es $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas y no afecta estadísticamente en la variabilidad de los resultados.

El valor crítico de Cochran se determina $C = (K, v, \alpha)$

Dónde:

K = Es el número de datos o número de replicas

U = Grados de libertad definido como $n_{\text{máx}} - 1$, donde $n_{\text{máx}}$ es el mayor de los tamaños de las muestras.

α = Nivel de significancia 0.05

La hipótesis afirma que:

$$H_0 = G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$$

$$H_1 = G_{\text{exp}} > G_{\text{tab}}$$

El valor de G_{exp} se calcula con la fórmula siguiente:

$$G_{\text{exp}} = \frac{S^2_{\text{máxima}}}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Dónde:

$S^2_{\text{máxima}}$: Varianza máxima de los grupos

$\sum S_i^2$: Sumatoria de la varianza de cada grupo

En la tabla 5.1.14.1 se observa los valores obtenidos para el análisis del factor de concentración en la homogeneidad de las varianzas.



Prueba de homogeneidad de varianzas del método

Tabla 5.1.14.1. Test de Cochran para el análisis de varianza de los factores de respuesta del método en CLAR

Nº	Concentración µg/mL, (%)	Área (mV.s)*	Factor de respuesta F=y/x	Promedio F=y/x	Desviación Estándar F=y/x	Varianza (S ²) F=x/y
1	399.6 µg/mL (80 %)	2249.9990	5.6306	5.6219	0.0080	6.39 x 10 ⁻⁰⁵
	399.6 µg/mL (80 %)	2245.8340	5.6202			
	399.6 µg/mL (80 %)	2243.7160	5.6149			
2	450.0 µg/mL (90 %)	2537.5690	5.6390	5.6315	0.0084	7.02 x 10 ⁻⁰⁵
	450.0 µg/mL (90 %)	2534.8410	5.6330			
	450.0 µg/mL (90 %)	2530.1120	5.6225			
3	499.5 µg/mL (100 %)	2819.7170	5.6451	5.6403	0.0045	2.047 x 10 ⁻⁰⁵
	499.5 µg/mL (100 %)	2817.0970	5.6398			
	499.5 µg/mL (100 %)	2815.2170	5.6361			
4	549.6 µg/mL (110 %)	3103.8110	5.6474	5.6441	0.0034	1.12 x 10 ⁻⁰⁵
	549.6 µg/mL (110 %)	3102.0990	5.6443			
	549.6 µg/mL (110 %)	3100.1250	5.6407			
5	600.0 µg/mL (120 %)	3379.1250	5.6319	5.6289	0.0027	7.12 x 10 ⁻⁰⁶
	600.0 µg/mL (120 %)	3376.9550	5.6283			
	600.0 µg/mL (120 %)	3375.9990	5.6267			
Promedio (\bar{x})			5.6334	$\Sigma Si^2 = 0.0002$		
Desviación Estándar (S)			0.0026			

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW, Programa Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Se calcula el valor de G_{exp} :

$$G_{exp} = \frac{7.02 \times 10^{-5}}{0.0002} = 0.3510$$

Se realiza la comparación del valor experimental con el valor crítico donde se obtiene que el $G_{exp} 0.3510 < G_{tab} 0.841$, cumpliendo la hipótesis nula la cual comprueba que x o el factor de respuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados, el valor crítico se calcula por medio del valor de: $\alpha = 0.05$, $K = 5$ y $n = 2$.

5.1.15 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA PARA EL MÉTODO

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad \text{(Ecuación 26)}$$

Dónde:

S = Desviación estándar

\bar{x} = Media de los resultados

En la Tabla 5.1.14.1 test de Cochran varianza de los factores de respuesta en CLAR, se obtiene una desviación estándar global de 0.0026 y un promedio global de 5.6334 por lo cual:

$$CV = \frac{0.0026}{5.6334} * 100 = 0.0461 \%$$

Aplicando la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación del factor de respuesta (CV_F) se obtiene un $CV_F = 0.0461\% < 2\%$ demostrando la linealidad del sistema.



5.1.16 ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MÉTODO EN CLAR

Para el cálculo de la varianza ($S_{y,x}^2$) se determina a partir de los datos de los mínimos cuadrados con la fórmula siguiente:

Varianza de Residual

$$V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2} \quad (\text{Ecuación 28})$$

$$V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{264.0683}{13} = 20.3129$$

$$SC_r = SC_{RES} + SC_{REG}$$

$$SC_r = 264.0683 + 2401803.0375$$

$$SC_r = 2402067.105$$

Cálculo de la Varianza de Regresión

$$V_{REG} = S_{y^*}^2 = \sum \frac{(\hat{y}^* - \bar{y})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 29})$$

$$V_{REG} = S_{y^*}^2 = \frac{2401803.0375}{15} = 160120.2025$$

Una vez obtenidos los valores de la varianza y de los residuales se procede a realizar el cálculo de Fisher (F), el cual cumple con el criterio que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$, estadísticamente se prueba que existe una pendiente diferente de cero.

La hipótesis es:

$$H_0: F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$$

$$H_1: F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$$



Para determinar el F_{exp} se aplica la fórmula siguiente:

$$F_{exp} = \frac{V_{REG}}{V_{RES}} \quad (\text{Ecuación 30})$$

$$F_{exp} = \frac{160120.2025}{20.3129} = 7882.6855$$

Por lo tanto el valor de F_{exp} 7882.6855 > F_{tab} (0.05, 1, n-1)= 4.666, el cual cumple el criterio de aceptación $H_0: F_{exp} > F_{tab}$ comprobando que existe una pendiente diferente de cero,

Para la validación de la linealidad del sistema, se realizan diferentes test estadísticos y pruebas tales como: el análisis de mínimos cuadrados para ajustar la curva de calibrado, obteniendo valores para la pendiente y el intercepto con sus respectivas desviaciones estándar, mediante el uso del test de Student se demuestra que existe diferencia significativa.

Se realiza el test de Cochran para demostrar la homogeneidad de la varianza, también se realiza el análisis de la regresión ANOVA, se evalúa los residuales y se determina estadísticamente que son independientes, existe una distribución normal y que la relación concentración y área es lineal. El test de Fisher se aplica para verificar que existe linealidad, bajo un nivel de confianza del 95 %, en la cual no se encuentran diferencias significativas entre las concentraciones, obteniendo $F_{exp} > F_{tab}$ indicando que si hay regresión.



Tabla 5.1.16.1. Análisis de varianza del método en CLAR

Análisis de Varianza		Análisis de Residual			Análisis de la Regresión		
Concentración µg/mL (%)	Área (mV.s)	$\hat{y} = b * x + a$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$	
399.6 µg/mL (80 %)	2249.9990	2249.2464	0.7526	0.5665	-566.2347	320621.7357	
399.6 µg/mL (80 %)	2245.8340	2249.2464	-3.4124	11.6442	-566.2347	320621.7357	
399.6 µg/mL (80 %)	2243.7160	2249.2464	-5.5304	30.5850	-566.2347	320621.7357	
450.0 µg/mL (90 %)	2537.5690	2534.2297	3.3393	11.1511	-281.2514	79102.3432	
450.0 µg/mL (90 %)	2534.8410	2534.2297	0.6113	0.3737	-281.2514	79102.3432	
450.0 µg/mL (90 %)	2530.1120	2534.2297	-4.1177	16.9553	-281.2514	79102.3432	
499.5 µg/mL (100 %)	2819.7170	2814.1240	5.5930	31.2816	-1.3571	1.8416	
499.5 µg/mL (100 %)	2817.0970	2814.1240	2.9730	8.8387	-1.3571	1.8416	
499.5 µg/mL (100 %)	2815.2170	2814.1240	1.0930	1.1946	-1.3571	1.8416	
549.6 µg/mL (110 %)	3103.8110	3097.4110	6.4000	40.9602	281.9299	79484.4796	
549.6 µg/mL (110 %)	3102.0990	3097.4110	4.6880	21.9775	281.9299	79484.4796	
549.6 µg/mL (110 %)	3100.1250	3097.4110	2.7140	7.3659	281.9299	79484.4796	
600.0 µg/mL (120 %)	3379.1250	3382.3943	-3.2693	10.6883	566.9132	321390.6124	
600.0 µg/mL (120 %)	3376.9550	3382.3943	-5.4393	29.5860	566.9132	321390.6124	
600.0 µg/mL (120 %)	3375.9990	3382.3943	-6.3953	40.8998	566.9132	321390.6124	
$\bar{x} = 499.7$	2815.4811	2815.4811	SC_{RES} = 264.0683			SC_{REG} = 2401803.0375	
	$\Sigma = 42232.2160$						

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010



5.1.17 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO EN CLAR

Para el análisis de repetibilidad se realiza la evaluación de 10 distintas determinaciones, se trabaja a la concentración media de la curva de calibrado al 100 %, a las cuales se les determinan la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación en función al factor de respuesta.



Tabla 5.1.17.1. Evaluación de repetibilidad del método en CLAR

Número de Lecturas	Concentración $\mu\text{g/mL}$ (%)	Área (mV.s)	Factor Respuesta $f(y/x)$	Datos de Factor Respuesta $f(y/x)$		Tiempo de retención (T_r)	Número de platos teóricos (N)
				Media	Desviación Estándar (S)		
1	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2816.2960	5.6382	5.6396	0.0027	2.5810	4324.1095
2	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2816.2340	5.6381			2.5830	4276.1666
3	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2815.1060	5.6358			2.5930	4255.3057
4	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2818.3910	5.6424			2.6010	4391.3837
5	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2815.2940	5.6362			2.5820	4219.2787
6	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2816.5480	5.6387			2.5970	4377.8873
7	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2817.4380	5.6405			2.5810	4216.0111
8	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2818.3280	5.6423			2.6030	4288.1905
9	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100 %)	2817.2180	5.6401			2.6000	4388.0076
10	499.5 $\mu\text{g/mL}$ (100%)	2819.1160	5.6439			2.5990	4384.6329
Coefficiente de Variación CV (%)			0.0476 %	Cumple			
Criterio de Aceptación CV (%) ≤ 2 %			Conclusión				

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW, Programa Microsoft Excel 2010



Evaluación estadística para la repetibilidad del método en CLAR

Para procesar los datos obtenidos se evalúan estadísticamente de la siguiente manera:

Media

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (\text{Ecuación 31})$$

$$\bar{X} = 5.6396$$

Desviación estándar (S)

$$S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Ecuación 32})$$

$$S = 0.0027$$

La precisión en condiciones de repetibilidad en función al factor de respuesta obtiene una desviación estándar de 0.0027 lo que significa una buena precisión del sistema y que no existe una diferencia significativa.

Coefficiente de Variación

Para calcular el coeficiente de variación se utiliza la ecuación 26.

$$CV = \frac{0.0027}{5.6396} * 100 = 0.0479 \%$$

En la tabla 5.1.17.1 se observa que el CV % está por debajo del criterio de aceptación establecido que es > 2 %, obteniendo un valor de 0.0479 %, lo que confirma que la técnica cumple con los parámetros establecidos ya que el ensayo es repetitivo y a la vez aceptado según el CV %.



5.1.18 PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO EN CLAR

La precisión intermedia se realiza para determinar las posibles fuentes de variación durante el análisis inter analista e inter día, se trabaja con concentraciones de 499.5 µg/mL (100 %) durante dos días continuos.

La prueba de Fisher y el estadístico de t de Student se aplican para determinar si existe alguna diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos analistas. Los datos que a continuación se presentan están en función del factor de respuesta para verificar que si el factor de concentración tiene alguna influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Se obtienen los siguientes resultados, ver tabla 5.1.18.1:



Tabla 5.1.18.1. Respuestas obtenidas de la precisión intermedia, inter analista e inter día en CLAR (Analista A)

Precisión Intermedia en CLAR						
Concentración µg/mL %	Analista: A, Día: 1			Analista: A, Día: 2		
	Área (m.V.s)*	Área Media	F= y/x (Área)	Área (m.V.s)	Área Media	F= y/x (Área)
499.5 µg/mL (100 %)	2816.4320	2816.1813	5.6385	2816.2310	2816.4770	5.6381
499.5 µg/mL (100 %)	2816.1250		5.6379	2817.1230		5.6399
499.5 µg/mL (100 %)	2815.9870		5.6376	2816.0770		5.6378
499.5 µg/mL (100 %)	2817.2910	2817.5307	5.6402	2816.3210	2816.6080	5.6383
499.5 µg/mL (100 %)	2818.4250		5.6425	2816.2130		5.6381
499.5 µg/mL (100 %)	2816.8760		5.6394	2817.2900		5.6402
499.5 µg/mL (100 %)	2818.2540	2817.9670	5.6422	2816.3340	2817.3483	5.6383
499.5 µg/mL (100 %)	2819.5240		5.6447	2818.4060		5.6425
499.5 µg/mL (100 %)	2816.1230		5.6379	2817.3050		5.6403
Analista A Primer día			Analista A Segundo día			
Media		5.6401	Media		5.6393	
Desviación Estándar (S)		0.0025	Desviación Estándar (S)		0.0016	
Coeficiente de Variación (CV %)		0.0444	Coeficiente de Variación (CV %)		0.0275	

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Tabla 5.1.18.1.1. Respuestas obtenidas de la precisión intermedia, interanalista e inter día en CLAR (Analista B)

Precisión Intermedia en CLAR						
Concentración µg/mL %	Analista: B, Día: 1			Analista: B, Día: 2		
	Área (m.V.s)*	Área Media	F= y/x (Área)	Área (m.V.s)	Área Media	F= y/x (Área)
499.5 µg/mL (100 %)	2816.1230	2816.8197	5.6379	2818.1050	2817.1277	5.6419
499.5 µg/mL (100 %)	2817.2340		5.6401	2817.2350		5.6401
499.5 µg/mL (100 %)	2817.1020		5.6398	2816.0430		5.6377
499.5 µg/mL (100 %)	2818.3260	2818.3250	5.6423	2816.3310	2816.9300	5.6383
499.5 µg/mL (100 %)	2819.3250		5.6443	2816.2560		5.6382
499.5 µg/mL (100 %)	2817.3240		5.6403	2818.2030		5.6420
499.5 µg/mL (100 %)	2818.2180	2816.6917	5.6421	2815.3240	2816.9837	5.6363
499.5 µg/mL (100 %)	2815.5430		5.6367	2818.3020		5.6422
499.5 µg/mL (100 %)	2816.3140		5.6383	2817.3250		5.6403
Analista B Primer día			Analista B Segundo día			
Media		5.6402	Media		5.6397	
Desviación Estándar (S)		0.0024	Desviación Estándar (S)		0.0022	
Coeficiente de Variación (CV %)		0.0425	Coeficiente de Variación (CV %)		0.0382	

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Tabla 5.1.18.1.2. Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista en CLAR (Analista A vs Analista B)

Concentración µg/mL %	Analista A		Analista B		Fórmula
	1er Día	2do Día	1er Día	2do Día	
	Factor de Respuesta		Factor de Respuesta		
499.5 µg/mL (100 %)	5.6385	5.6381	5.6379	5.6419	Coeficiente de variación $CV \% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$
499.5 µg/mL (100 %)	5.6379	5.6399	5.6401	5.6401	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6376	5.6378	5.6398	5.6377	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6402	5.6383	5.6423	5.6383	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6425	5.6381	5.6443	5.6382	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6394	5.6402	5.6403	5.6420	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6422	5.6383	5.6421	5.6363	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6447	5.6425	5.6367	5.6422	
499.5 µg/mL (100 %)	5.6379	5.6403	5.6383	5.6403	
Media	5.6401	5.6393	5.6402	5.6397	
Desviación Estándar (S)	0.0025	0.0016	0.0024	0.0022	
Coeficiente de variación (CV %)	0.0444	0.0275	0.0425	0.0382	
CV_{global}	0.0381				
Criterio de Aceptación	CV global (%) ≤ 2 %		Conclusión	Cumple	

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010



En la tabla 5.1.18.1.2. Se obtiene que el coeficiente de variación experimental para ambos analistas en diferentes días es menor al 2 %, cumpliendo con el criterio de aceptación ($CV \leq 2 \%$), según lo establecido por el RTCA 11:03:39:06 y USP 36.

Tabla 5.1.18.1.3. Evaluación estadística para la precisión intermedia del método en CLAR

ANÁLISIS DE VARIANZA 100%						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Analista A	2	11.2794	5.6397	3.46 x 10 ⁻⁷		
Analista B	2	11.2799	5.6399	1.41 x 10 ⁻⁷		
Día 1	2	11.2803	5.6401	5.51 x 10 ⁻⁹		
Día 2	2	11.2789	5.6395	8.23 x 10 ⁻⁸		
Origen de las variaciones	ΣSC	Grados de libertad	Promedio ΣSC	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	6.52 x 10 ⁻⁸	1	6.52 x 10 ⁻⁸	2.8840	0.3388	161.4476
Días	4.64 x 10 ⁻⁷	1	4.64 x 10 ⁻⁷	20.5037	0.1384	161.4476
Error	2.26 x 10 ⁻⁸	1	2.26 x 10 ⁻⁸			
Total	5.51 x 10 ⁻⁷	3				

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

Se procede a realizar un análisis de varianza de los datos aplicando el test de Fisher, los resultados que se obtienen demuestran que no existe diferencia significativa entre dichas precisiones alcanzadas por los dos analistas en los diferentes días para una probabilidad del 0.05 % ya que el valor de F_{exp} es menor que F_{tab} (interanalista F_{exp} 2.8840 < F_{tab} 161.4476; interdía F_{exp} 20.5037 < F_{tab} 161.4476).



Tabla 5.1.18.1.4. Precisión intermedia Analista A

Día 1	Día 2	Día 1 -Día 2	Valor absoluto
5.6385	5.6381	0.0004	0.0004
5.6379	5.6399	-0.0020	0.0020
5.6376	5.6378	-0.0002	0.0002
5.6402	5.6383	0.0019	0.0019
5.6425	5.6381	0.0044	0.0044
5.6394	5.6402	-0.0008	0.0008
5.6422	5.6383	0.0038	0.0038
5.6447	5.6425	0.0022	0.0022
5.6379	5.6403	-0.0024	0.0024
Promedio (\bar{x})			0.0020
Desviación estándar (S)			0.0014
$\sqrt{9}$			3

Analista A

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}|}{(s\sqrt{n})}$$

$$t_{exp} = \frac{|0.0020|}{(0.0014\sqrt{9})}$$

$$t_{exp} = 0.4762$$

Tabla 5.1.18.1.5. Precisión intermedia Analista B

Día 1	Día 2	Día1-Día2	Valor absoluto
5.6379	5.6419	-0.0040	0.0040
5.6401	5.6401	0.0000	0.0000
5.6398	5.6377	0.0021	0.0021
5.6423	5.6383	0.0040	0.0040
5.6443	5.6382	0.0061	0.0061
5.6403	5.6420	-0.0018	0.0018
5.6421	5.6363	0.0058	0.0058
5.6367	5.6422	-0.0055	0.0055
5.6383	5.6403	-0.0020	0.0020
Promedio (\bar{x})			0.0035
Desviación estándar (S)			0.0021
$\sqrt{9}$			3

Analista B

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}|}{(s\sqrt{n})}$$

$$t_{exp} = \frac{|0.0035|}{(0.0021\sqrt{9})}$$

$$t_{exp} = 0.5555$$



Tabla 5.1.18.1.6. Precisión intermedia Analista A vs B, Día 1

Analista A	Analista B	Analista A-B	Valor absoluto	Analista A vs B (Día 1) $t_{exp} = \frac{ \bar{x} }{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{ 0.0020 }{(0.0024\sqrt{9})}$ $t_{exp} = 0.2777$
5.6385	5.6379	0.0006	0.0006	
5.6379	5.6401	-0.0022	0.0022	
5.6376	5.6398	-0.0022	0.0022	
5.6402	5.6423	-0.0021	0.0021	
5.6425	5.6443	-0.0018	0.0018	
5.6394	5.6403	-0.0009	0.0009	
5.6422	5.6421	0.0001	0.0001	
5.6447	5.6367	0.0080	0.0080	
5.6379	5.6383	-0.0004	0.0004	
Promedio (\bar{x})			0.0020	
Desviación estándar (S)			0.0024	
$\sqrt{9}$			3	

Tabla 5.1.18.1.7. Precisión intermedia analista A vs B, Día 2

Analista A	Analista B	Analista A-B	Valor absoluto	Analista A vs B (Día 2) $t_{exp} = \frac{ \bar{x} }{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{ 0.0009 }{(0.0013\sqrt{9})}$ $t_{exp} = 0.2308$
5.6381	5.6419	-0.0038	0.0038	
5.6399	5.6401	-0.0002	0.0002	
5.6378	5.6377	0.0001	0.0001	
5.6383	5.6383	0.0000	0.0000	
5.6381	5.6382	-0.0001	0.0001	
5.6402	5.6420	-0.0018	0.0018	
5.6383	5.6363	0.0020	0.0020	
5.6425	5.6422	0.0002	0.0002	
5.6403	5.6403	0.0000	0.0000	
Promedio (\bar{x})			0.0009	
Desviación estándar (S)			0.0013	
$\sqrt{9}$			3	



Tabla 5.1.18.1.8. Precisión intermedia, interdía e interanalista en CLAR, t estadístico Student

Analista A		Analista B	Analista A vs B		Fórmula
			Día 1	Día 2	
t_{exp}	0.4762	0.5555	0.2777	0.2308	$t_{exp} = \frac{ \bar{x} }{(s\sqrt{n})}$
t_{tab}	2.306	2.306	2.306	2.306	
$t_{exp} < t_{tab}$ No existe diferencia significativa.					

Al aplicar la prueba de t de Student para ambos analistas, el valor experimental obtenido fue menor que el tabulado ($0.2777 < 2.306$ y $0.2308 < 2.306$), lo que indica que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un 5 %.

5.1.19 EXACTITUD DEL MÉTODO DE CARBOXIMETILCISTEÍNA

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza (AEFI, 2001, p. 68-94).

Para determinar el porcentaje de recuperación se utilizan las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\mu\text{g/mL encontrado}}{\mu\text{g/mL que se inyectaron}} * 100$$

(Ecuación 36)



$$\text{Concentración encontrada} = \frac{\text{Área del producto}}{\text{Área del Estándar}} * \text{Concentración del estándar}$$

(Ecuación 37)

$$\text{Concentración encontrada} = \frac{2821.0770}{2823.7340} * 499.5000 = 499.0299$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{499.0299}{499.5000} * 100 = 99.9059 \% = 99.9 \%$$

El procedimiento de cuantificación permite calcular la cantidad de principio activo en las muestras sometidas al análisis obteniendo un porcentaje de recuperación de 99.9, el cual está dentro del rango brindado por el proveedor y el Laboratorio entre 98.5 % -101.0 %.



Tabla 5.1.19.1. Porcentaje de recuperación del método de carboximetilcisteína S.O. 50 mg/mL

Cantidad pesada de principio activo (mg)	Cantidad mL de p. a+ excipientes (mL)	Concentración a inyectar (µg/mL)	Área estándar (mV.s)*	Área muestra (mV.s)	Concentración encontrada (µg/mL)	% de recuperación
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2821.0770	499.0300	99.9059
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2822.2160	499.2315	99.9462
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2821.1890	499.0498	99.9099
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2822.3900	499.2623	99.9524
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2822.5480	499.2902	99.9580
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2821.1270	499.0388	99.9077
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2821.1290	499.0392	99.9077
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2822.4030	499.2646	99.9529
50.556	1.011	499.5	2823.7340	2822.9840	499.3673	99.9734
$\bar{x} = 50.556$	1.011	499.5	2823.7340	2821.8959	499.0300	99.9349

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Tabla 5.1.19.1.2. Test de Cochran del método en CLAR para porcentaje de recuperación

Nº de lecturas	Concentración ug/mL %	Recuperación %	Promedio % de Recuperación	S	Si ²
1	499.5 µg/mL 100 %	99.9059	99.9207	0.0222	0.0005
2	499.5 µg/mL 100 %	99.9462			
3	499.5 µg/mL 100 %	99.9099			
4	499.5 µg/mL 100 %	99.9524	99.9394	0.0276	0.0008
5	499.5 µg/mL 100 %	99.9580			
6	499.5 µg/mL 100 %	99.9077			
7	499.5 µg/mL 100 %	99.9077	99.9447	0.0336	0.0011
8	499.5 µg/mL 100 %	99.9529			
9	499.5 µg/mL 100 %	99.9734			
Promedio (\bar{X})		99.9349	$\Sigma Si^2 = 0.0024$		
Desviación Estándar (S)		0.0267			
Coefficiente de variación (CV %)		0.0268			

Fuente: Software YLClarity Chromatography SW y Programa Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad del método: test de Cochran

Deberá de cumplir que el $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\Sigma S_i^2} = \frac{0.0011}{0.0024} = 0.4583$$



Al comparar el valor experimental con el valor tabulado se cumple la hipótesis nula que el $G_{exp} 0.4583 < G_{tab} 0.996$, comprobando que el factor de respuesta no tiene influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Test de Student

En la tabla de t de Student n-1 grados de libertad y 0.05 grados de significación el $t_{tab} = 4.303$ Como criterio de aceptación para el test de Student debe de cumplir que el $t_{exp} < t_{tab}$ obteniéndose los siguientes resultados $t_{exp} 4.2073 < t_{tab} 4.303$.

Para calcular el valor experimental se aplicó la ecuación 35:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{x}| * \sqrt{n}}{CV\%}$$

Dónde:

\bar{x} = Media del porcentaje de recuperación

CV = Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación

n = número de muestras 3

$$t_{exp} = \frac{|100 - 99.9349| * \sqrt{3}}{0.0268} = \frac{0.0651 * 1.7320}{0.0268} = 4.2073$$

5.1.20 ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Para evaluar la capacidad del método se realiza el estudio de la robustez para verificar que el método permanece inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones tales como: longitud de onda, cambio de flujo y proporción de la fase móvil. Se preparan soluciones de la muestra al 100 % equivalente a 499.5 $\mu\text{g/mL}$ en la cual se realizan lecturas por triplicado en las condiciones reflejas en la tabla 5.1.20.1, los cuales demuestran que el método es robusto en todos los cambios realizados.



Tabla 5.1.20.1. Evaluación de la robustez del método en CLAR

Condiciones	Réplica	N	Factor de Cola (T)	Factor de Capacidad (K)	Área (m.V.s)*	Promedio área	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	% Recuperación
Control Flujo 0.5 mL/min 210 nm	1	4306.0176	0.3587	1.5920	2820.0890	2818.3813	1.5935	0.0565	100.1672
	2	4345.9805	0.3515	1.6040	2818.1210				99.9908
	3	4275.0214	0.3497	1.5990	2816.9340				99.8420
Cambio de longitud de onda de 210 a 208 nm	1	4332.6390	0.3523	1.6000	2819.2320	2817.5450	1.5408	0.0547	100.0718
	2	4208.7656	0.3480	1.5950	2817.1910				99.9993
	3	4215.2556	0.3525	1.5970	2816.2120				99.9289
Cambio de longitud de onda de 210 a 212 nm	1	4292.7377	0.3511	1.5880	2817.1250	2816.1607	1.0030	0.0356	100.0816
	2	4284.8963	0.3531	1.6020	2816.2340				99.9789
	3	4350.9569	0.3501	1.5890	2815.1230				99.9395
Cambio de flujo de 0.5 mL/min a 0.4 mL/min	1	4205.5225	0.3534	1.5940	2819.2310	2817.8230	1.5795	0.0561	100.1447
	2	4281.6034	0.3561	1.6010	2818.1230				99.9633
	3	4371.1469	0.3510	1.5950	2816.1150				99.8920
Cambio de flujo de 0.5 mL/min a 0.6 mL/min	1	4282.7912	0.3527	1.5850	2818.8430	2817.4443	1.2277	0.0436	100.0496
	2	4258.5885	0.3527	1.5940	2816.9450				99.9823
	3	4202.2806	0.3524	1.5930	2816.5450				99.9681
Control Fase móvil 95:05 Buffer (Dihidrógeno fosfato monobásico de sodio) / Metanol	1	4357.6817	0.3559	1.5910	2819.1320	2817.562	1.4363	0.0510	100.0557
	2	4393.3103	0.3518	1.5850	2817.2400				99.9886
	3	4361.0460	0.3495	1.5920	2816.3140				99.9557
Fase móvil 90:10 Buffer (Dihidrógeno fosfato monobásico de sodio) / Metanol	1	4376.3314	0.3488	1.5800	2816.9120	2816.1550	0.7794	0.0277	100.0269
	2	4225.0000	0.3521	1.6000	2816.1980				100.0015
	3	4354.3186	0.3522	1.5900	2815.3550				99.9716
Promedio (\bar{x})								0.0464	100.0000

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

*: Ver Anexo III



Como se aprecia en la tabla 5.1.20.1 el método es robusto en los cambios realizados ya que el porcentaje de recuperación está entre 98.5 % - 101.0% y el coeficiente de variación es menor del 2 % y la diferencia entre los resultados en la condición control y la condición de variación es $0.0464 < 2 \%$.



Tabla 5.1.20.2. Resumen de los resultados de la validación en CLAR

Principio Activo: Carboximetilcisteína Ensayos	Tipo de Validación	Resultados	
	Prospectiva	Validación	
1. Aptitud del Sistema	Especificaciones	Sistema	Método
- Interferencia de Excipientes	Negativo: No debe presentar interferencias de excipientes	Cumple	Cumple
- Factor de Cola - Número de Platos Teóricos - Coeficiente de Variación	< 2 > 2000 $CV \leq 2 \%$		
2. Linealidad			
- Coeficiente de Variación CV - Coeficiente de determinación r^2 - Coeficiente de correlación r - Intercepto (a) - Intervalo de confianza para el intercepto - Test de t para evaluar la significación estadística de desviación estándar del intercepto - Valor de la pendiente (b) - Intervalo de confianza de la pendiente - Test de t para evaluar la significación estadística de desviación estándar de la pendiente - Test de Cochran	$CV \leq 2 \%$ ≥ 0.9998 ≥ 0.9999 14.0099 El intervalo debe de incluir el cero $t_{exp} < t_{tab}$ ($t_{tab} = 2.160$) 5.6286 El intervalo no debe incluir el cero $t_{exp} < t_{tab}$ ($t_{tab} = 2.160$) $G_{exp} < G_{tab}$ ($G_{tab} = 0.841$)	Cumple	Cumple
- Gráfico de Residuales	La distribución de los puntos debe de ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia		
3. Precisión			
- Repetibilidad	$CV \leq 2 \%$	Cumple	Cumple
4. Exactitud			
- % Recuperación - Test de Cochran - Test de Student	98.5 % - 101.0 % $G_{exp} < G_{tab}$ ($G_{tab} = 0.966$) $t_{exp} < t_{tab}$ ($t_{tab} = 4.303$)	Cumple	Cumple



6 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, para la validación de la técnica analítica para la cuantificación de Carboximetilcisteína 50 mg/mL por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) se puede concluir:

- Se demuestra que el sistema es capaz de identificar la molécula de Carboximetilcisteína de forma inequívoca sin presencia de ninguna interferencia, cumpliendo los criterios de aceptación: Número de platos teóricos $4275.4089 > 2000$, factor de cola $0.3628 < 2$ y un coeficiente de variación de $0.1451 \% < 2 \%$.
- A través de los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de desempeño para la cuantificación de carboximetilcisteína solución oral 50 mg/mL, el método analítico demuestra ser: lineal, preciso, exacto y robusto, en base a los parámetros estadísticos estudiados.



7 RECOMENDACIONES

Se recomienda a Laboratorios SOLKA S.A., llevar a cabo el estudio de estabilidad ya que por motivos de tiempo no fue posible la realización de éste y es necesario para el aseguramiento de la calidad.

Es importante que en la presentación del producto terminado de carboximetilcisteína solución oral de 50 mg/mL, se indiquen las posibles interacciones medicamentosas con otros principios activos.

Se solicita a las autoridades competentes gestionar la actualización del Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.39:06. "Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos".



BIBLIOGRAFIA

- Arriola, L. (2012). *Validación de Métodos Analíticos, Físico-Químicos y Microbiológicos*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública. (pp. 7)
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEFI (2001). *Validación de Métodos Analíticos*. (p. 68-94).
- Brithis Pharmacopoeia. (2009). (Sexta ed., Vol. 1, pp. 1048-1048).
- Burugu R., Venkateshwarlu G. (2012). A Stability Indicating Ultra Performance Liquid Chromatographic (UPLC) Method for the Determination of assay of Carbocisteine in various Formulation Products. Department of Chemistry, Nizam College, Hyderabad. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. (Vol.4 (4), p. 653)
- European Pharmacopoeia (2005). (Quinta ed., Vol. 1, p. 1182-1183).
- Farmacopea de los Estados Unidos de América.(2013). USP 36<621>. *Cromatografía de Líquidos*.(Trigésima Sexta ed., Vol. 1, p. 292-295).
- Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2013).USP 36<1225>. *Validación de Procedimientos Farmacopeicos* (Trigésima Sexta ed., Vol. 1, p. 1093-1097).
- Gómez Ruiz, S., Quintanilla Pérez, D., Ruiz, I., & Sierra, A. (2009). Análisis Instrumental. *Términos fundamentales en análisis químico: Parámetros de calidad de los métodos analíticos* (Vol. 1, p. 5-19). Editorial Netbiblo
- Harris, D. (2006). Análisis Químico Cuantitativo. *Garantía de la calidad* (Tercera ed., pp. 723-729). (V. Berenguer, Trad.) Barcelona, Reprint: Reverte S.A.
- ICH. (2002). Validación de Métodos Analíticos, Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico.
- Instituto de Salud Pública Chile. (2010). Fundamentos de Química Analítica (Primera ed., p. 20). Santiago, Chile.



- Instituto de salud Pública (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición "aspectos generales sobre validación"* (p. 61-62). Santiago, Chile.
- Manfio J.L. (2005) *Determinação do prazo de validade do medicamento carbocisteína xarope*". Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas
- Rele R.V, Patil S.P. (2010). *Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography Technique for Determination of Carbocysteine from Pharmaceutical Formulation*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. D. G. Chem. Pharm Ruparel College, Matunga, Mumbai. (Vol. 2(4) p. 24-30)
- Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA. 11.03.39:06. *Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos*. En. MINECO, CONACYT, MIFIC, & MEIC (Eds.).
- Skoog, D., West, D., Holl, F., & Crouc, S (2003). *Fundamentos de Química Analítica* (p. 37-60). Barcelona, Reverte S.A.
- Soledad, B. (2009). *Validación en la Industria* (p. 14). lulu.com.



RUTAS DE ENLACE

- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México S.A. (s.f.). academiaedu. (M. A. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Ed.).(10 de febrero 2016) Recuperado de academiaedu: [www.academiaedu/4513278/Guia de Validación de Métodos Analíticos](http://www.academiaedu/4513278/Guia%20de%20Validaci3n%20de%20M3todos%20Anal3ticos) editada por QFB de México
- DrugBank.(s.f.).(20 de enero del 2016)Recuperado de DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB04339>
- Mejía, (2015). Hablemos de calidad. blogspot.com. (5 de junio 2016). Recuperado de <http://profmejias.blogspot.com/2015/12/hablemos-de-revision-de-conocimientos.html>
- Vidal Vademecum Spain. (3 de marzo de 2016). Recuperado de: Vidal Group Drug Information Systeme: http://www.vademecum.es/medicamentos-principio-activo-carbocisteina_2595_solo_1

ANEXOS

GLOSARIO

Analito: Sustancia (química, física o biológica) buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método.

Blanco matriz: Matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.

Coelución: El proceso mediante el cual dos o más compuestos químicos eluyen de una columna cromatográfica, al mismo tiempo, lo que hace difícil la separación e identificación.

Exactitud: Capacidad de obtener un resultado verdadero. En los ensayos cuantitativos, la exactitud expresa el grado de acuerdo entre el valor verdadero y el valor obtenido después de repetir el ensayo cierto número de veces.

Especificaciones: Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Intervalo: Amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Límite de cuantificación: El menor contenido mensurable que permite cuantificar el analito con un grado aceptable de exactitud y precisión

Límite de detección: El menor contenido mensurable del que se puede deducir la presencia del analito con un grado razonable de certeza estadística.

Linealidad: Capacidad de un método analítico de obtener resultados que son proporcionales, directamente o por medio de transformaciones matemáticas bien definidas, a la concentración o cantidad de los analitos en las muestras en un rango definido.

Matriz: Está conformado por el principio activo y los excipientes que dependerá del preparado farmacéutico.

Método analítico: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.

Muestra: Analíticamente es una parte representativa de la totalidad del material que ha de someterse a ensayo.

Precisión: Grado de acuerdo (o desacuerdo) entre los resultados independientes de ensayos obtenidos en condiciones prescritas. Por lo general depende de la concentración del analito, dependencia que debe determinarse y documentarse.

Precisión (intermedia): Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Validación: Verificación de determinados parámetros de un método en la que los requisitos especificados para estos, demuestran que el método es idóneo para un uso previsto.

Validación de un procedimiento analítico: Procedimientos para establecer pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuados para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

LISTADO DE SIGLAS

AEFI: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
(Food and Agriculture Organization por sus siglas en inglés)

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (U.S. Food and Drug Administration,)

ICH: Conferencia Internacional sobre armonización (International Conference on Harmonisation)

ISO: Organización Internacional de Normalización (“International Organization for Standardization”)

OMS: Organización Mundial de la Salud

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

S.O.: Solución Oral

USP: Farmacopea de los Estados Unidos de América

LISTADO DE ABREVIATURAS

%: Porcentaje

\bar{x} : Media aritmética de x

\bar{y} : Media aritmética de y

\hat{y} : y ponderada

$\sum xi^2$: Suma de lasxi al cuadrado

a: Intercepto

b: Pendiente

B/A: Altura del pico al 5%, entre dos veces la distancia máxima del pico hasta el borde inicial del pico

CV: Coeficiente de variación o desviación estándar relativa

CV_{y/x}: Coeficiente de variación de regresión

H₀: Hipótesis nula

H₁: Hipótesis alternativa

IC: Intervalo de confianza

K': Factor de capacidad

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

mg: Miligramos

mL: Mililitro

m.V.s: Millivoltio por segundo

m.V: Millivoltio

N: número de platos teóricos

nm: Nanómetros

p.a: Principio activo

r: Coeficiente de correlación

r²: Coeficiente de determinación

S: Desviación estándar

S²: Varianza

SCT: Suma de cuadrados total

SCE: Suma de cuadrados residual

SC_{REG}: Suma de cuadrados de la regresión

T_r: Tiempo de retención

T: Factor de cola

µg/mL: Microgramo por mililitro

µg: Microgramo

LISTADO DE ECUACIONES

Número	Especificaciones
Ecuación 1	$V_M = t_M \times F$
Ecuación 2	$N = 16(t_R / W)^2$
Ecuación 3	$p/v = H_p/H_v$
Ecuación 4	$R_{ret} = b/c$
Ecuación 5	$RRT = t_{R2}/t_{R1}$
Ecuación 6	$R_F = b/a$
Ecuación 7	$k = (t_R - t_M)/t_M$
Ecuación 8	$V_R = t_R \times F$
Ecuación 9	$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(W_1 + W_2)$
Ecuación 10	$\alpha = k_2/k_1$
Ecuación 11	$As = W_{0.05}/2f$
Ecuación 12	$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 p * q}$
Ecuación 13	$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$
Ecuación 14	$a = \bar{y} + b\bar{x}$
Ecuación 15	$r = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$
Ecuación 16	$r^2 = (r)^2$
Ecuación 17	$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$
Ecuación 18	$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$
Ecuación 19	$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$
Ecuación 20	$t_{exp} = \frac{ b }{S_b}$

Ecuación 21

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}}$$

Ecuación 22

$$S_b = \sqrt{\frac{S_r^2}{S_{xx}}}$$

Ecuación 23

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

Ecuación 24

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}}$$

Ecuación 25

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ Máxima}}{\sum S_i^2}$$

Ecuaci3n 26

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ecuaci3n 27

$$SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$$

Ecuaci3n 28

$$V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}$$

Ecuaci3n 29

$$V_{REG} = S_{y^*}^2 = \frac{\sum (y_i^* - \bar{y})^2}{N}$$

Ecuaci3n 30

$$F_{exp} = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$$

Ecuaci3n 31

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

Ecuaci3n 32

$$S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

Ecuaci3n 33

$$LOQ = \frac{3.3 \sigma}{m}$$

Ecuaci3n 34

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m}$$

Ecuaci3n 35

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{x}| * \sqrt{n}}{CV\%}$$

Ecuaci3n 36

$$\% \text{ Recuperaci3n} = \frac{\mu\text{g/mL encontrado}}{\mu\text{g/mL que se inyectaron}} * 100$$

Ecuaci3n 37

$$\text{Concentraci3n encontrada} = \frac{\text{Area del producto}}{\text{Area del Estándar}} * \text{Concentraci3n del estándar}$$

CÁLCULOS**1) Dihidrógeno fósforo monobásico de sodio 0.02 M**

$$M = \frac{n^{\circ} \text{ de moles}}{\text{volumen en L}} = 0.02 \text{ M} * 1\text{L} = 0.02 \text{ moles}$$

$$n^{\circ} \text{ de moles} = \frac{m}{PM} \therefore m = n^{\circ} \text{ de moles} * PM = 0.02 \text{ mol} * 137.94 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2.7588 \text{ g}$$

2) Preparación del estándar de carboximetilcisteína 500 µg/mL (100%)

$$\text{cantidad real} = \frac{98.9\% * 50 \text{ mg}}{100\%} = 49.45 \text{ mg}$$

$$\text{cantidad a pesar} = \frac{50 \text{ mg} * 50 \text{ mg}}{49.45 \text{ mg}} = 50.556 \text{ mg}$$

3) Preparación del estándar de carboximetilcisteína para curva de calibrado

$$\text{cantidad a pesar} = \frac{75 \text{ mg} * 50 \text{ mg}}{49.45 \text{ mg}} = 75.834 \text{ mg}$$

$$\text{concentración de la solución madre} = \frac{75 \text{ mg}}{100} * 1000 = 750 \mu\text{g/mL}$$

4) Preparación de la curva de calibrado del estándar de Carboximetilcisteína

$$\text{solucion } 80\% = \frac{400 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 13.33 \text{ mL}$$

$$\text{solucion } 90\% = \frac{450 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 15 \text{ mL}$$

$$\text{solucion } 100\% = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 16.65 \text{ mL}$$

$$\text{solucion } 110\% = \frac{550 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 18.32 \text{ mL}$$

$$\text{solucion } 120\% = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 20 \text{ mL}$$

5) Preparación de la muestra de carboximetilcisteína 50 mg/mL

$$\text{cantidad real} = \frac{1 \text{ mL} * 50 \text{ mg}}{49.45 \text{ mg}} = 1.011 \text{ mL}$$

6) Preparación de la muestra de carboximetilcisteína 50 mg/mL para curva de calibrado

$$\text{aliquota a tomar} = \frac{1 \text{ mL} * 75 \text{ mg}}{49.45 \text{ mg}} = 1.516 \text{ mL}$$

7) Preparación de la curva de calibrado de la muestra de Carboximetilcisteína

$$\text{solución } 80\% = \frac{400 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 13.33 \text{ mL}$$

$$\text{solución } 90\% = \frac{450 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 15 \text{ mL}$$

$$\text{solución } 100\% = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 16.65 \text{ mL}$$

$$\text{solución } 110\% = \frac{550 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 18.32 \text{ mL}$$

$$\text{solución } 120\% = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 25 \text{ mL}}{750 \mu\text{g/mL}} = 20 \text{ mL}$$

8) Solución placebo cargado al 80%

$$\text{cantidad de estándar a pesar} = \frac{400 \mu\text{g/mL} * 50.556 \text{ mg}}{500 \mu\text{g/mL}} = 40.44 \text{ mg}$$

$$\text{mL de placebo} = \frac{400 \mu\text{g/mL} * 1.011 \text{ mL}}{500 \mu\text{g/mL}} = 0.810 \text{ mL}$$

9) Solución placebo cargado al 100%

$$\text{cantidad de estándar a pesar} = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 50.556 \text{ mg}}{500 \mu\text{g/mL}} = 50.556 \text{ mg}$$

$$\text{mL de placebo} = \frac{500 \mu\text{g/mL} * 1.011 \text{ mL}}{500 \mu\text{g/mL}} = 1.011 \text{ mL}$$

10) Solución placebo cargado al 120%

$$\text{cantidad de estándar a pesar} = \frac{600 \mu\text{g/mL} * 50.556 \text{ mg}}{500 \mu\text{g/mL}} = 60.67 \text{ mg}$$

$$\text{mL de placebo} = \frac{600 \mu\text{g/mL} * 1.011 \text{ mL}}{500 \mu\text{g/mL}} = 1.213 \text{ mL}$$

11) Cálculo para número de platos teóricos (N)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 16 (2.5900/0.1590)^2 = 4245.4650$$

t_R : Tiempo de retención

W: Ancho del pico en su base

12) Cálculo para factor de cola o factor de asimetría (B/A)

$$B/A = \frac{W_{0.05}}{f} = \frac{2.9000}{8.2000} = 0.3537$$

$W_{0.05}$: Ancho del pico al 5% de la altura

f: Es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico.

13) Cálculo factor de capacidad (K)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{2.5910 - 1.2000}{1.2000} = 1.1592$$

1. IDONEIDAD DEL MÉTODO EN CLAR

Figura 1.1. Idoneidad del método para la cuantificación de carboximetilcisteína 50 mg/mL solución oral (Estándar vs Placebo)

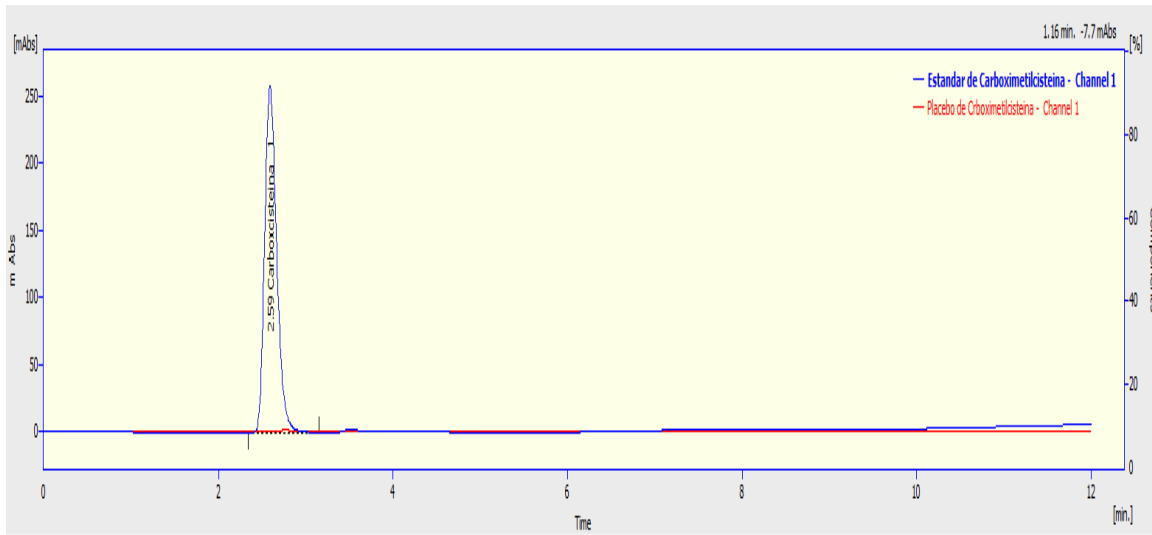
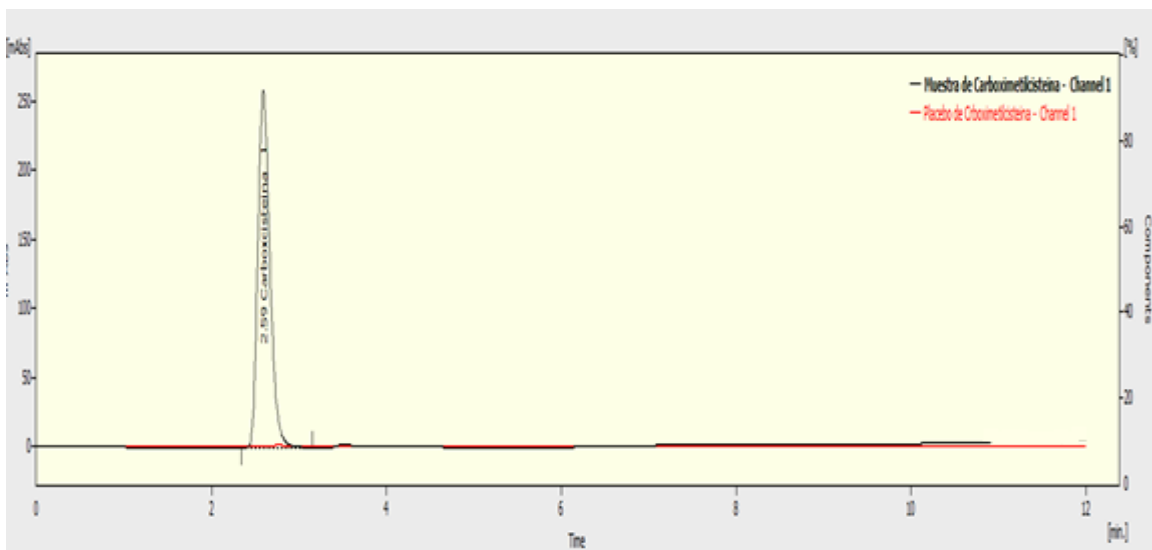


Figura 1.2. Idoneidad del método para la cuantificación de carboximetilcisteína 50 mg/mL solución oral (Muestra vs Placebo)



Fuente: Software YLClarity Chromatography SW

2. CURVA DE CALIBRADO DEL SISTEMA DE CLAR

Figura 2.1. Curva de Calibrado del Sistema

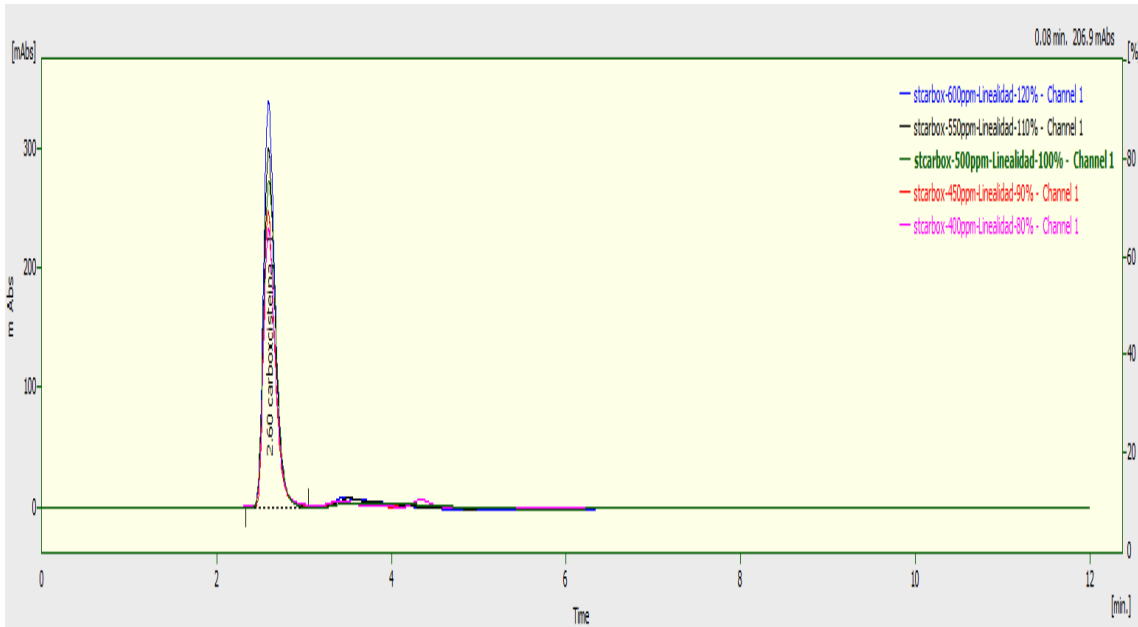
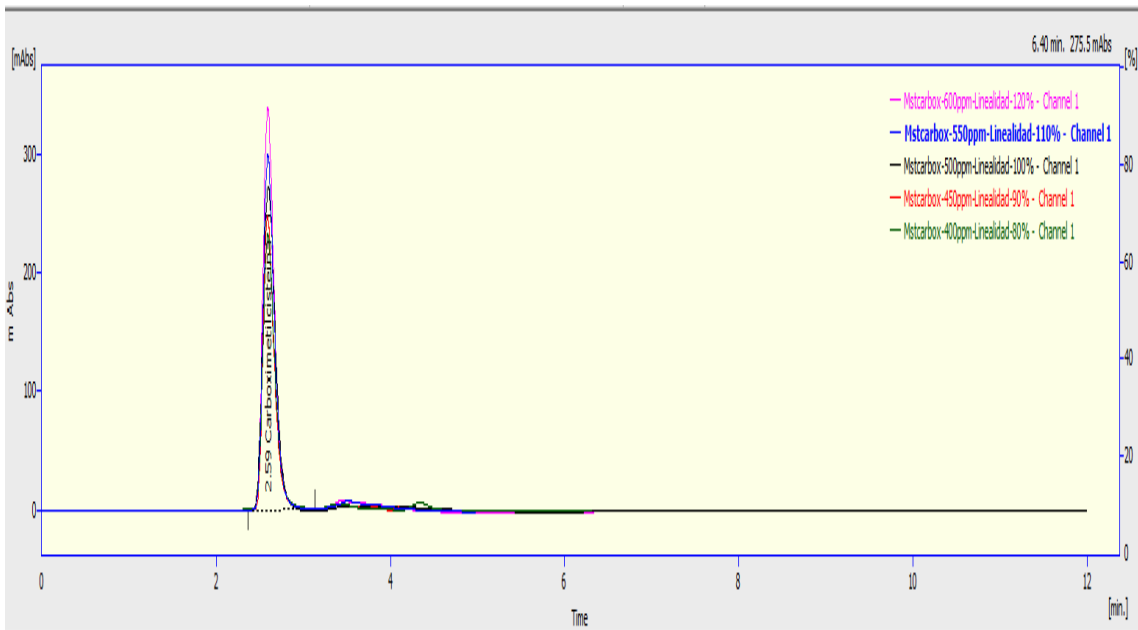


Figura 2.2. Curva de Calibrado del Método



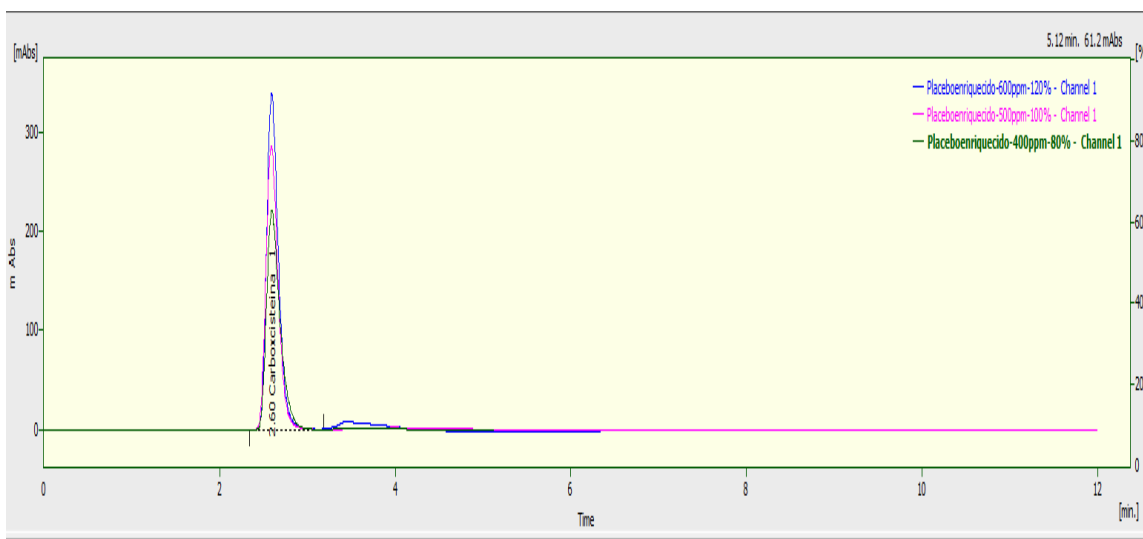
Fuente: Software YLClarity Chromatography SW

3. EXACTITUD EN CLARDE CARBOXIMETILCISTEÍNA

50 mg/mL

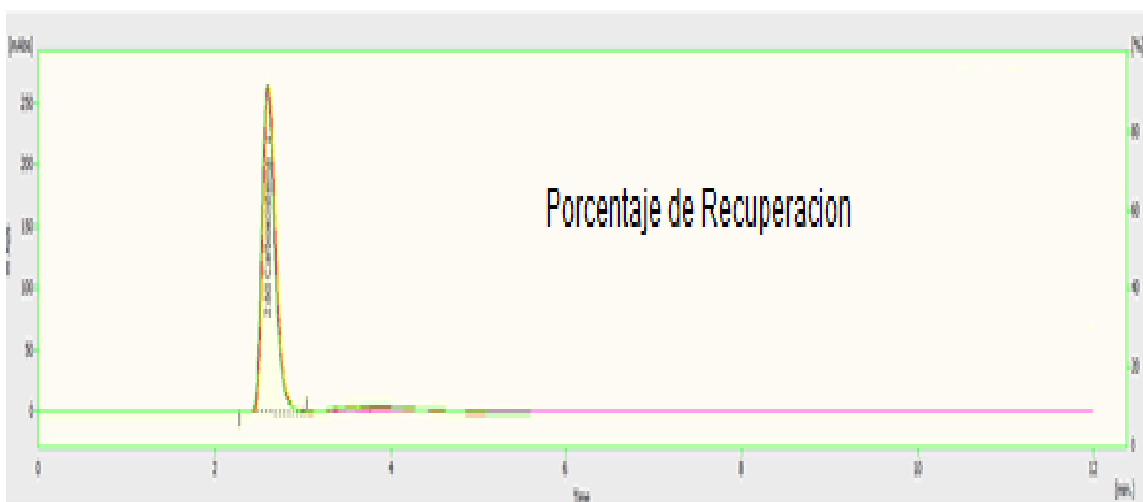
3.1. Exactitud del Sistema

Figura 3.2. Exactitud del sistema placebo cargado



3.3 Exactitud del Método

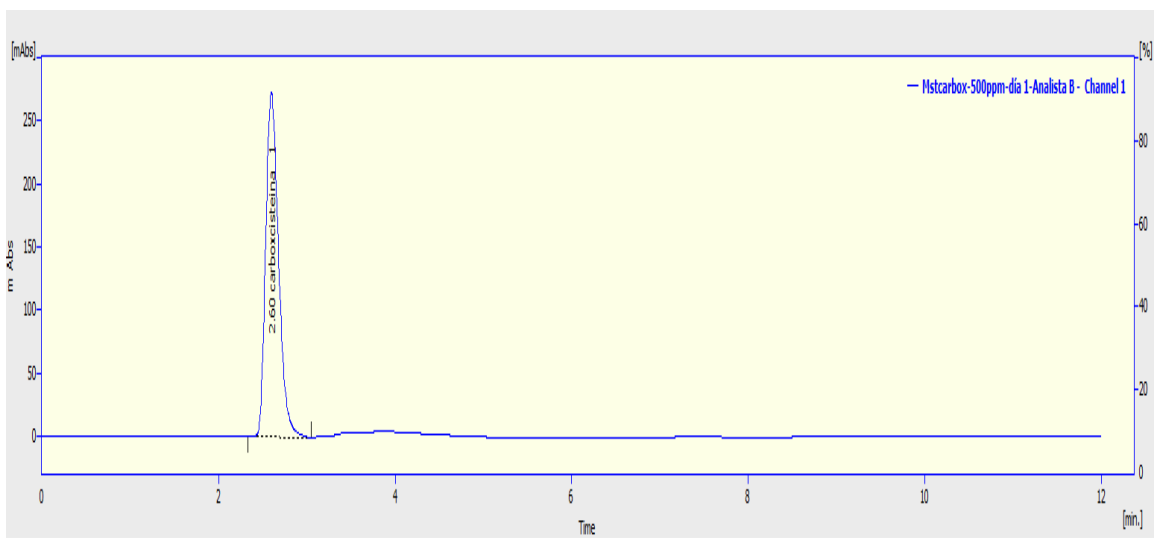
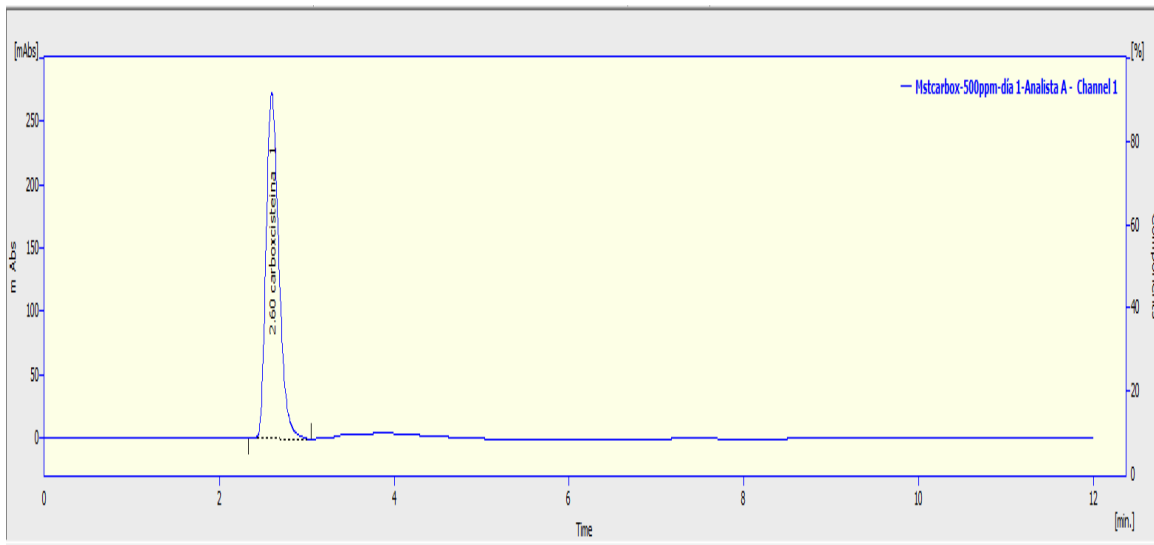
Figura 3.4 Porcentaje de recuperación



Fuente: Software YLClarity Chromatography SW

4. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE CARBOXIMETILCISTEÍNA 50mg/mL (DÍA 1)

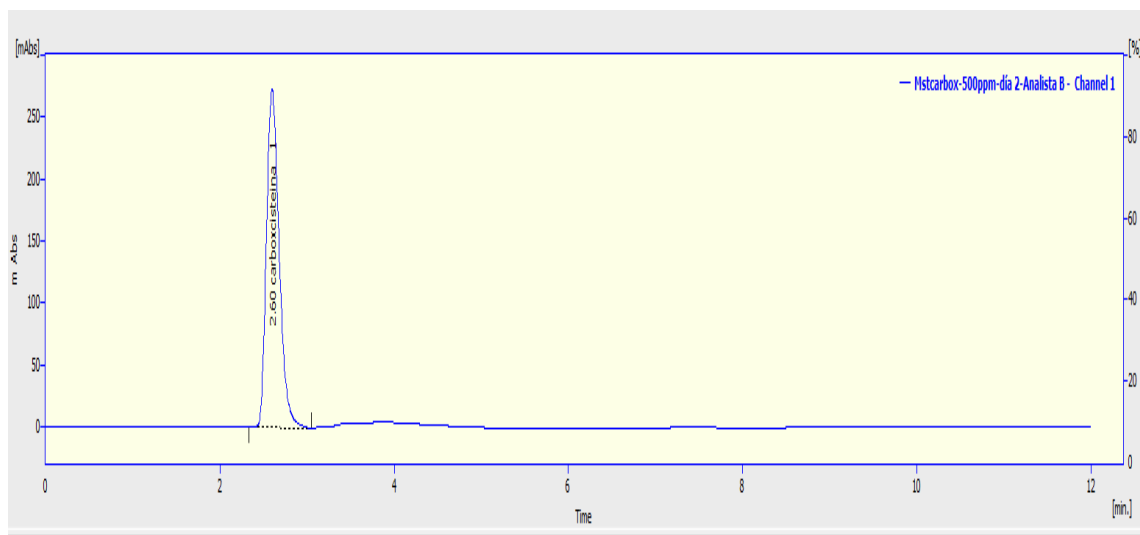
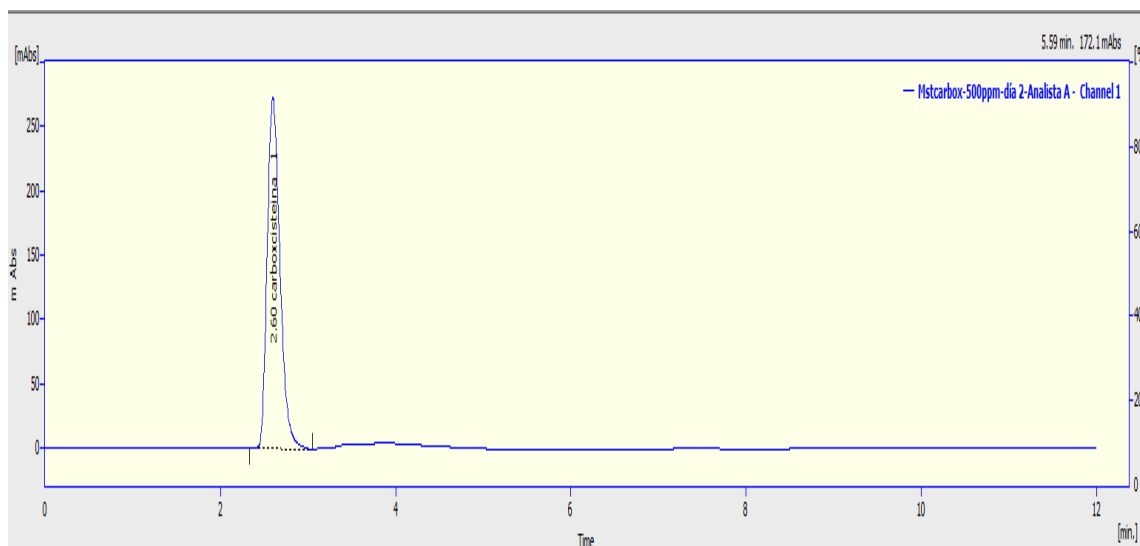
Figura 4.1. Precisión intermedia, inter-analista, día 1



Fuente: Software YLClarity Chromatography SW

5. PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO DE CARBOXIMETILCISTEÍNA 50 mg/mL (DÍA 2)

Figura 4.2. Precisión intermedia, inter-analista, día 2



Fuente: Software YLClarity Chromatography SW

ANEXO XI

Balanza analítica Kern ACS 220-4



Bomba al vacío Value V-i220SV

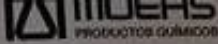


ANEXO XII


Dispositivo de Nylon para jeringa 0.45 μm



Certificado de análisis de carboximetilcisteína del proveedor

Polígono Industrial Aquibella C/ Zeno, 12 - 08255 Castellbisbal (BARCELONA - SPAIN) Tel. (34) 93 566 06 20 Fax (34) 93 566 85 13		 PRODUCTOS QUÍMICOS
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
Product: CARBOCISTEINE Ph. Eur. 8 Batch Nr: 98 Manufacture: 12/2014 Re-test Date: 12/2019 Client: QUIRSA GROUP SINOPIA, S.A. Shipment (Kg): 500.00 Pack: 10		Code: 15192
TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
CHARACTERS	Conforms Ph.Eur.	Conforms
IDENTIFICATION Specific optical rotation IR Spectrum	Complies Conforms to St	Conforms Conforms
TESTS Aspect of solution pH Specific optical rotation Ninhydrin-positive substances Each impurity Chloride Sulfate Heavy metals Loss on drying Sulfated ash	Clear and colourless 2.8 to 3.0 -32.5° to -35.5° Maximum 0.5 p.cent Max 0.15 p.cent (1500ppm) Maximum 300 ppm (0.03%) Maximum 10 ppm (0.001%) Maximum 0.5 p.cent Maximum 0.3 p.cent	Conforms 2.84 -34.4° < 0.5 p.cent < 0.15 p.cent < 300 ppm < 10 ppm 0.11 p.cent 0.16 p.cent
ASSAY .Potentiom. (on dried subs.)	98.5 to 101.0 p.cent	98.9 p.cent
ADDITIONAL TESTS l-Cysteine Zinc Phosphates (periodic test)	 Maximum 0.15 p.cent Maximum 10 ppm Maximum 250 ppm (0.025%)	 Conforms Conforms < 250 ppm
<p>We hereby certify that the above information is authentic and accurate. This batch has been manufactured, including packaging and quality control, in the above mentioned site in full compliance with the GMP requirements. The batch processing, packaging and analysis records were reviewed and found to be in compliance with ICH Q7, EU GMP Part II and 21 CFR Parts 210 & 211.</p>		
Released by QA on 18/12/2014 CoA issued on 09/09/2015 Signed by Quality Control		Pag.: 1/1

Certificado de análisis de carboximetilcisteína de Laboratorios SOLKA S.A.



CONTROL DE CALIDAD
Informe de Análisis de Materia Prima

Nombre del Producto: Carboximetilcisteína IR #: 19327 No. de Análisis: 1603041
 Código: 11-1524 Fecha de Ingreso: 01-01-16 Vencimiento: 1-12-19
 Proveedor: SOLKA S.A. Lote del Proveedor: 98
 Certif. Anál. Prov.: Si No Cantidad recibida: (U/M) 0.200kg En U/Embalaje: Paquete
 Cantidad Muestrada en Fcos.: 20g Fecha de Análisis: 4-03-16 Fecha de Reanálisis: 11-19

DETERMINACIONES	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Descripción	<u> cumple </u>	<u> Polvo fino, blanco, color blanco </u>
Solubilidad	<u> cumple </u>	<u> Insoluble en agua, alcohol, soluble HCl y NaOH </u>
Identificación (s)	<u> cumple </u>	
Pérdida por Secado	<u> 0.49 % </u>	<u> IN.M.D 0.5 % </u>
Residuo por Ignición		
Humedad		
Densidad		
Punto de Fusión		
Índice de Refracción		
Rotación Óptica	<u> Equivo en mal estado </u>	
pH	<u> 7.1 </u>	<u> 2.8-7.5 </u>
Viscosidad		
Sustancias Relacionadas		
Acidez		
Alcalinidad		
Claridad y Color de Solución	<u> Corresponde </u>	<u> Clara, como inmersa en solución 0.5% 29 </u>
Valoración Base Húmeda	<u> 100.65 % </u>	<u> 98.5 - 101.6 % (HPLC) </u>
Valoración Base Seca		

OTROS ANALISIS

Condiciones de la Valoración:

- Etiqueta: Carboximetilcisteína
- Descripción: Carboximetilcisteína sódica oral
- Columna: C18
- Fase móvil: agua HPLC + Hexa-Ac + Metanol
- Detección: 210
- Temperatura: 25°C
- Flujómetro: 1.000
- Flujo: 0.5 ml/min

probado: A Rechazado: En contenedores hermeticos bien cerrados Analista: J.A-02-088-058-016

BSERVACIONES:

BLOGRAFÍA:

- BP 93 Digital
- Certificado del proveedor
- Clarko analizador de Drogas, Digital

RESP. CONTROL QUIMICO: [Signature] 04/03/16 03:30 PM GERENTE DE CONTROL DE CALIDAD: [Signature]

ANEXO XV

REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA

11.03.39.06

ANEXO DE LA RESOLUCIÓN No. 188-2006 (COMIECO-XL)

**REGLAMENTO
TÉCNICO
CENTROAMERICANO**

RTCA 11.03.39: 06

**PRODUCTOS FARMACÉUTICOS. VALIDACIÓN DE
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
MEDICAMENTOS**

Correspondencia: No hay correspondencia con ninguna norma internacional

ICS 11.120.01

RTCA 11.03.39:06

Reglamento Técnico Centroamericano editado por:

**Ministerio de Economía, MINECO
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT
Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC
Secretaría de Industria y Comercio, SIC
Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC**

INFORME

Los respectivos Comités Técnicos de Normalización y de Reglamentación Técnica a través de los Entes de Normalización y de Reglamentación Técnica de los Estados Parte del Protocolo de Guatemala y sus sucesores, son los organismos encargados de realizar el estudio o la adopción de los Reglamentos Técnicos. Están conformados por representantes de los sectores Académico, Consumidor, Empresa Privada y Gobierno.

Este documento fue aprobado como Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.39:06, Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos, por los Subgrupos de Medidas de Normalización y de Medicamentos y Productos Afines de los Países de la Región Centroamericana. La oficialización de este reglamento técnico, conlleva la aprobación por el Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica (COMIECO)

MIEMBROS PARTICIPANTES DEL SUBGRUPO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS AFINES**Por Guatemala**

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Por El Salvador

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Consejo Superior de Salud Pública

Por Nicaragua

Ministerio de Salud

Por Honduras

Secretaría de Salud

Por Costa Rica

Ministerio de Salud

1. OBJETO

Este reglamento técnico tiene por objeto establecer las directrices para la validación de métodos analíticos fisicoquímicos y microbiológicos utilizados en el control de calidad de medicamentos.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Las directrices del presente reglamento técnico deben ser aplicadas a todos los métodos analíticos no oficiales y oficiales utilizados para el control de calidad de medicamentos con el objetivo de cumplir las normativas vigentes de buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio. Los laboratorios de control de calidad que utilizan métodos analíticos oficiales deben únicamente comprobar la linealidad y precisión del sistema.

3. DEFINICIONES

3.1 Autoridad reguladora: Ente responsable del Registro Sanitario y/o Vigilancia Sanitaria de cada Estado Parte.

3.2 Especificidad; selectividad: Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra.

3.3 Exactitud; veracidad: Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.

3.4 Impurezas: Sustancias ajenas a la fórmula cuali-cuantitativa que pueden provenir de los procesos de fabricación y de almacenamiento, incluyendo la degradación de las materias primas (principios activos y productos farmacéuticos auxiliares) y formas de dosificación. La presencia de contaminantes en el producto terminado es indicativa del incumplimiento de las buenas prácticas de fabricación. Estos contaminantes se consideran en algunos casos impurezas y pueden establecerse límites para los mismos.

3.5 Intervalo: amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe

3.6 Límite de cuantificación: Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro

del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de, impurezas y productos de degradación.

3.7 Límite de detección: Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.

3.8 Linealidad: capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

3.9 Método analítico: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.

3.10 Microorganismos viables: Organismos microscópicos como bacterias y hongos con capacidad de reproducción y dan lugar a la formación de colonias.

3.11 Neutralización: Proceso que bloquea el efecto de un agente preservante por la adición de un agente químico o por dilución.

3.12 Parámetros de desempeño analítico; parámetros de mérito o elementos requeridos para el ensayo de validación: Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.

3.13 Precisión: Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen tres formas de determinación: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

3.14 Procedimiento analítico: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico.

3.15 Procedimiento analítico oficial: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico estandarizado y validado contenido en las bibliografías de referencias oficiales, según listado armonizado por los Países de la Región Centroamericana (Resolución 93-2002, COMIECO 24, Septiembre 2002)

3.16 Procedimiento analítico no oficial: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico desarrollado por el fabricante para la verificación de la calidad de su producto.

3.17 Prueba de detección de microorganismos patógenos: Determina la presencia de microorganismos nocivos específicos en una muestra.

3.18 Prueba de efectividad antimicrobiana: Determina la efectividad de los agentes preservantes en la muestra.

3.19 Prueba de esterilidad: Determinación de la ausencia de microorganismos viables en la muestra.

3.20 Prueba de límite microbiano: Es el recuento de los microorganismos viables presentes en una muestra no estéril, para determinar si se encuentra dentro de los límites establecidos

3.21 Prueba de promoción del crecimiento: Determina la capacidad del medio de cultivo para permitir el crecimiento de determinados microorganismos viables.

3.22 Prueba de recuperación microbiológica: Determina la neutralización provocada por los agentes preservantes u otros agentes que causen inhibición del crecimiento de microorganismos viables.

3.23 Validación: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

3.24 Validación de un procedimiento analítico: Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS QUE SON OBJETO DE VALIDACIÓN

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

4.1 Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

4.2 Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar con

exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.

4.3 Categoría III: pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir

4.4 Categoría IV: pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.

4.5 Pruebas microbiológicas: aquellas que se realizan para asegurar la calidad microbiana del medicamento.

Los parámetros de mérito para cada categoría de prueba se detallan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos y potencia microbiológica.

Categoría de prueba Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
	Principio(s) activo(s)	Prueba de límite Cuantitativa	Prueba de límite Cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.

Tabla 2. Parámetros de desempeño de los procedimientos microbiológicos

Parámetro de desempeño \ Tipo de prueba	Límite microbiano y detección de microorganismos patógenos	Esterilidad	Efectividad antimicrobiana
Efectividad del medio de cultivo (Promoción de crecimiento)	SI	SI	SI
Efectividad del método de neutralización de los agentes preservantes	SI	SI	SI

5. DE LA DOCUMENTACIÓN QUE DEBE PRESENTARSE PARA LA REVISIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS VALIDADOS

Para la revisión por parte de la Autoridad Reguladora de los métodos validados, el informe del estudio de validación debe contener la siguiente documentación:

- a. Descripción detallada del procedimiento analítico.
- b. Descripción de los parámetros de desempeño evaluados según las tablas 1 y 2.
- c. Evaluación y cálculos estadísticos para la verificación de los parámetros de desempeño.
- d. Resumen de los resultados instrumentales obtenidos (áreas o absorbancias impresas).
- e. Resumen de los resultados de la validación obligatoriamente en idioma español/castellano o debidamente traducido.
- f. Conclusiones deben ser obligatoriamente entregadas en idioma español/castellano o debidamente traducidas.

6. RECHAZO DE LA DOCUMENTACIÓN PRESENTADA

La documentación presentada será rechazada si se detectan incongruencias técnicas o científicas, inadecuado soporte estadístico de las conclusiones o fallas en el diseño experimental o en la realización de la validación. Una vez comunicado por la Autoridad Reguladora el rechazo de una documentación de validación, el interesado cuenta con el tiempo establecido por la legislación propia de cada país de la Región Centroamericana para resolver la inconformidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Q2 (R1)
Step 4 version, Nov 2005.

Validation of Compendial Methods. General Chapter <1225> <1227> US
Pharmacopeia 29, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville
MD.2006.

- ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Glosario de Medicamentos, Desarrollo Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud.- Washington D.C.: OPS, c1999,

8. VIGILANCIA Y VERIFICACIÓN

La vigilancia y verificación de este reglamento técnico corresponde a la Autoridad Reguladora de cada país.

9. TRANSITORIO

Este reglamento entrará en vigencia doce meses después de la fecha de la firma de la resolución COMIECO.

ANEXO XVI

**CAPÍTULO GENERAL DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN USP 36**

Índice de Compresibilidad—Calcular por la fórmula:

$$100(V_0 - V_f)/V_0$$

V_0 = volumen aparente sin asentar

V_f = volumen final asentado

Índice de Hausner—

$$V_0/V_f$$

Dependiendo del material, el índice de compresibilidad se puede determinar usando V_{10} en vez de V_0 . [NOTA—Si se usa V_{10} , debe especificarse claramente en los resultados.]

(621) CROMATOGRFÍA

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar empacada en una columna, extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico. La separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico; o puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen. Este capítulo contiene procedimientos generales, definiciones y cálculos de parámetros comunes y describe requisitos generales para aptitud del sistema. Los tipos de cromatografía útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo que se emplean en los procedimientos cromatográficos de la USP son: cromatografía en columna, de gases, en papel, en capa delgada (incluyendo la cromatografía en capa delgada de alta resolución) y de líquidos presurizados (comúnmente llamada cromatografía líquida de alta presión o alta resolución).

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Esta sección describe los procedimientos básicos usados cuando se describe un método cromatográfico en una monografía. Se deben seguir los siguientes procedimientos a menos que se indique algo distinto en la monografía individual.

Cromatografía en Papel

Fase Estacionaria: La fase estacionaria es una hoja de papel de textura y espesor adecuados. El desarrollo puede ser ascendente, en cuyo caso el disolvente se desplaza hacia arriba por el papel mediante fuerzas de capilaridad, o descendente, en cuyo caso el flujo del disolvente se ve ayudado por la fuerza de gravedad. La orientación de las fibras del papel con respecto al flujo del disolvente se debe mantener constante en una serie de cromatogramas. (Por lo general, el fabricante indica la dirección de máquina).

Aparato: El equipo esencial para cromatografía en papel comprende una cámara hermética al vapor provista de entradas para agregar el disolvente y una gradilla de material resistente a la corrosión aproximadamente 5 cm más

corta que la altura interior de la cámara. La gradilla sirve como soporte para la cubeta de disolvente y para las varillas antisifón que, a su vez, sostienen las hojas cromatográficas. El fondo de la cámara está cubierto con la mezcla de disolventes o fase móvil indicada. La saturación de la cámara con el vapor del disolvente se facilita revistiendo las paredes del interior con un papel humedecido con la fase móvil indicada.

Siembra: La sustancia o sustancias a ser analizadas se disuelven en un disolvente adecuado. Se aplican volúmenes convenientes, medidos con micropipetas adecuadas, de la solución resultante que contengan normalmente de 1–20 µg del compuesto, en zonas de 6 a 10 mm de diámetro y con una separación de no menos de 3 cm.

Procedimiento para Cromatografía Descendente en Papel

- (1) Suspendir la hoja cromatográfica sembrada en el aparato, usando la varilla antisifón para sostener el extremo superior de la hoja en la cubeta de disolvente. [NOTA—Asegurar que la porción de la hoja que cuelga por debajo de las varillas esté suspendida libremente en la cámara sin tocar la gradilla o las paredes de la cámara o el líquido que está en el interior de la cámara.]
- (2) La cámara se sella para permitir su equilibrio (saturación) y el del papel con el vapor del disolvente. Liberar cualquier exceso de presión, si fuera necesario.
- (3) Después de equilibrar la cámara, la fase móvil previamente preparada se introduce en la cubeta a través de la entrada.
- (4) Cerrar la entrada y dejar que la fase móvil se desplace hacia abajo la distancia deseada sobre el papel.
- (5) Retirar la hoja de la cámara.
- (6) Marcar rápidamente la ubicación de la fase móvil y secar la hoja.
- (7) Observar el cromatograma y medir directamente o después del revelado adecuado para localizar las manchas del fármaco o de los fármacos aislados.

Procedimiento para Cromatografía Ascendente en Papel

- (1) Agregar la fase móvil al fondo de la cámara.
- (2) La cámara se sella para permitir su equilibrio (saturación) y el del papel con el vapor del disolvente. Liberar cualquier exceso de presión, si fuera necesario.
- (3) Sumergir el borde inferior de la fase estacionaria en la fase móvil para permitir que la fase móvil ascienda en la hoja cromatográfica por capilaridad.
- (4) Cuando la fase móvil haya alcanzado la altura deseada, abrir la cámara, retirar la hoja, marcar rápidamente la ubicación del frente de la fase móvil, y secar la hoja.
- (5) Observar el cromatograma y medir directamente o después del revelado adecuado para localizar las manchas del fármaco o de los fármacos aislados.

Cromatografía en Capa Delgada

Fase Estacionaria: La fase estacionaria es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco y reducido a polvo fino que se aplica sobre una lámina o placa de vidrio, plástico o metal (generalmente conocida como la placa). La fase estacionaria para TLC tiene un tamaño de partícula promedio de 10–15 µm, y la de TLC de alta resolución (HPTLC) tiene un tamaño de partícula promedio de 5 µm. Se pueden usar placas disponibles comercialmente con una zona preadsorbente si se especifican en una monografía. La muestra aplicada a la región preadsorbente se desarrolla en forma de bandas estrechas y definidas en la interfase entre el preadsorbente y el sorbente. Las separaciones logradas pueden basarse en la adsorción, la partición o una combinación de ambos efectos, según el tipo específico de fase estacionaria.

Aparato: Usar una cámara cromatográfica de material inerte y transparente con las siguientes especificaciones: una

cubeta de fondo plano o cubetas gemelas, una tapa que cierre herméticamente y un tamaño adecuado para las placas. Revestir como mínimo una pared de la cámara cromatográfica con papel de filtro. Agregar una cantidad suficiente de fase móvil a la cámara cromatográfica de modo que proporcione, después de impregnar el papel de filtro, un nivel de profundidad apropiado a la dimensión de la placa utilizada. Cerrar la cámara cromatográfica y dejar que se equilibre. [NOTA—A menos que se indique algo diferente, las separaciones se realizan en una cámara saturada.]

Detección/Visualización: A menudo se usa una fuente de luz ultravioleta (UV) adecuada para observaciones bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), así como una variedad de soluciones reveladoras para visualizar las manchas.

Siembra: Aplicar las soluciones en forma de zonas sobre la superficie de la fase estacionaria (placa) en el volumen prescrito en porciones lo suficientemente pequeñas para obtener manchas circulares de 2–5 mm de diámetro (1–2 mm sobre placas de HPTLC) o bandas de 10–20 mm × 1–2 mm (5–10 mm × 0,5–1 mm sobre placas de HPTLC) a una distancia adecuada del borde inferior y de los bordes laterales de la placa. [NOTA—Durante el desarrollo, la posición de la aplicación debe estar por lo menos 5 mm (TLC) o 3 mm (HPTLC) por encima del nivel de la fase móvil.] Aplicar las soluciones sobre una línea paralela al borde inferior de la placa con una separación mínima de 10 mm (5 mm en placas de HPTLC) entre los centros de las manchas o 4 mm (2 mm en placas de HPTLC) entre los bordes de las bandas y dejar que se sequen.

Procedimiento

- (1) Colocar la placa en la cámara, asegurando que las manchas o bandas estén por encima de la superficie de la fase móvil.
- (2) Cerrar la cámara.
- (3) Dejar que la fase móvil ascienda en la placa hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido tres cuartos de la longitud de la placa o la distancia indicada en la monografía.
- (4) Retirar la placa, marcar el frente de la fase móvil con un lápiz, y dejar que se seque.
- (5) Visualizar los cromatogramas según se indica.
- (6) Determinar los valores del factor de retardo cromatográfico (R_f) para las manchas o zonas principales.
- (7) Se puede realizar una identificación presuntiva mediante la observación de las manchas o zonas con valores R_f idénticos y de magnitud similar, obtenidas respectivamente cromatografiando una muestra desconocida y un estándar en la misma placa. Una comparación visual del tamaño o intensidad de las manchas o zonas puede servir para una estimación semicuantitativa. Las mediciones cuantitativas se pueden efectuar mediante densitometría (mediciones de absorbancia o fluorescencia).

Cromatografía en Columna

Soporte Sólido: Usar tierra silíceá purificada para separación de fase normal. Usar tierra silíceá cromatográfica silanizada para cromatografía de partición en fase reversa.

Fase Estacionaria: Modificar el soporte sólido agregando la fase estacionaria especificada en la monografía individual. Si se emplea una mezcla de líquidos como fase estacionaria, mezclarlos antes de la introducción del soporte sólido.

Fase móvil: La fase móvil se especifica en la monografía individual. Si la fase estacionaria es una solución acuosa, equilibrar con agua. Si la fase estacionaria es un líquido orgánico polar, equilibrar con ese líquido.

Aparato: A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, el tubo cromatográfico tiene un diámetro interno de aproximadamente 22 mm y una longitud de 200–300 mm. Acoplado al tubo cromatográfico se

encuentra un tubo de salida sin llave de paso con un diámetro interno de aproximadamente 4 mm y una longitud de 50 mm.

PREPARACIÓN DEL APARATO: Apisonar un trozo de lana de vidrio fina en la base del tubo. Combinar el volumen especificado de fase estacionaria y la cantidad especificada de soporte sólido para producir una mezcla homogénea y liviana. Transferir esta mezcla al tubo cromatográfico y apisonar empleando presión suave, hasta obtener una masa uniforme. Si la cantidad especificada de soporte sólido es más de 3 g, transferir la mezcla a la columna en porciones de aproximadamente 2 g y apisonar cada porción. Si la valoración o la prueba requieren una columna multisegmentada, con una fase estacionaria diferente especificada para cada segmento, apisonar después de la adición de cada segmento y agregar cada segmento directamente sobre el anterior. Colocar un trozo de lana de vidrio fina por encima del relleno de la columna. [NOTA—La fase móvil debe fluir a través de una columna rellena como una corriente moderada o, si se lleva a cabo una cromatografía en fase reversa, como un goteo lento.]

Si se incorpora la solución del analito en la fase estacionaria, completar la transferencia cuantitativa al tubo cromatográfico raspando el vaso de precipitados usado para la preparación de la mezcla de prueba con una mezcla de aproximadamente 1 g de *Soporte Sólido* y varias gotas del disolvente usado para preparar la solución muestra antes de agregar el trozo final de lana de vidrio por encima del relleno.

Procedimiento

- (1) Transferir la fase móvil al espacio de la columna por encima del relleno y dejar que fluya a través de la columna por acción de la gravedad.
- (2) Enjuagar la punta de la columna cromatográfica con aproximadamente 1 mL de fase móvil antes de cada cambio en la composición de la fase móvil y después de completar la elución.
- (3) Si se introduce el analito en la columna como una solución en la fase móvil, dejar que pase completamente al relleno de la columna, luego agregar fase móvil en varias porciones pequeñas, dejando que cada porción drene completamente, antes de agregar el grueso de la fase móvil.
- (4) Cuando el procedimiento indique el uso de múltiples columnas cromatográficas montadas en serie y se especifique la adición de fase móvil en porciones divididas, dejar que cada porción drene por completo a través de cada columna, y enjuagar la punta de la columna con fase móvil antes de la adición de cada porción sucesiva.

Cromatografía de Gases (GC)

Fase Estacionaria Líquida: Este tipo de fase está disponible en columnas rellenas o capilares.

Cromatografía de Gases en Columna Rellena: La fase estacionaria líquida se deposita sobre un soporte sólido inerte finamente dividido, como por ejemplo tierra de diatomeas, polímeros porosos, o carbono grafito, con el que se rellena la columna que por lo regular tiene un diámetro interno de 2–4 mm y una longitud de 1–3 m.

Cromatografía de Gases en Columna Capilar: En las columnas capilares, las cuales no están rellenas con soporte sólido, la fase estacionaria líquida se deposita sobre la superficie interna de la columna y puede unirse químicamente a ella.

Fase Estacionaria Sólida: Este tipo de fase está disponible únicamente en columnas rellenas. En estas columnas, la fase sólida es un adsorbente activo, como por ejemplo alúmina, sílice o carbono, con el que se rellena una columna. Las resinas poliaromáticas porosas, que a veces se emplean en las columnas rellenas, no se recubren con una fase líquida. [NOTA—Las columnas capilares y rellenas deben acon-

dicionarse antes del uso, hasta que la línea base y otras características sean estables. Los distribuidores de columnas y materiales de relleno proveen instrucciones relativas al acondicionamiento recomendado.]

Aparato: Un cromatógrafo de gases consta de una fuente de gas transportador, un inyector, una columna, un detector y un dispositivo registrador. El inyector, la columna y el detector tienen temperaturas controladas y se puede variar como parte del análisis. Los gases transportadores típicos son helio, nitrógeno o hidrógeno, dependiendo de la columna y el detector en uso. El tipo de detector que se usa depende de la naturaleza de los compuestos que se analizan y se especifica en la monografía individual. La señal de salida de los detectores se registra como la respuesta del instrumento en función del tiempo y la medida del área o altura del pico, es una función de la cantidad presente.

Programa de Temperatura: La longitud y la calidad de una separación por GC se pueden controlar alterando la temperatura de la columna cromatográfica. Cuando sea necesario un programa de temperatura, la monografía individual indica las condiciones en formato de tabla. La tabla indica la temperatura inicial, la velocidad de cambio de temperatura (rampa), la temperatura final y el tiempo de espera (hold time) a la temperatura final.

Procedimiento

- (1) Equilibrar la columna, el inyector y el detector con un flujo de gas transportador hasta obtener una señal constante.
- (2) Inyectar una muestra a través del septo del inyector, o usar un muestreador automático.
- (3) Comenzar el programa de temperatura.
- (4) Registrar el cromatograma.
- (5) Analizar según se indica en la monografía.

Cromatografía de Líquidos (HPLC)

El término *cromatografía de líquidos*, según se usa en los compendios, es sinónimo de cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

Fase Estacionaria: Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga. El tipo de relleno específico necesario para completar un análisis se indica mediante la designación "L" en la monografía individual (ver también la sección *Columnas Cromatográficas* más adelante). A menudo, el tamaño de las microperlas también se describe en la monografía. Los cambios en el tipo y tamaño de relleno se analizan en la sección *Aptitud del Sistema* de este capítulo.

Columna Cromatográfica: El término *columna* incluye columnas de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro de la columna afectan la separación y, por lo tanto, las dimensiones típicas de la columna se incluyen en la monografía individual. Los cambios en las dimensiones de la columna se analizan en la sección *Aptitud del Sistema* de este capítulo. Las monografías farmacopeicas no incluyen el nombre comercial de las columnas apropiadas; esta omisión evita la interpretación de cualquier tipo de respaldo para un producto de un proveedor y permite la adaptación a cambios normales en el mercado. Ver la sección *Columnas Cromatográficas* para más información.

Fase Móvil: La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la monografía individual.

Aparato: Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar

el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.

Elución en Gradiente: Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.

Procedimiento

- (1) Equilibrar la columna y el detector con fase móvil a la velocidad de flujo especificada hasta obtener una señal constante.
- (2) Inyectar una muestra a través del inyector o usar un muestreador automático.
- (3) Comenzar el programa de gradientes.
- (4) Registrar el cromatograma.
- (5) Analizar según se indica en la monografía.

COLUMNAS CROMATGRÁFICAS

Una lista completa de rellenos (L), fases (G) y soportes (S) usados en las pruebas y valoraciones de USP-NF se encuentra en la sección *Reactivos, Indicadores y Soluciones—Columnas Cromatográficas* de USP-NF y PF. Esta lista pretende ser una referencia útil para el técnico en cromatografía en la identificación de la columna cromatográfica correspondiente especificada en la monografía individual.

DEFINICIONES E INTERPRETACIÓN DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma: Un cromatograma es una representación gráfica de la respuesta del detector, concentración de analito en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del efluente en función del volumen de efluente o del tiempo. En la cromatografía planar se puede usar el término, *cromatograma* para referirse al papel o capa con las zonas separadas.

La *Figura 1* representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2. t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención respectivos; y h es la altura, $h/2$ la mitad de la altura y $W_{h/2}$ el ancho a la mitad de la altura, para el pico 1. W_1 y W_2 son los anchos de los picos 1 y 2, respectivamente, en la línea base. Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos. El tiempo de retención de estos picos de aire o componentes no retenidos se denomina t_M .

Volumen de Residencia (D): El volumen de residencia (también conocido como volumen de demora en elución a gradiente) es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna.

Tiempo Muerto (t_M): El tiempo muerto es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido (ver la *Figura 1*, mostrado como un pico de aire o de componente no retenido, con la escala de la línea base en minutos).

Volumen Muerto (V_M): El volumen muerto es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido. Se puede calcular a partir del tiempo muerto y la velocidad de flujo F , en mL/min:

$$V_M = t_M \times F$$

En la cromatografía de exclusión por tamaño, se usa el símbolo V_0 .

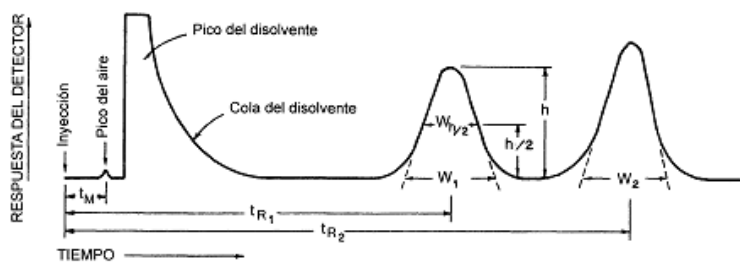


Figura 1. Separación cromatográfica de las dos sustancias.

Número de Platos Teóricos (N)¹: N es una medida de eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula por la ecuación:

$$N = 16(t_R/W)^2$$

en donde t_R es el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho del pico en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos del pico hasta la línea base. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna, y, para columnas capilares, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar el número de platos teóricos por la ecuación:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{n/2}} \right)^2$$

donde $W_{n/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura. Sin embargo, en caso de discrepancias, sólo se deben usar las ecuaciones basadas en el ancho del pico en la línea base.

Pico: El pico es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto.

Relación Pico/Valle (p/v): La p/v se pueden emplear como un criterio de aptitud del sistema en una prueba de sustancias relacionadas cuando no se logra la separación entre dos picos en la línea base. La Figura 2 representa una separación incompleta de dos sustancias, donde H_p es la altura del pico menor por encima de la línea base extrapolada y H_v es la altura en el punto más bajo de la curva que

separa los picos menor y mayor por encima de la línea base extrapolada:

$$p/v = H_p/H_v$$

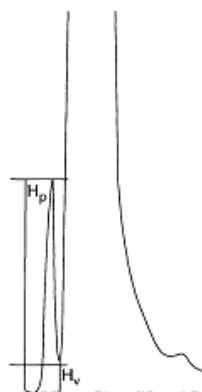


Figura 2. Determinación de la relación pico/valle.

Retardo Relativo (R_{ret}): El retardo relativo es el cociente de la distancia recorrida por el analito y la distancia recorrida simultáneamente por un compuesto de referencia (ver la Figura 3) y se usa en una cromatografía planar.

$$R_{ret} = b / c$$

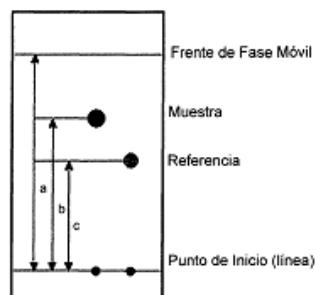


Figura 3. Cromatografía planar típica.

¹Los parámetros k, N, r y r_c se desarrollaron para separaciones por GC isotérmicas y separaciones por HPLC isocráticas. Debido a que estos términos son parámetros termodinámicos, son válidos únicamente para separaciones realizadas a temperatura, composición de la fase móvil y velocidad de flujo constantes. No obstante, para separaciones realizadas con un programa de temperatura o gradiente de disolventes, estos parámetros se pueden usar simplemente como medio de comparación para asegurar que existen las condiciones cromatográficas adecuadas para llevar a cabo los métodos según se indican en la monografías.

Retención Relativa (r): Es el cociente entre el tiempo de retención ajustado de un componente y el de otro usado como referencia obtenido en condiciones idénticas:

$$r = t_{R2} - t_M / t_{R1} - t_M$$

donde t_{R2} es el tiempo de retención medido desde el punto de inyección del compuesto de interés; t_{R1} es el tiempo de retención medido a partir del punto de inyección del compuesto usado como referencia; y t_M es el tiempo de retención de un marcador no retenido definido en el procedimiento, todos determinados en condiciones experimentales idénticas en la misma columna.

Tiempo de Retención Relativo (RRT): También conocido como tiempo relativo no ajustado. Las comparaciones en USP normalmente se realizan en términos de retención relativa no ajustada, a menos que se indique de otro modo.

$$RRT = t_{R2}/t_{R1}$$

El símbolo r_c también se usa para designar los valores de retención relativa no ajustados.

Desviación Estándar Relativa Porcentual

$$\%RSD = \frac{100}{x} \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right)^{1/2}$$

Factor de Retardo (R_f): El factor de retardo es el cociente entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil y se usa en cromatografía planar. Usando los símbolos de la Figura 3:

$$R_f = b/a$$

Factor de Retención (k): Al factor de retención también se le conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como:

$$k = \frac{\text{cantidad de sustancia en la fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en la fase móvil}}$$

o

$$k = \frac{\text{tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$$

El factor de retención de un componente se puede determinar a partir del cromatograma:

$$k = (t_R - t_M)/t_M$$

Tiempo de Retención (t_R): En cromatografía líquida y cromatografía de gases, el tiempo de retención, t_R , se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar t_R como un parámetro para identificación. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma al siguiente.

Volumen de Retención (V_R): El volumen de retención es el volumen de fase móvil requerido para la elución de un

componente. Se puede calcular a partir del tiempo de retención y de la velocidad de flujo en mL/min:

$$V_R = t_R \times F$$

Resolución (R_s): La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla, calculada por:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(W_1 + W_2)$$

donde t_{R2} y t_{R1} son los tiempos de retención de los dos componentes; y W_2 y W_1 son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar la resolución, mediante la ecuación:

$$R_s = 1,18(t_{R2} - t_{R1})/(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})$$

Factor de Separación (α): el factor de separación es la retención relativa calculada para dos picos adyacentes (por convención, el valor del factor de separación siempre es >1):

$$\alpha = k_2/k_1$$

Factor de Simetría (A_s): El factor de simetría (también conocido como factor de asimetría) de un pico (ver la Figura 4) se calcula por:

$$A_s = W_{0,05}/2f$$

donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde de la línea base.

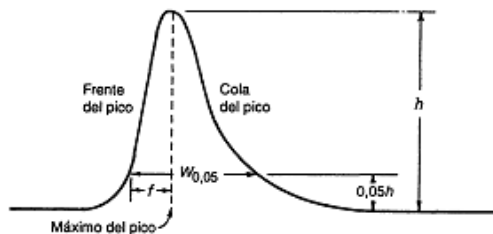


Figura 4. Pico cromatográfico asimétrico.

Factor de Asimetría (T): Ver Factor de Simetría.

APTITUD DEL SISTEMA

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar.

Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal.

Los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil

²Una práctica común consiste en medir el Factor de Asimetría como el cociente entre la distancia entre la línea vertical que conecta el ápice del pico con la línea base interpolada y el frente del pico, y la distancia entre dicha línea y el pico medido a la inversa al 10% de la altura del pico (ver la Figura 4) sea $(W_{0,10} - t_{R,10})/t_{R,10}$. No obstante, para los propósitos de la USP, únicamente es válida la fórmula (A_s) según se presenta en este capítulo.

- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área específica
- En fase reversa y otras modificaciones superficiales de las fases estacionarias, el grado de modificación química (según se expresa mediante recubrimiento exhaustivo (end-capping), carga de carbono, etc.)

La resolución, R_s , es una función del número de platos teóricos, N (también referido como eficiencia), el factor de separación, α , y el factor de capacidad, k . [NOTA—Todos los términos y símbolos se definen en la sección anterior *Definiciones e Interpretación de Cromatogramas*.] Para una fase móvil y una fase estacionaria determinadas, se puede especificar N para asegurar que los compuestos que eluyen muy cerca entre sí se resuelvan unos de otros, para establecer el poder de resolución general del sistema y/o para asegurar que el estándar interno se resuelva del fármaco. Este es un medio menos confiable para asegurar la resolución que la medición directa de la misma. La eficiencia de la columna es, en parte, una reflexión de la agudeza del pico, que es también importante para la detección de trazas de componentes.

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándar se comparan entre sí para determinar si se cumplen los requisitos de precisión. A menos que se especifique de otro modo en la monografía individual, se usan los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa, %RSD, si el requisito es 2,0% o menos; se usan los datos de seis inyecciones repetidas si la desviación estándar relativa es más de 2,0%.

Para la *Valoración* en una monografía de un fármaco, donde el valor es 100% para la sustancia pura, y no se especifica una desviación estándar relativa máxima, se calcula la %RSD máxima permitida para una serie de inyecciones de la solución de referencia como:

$$\%RSD = KB\sqrt{n}/t_{90\%, n-1}$$

donde K es una constante (0,349), obtenida a partir de la expresión $K = (0,6/\sqrt{2}) \times (t_{90\%, 5}/\sqrt{6})$, en la que $0,6/\sqrt{2}$ representa la desviación estándar relativa porcentual después de seis inyecciones para $B = 1,0$; B es el límite superior provisto en la definición de la monografía individual menos 100%; n es el número de inyecciones repetidas de la solución de referencia ($3 \leq n \leq 6$); y $t_{90\%, n-1}$ es el valor t de Student al 90% del nivel de probabilidad (dos colas) con $n - 1$ grados de libertad.

A menos que se indique de otro modo, la desviación estándar relativa máxima permitida no excede del valor apropiado provisto en la tabla de requisitos de repetibilidad. Este requisito no se aplica a las pruebas para sustancias relacionadas.

Requisitos para Desviación Estándar Relativa

B (%)	Número de Inyecciones Individuales			
	3	4	5	6
	RSD Máxima Permitida			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

El factor de simetría, A_s , una medición de la simetría del pico, la unidad es el valor que adquiere para picos perfectamente simétricos; y su valor se incrementa conforme la asimetría se vuelve más pronunciada (ver la *Figura 4*). En algunos casos, pueden observarse valores menores a la unidad. A medida que la simetría del pico se aleja de valores de 1, la integración y por lo tanto la precisión se tornan menos confiables.

La relación señal-ruido (S/N) es un parámetro útil de aptitud del sistema. La S/N se calcula según se indica a continuación:

$$S/N = 2H/h$$

donde H es la altura del pico medido a partir del ápice del pico hasta la línea base extrapolada sobre una distancia ≥ 5 veces el ancho del pico a su altura media; y h es la diferencia entre el valor de ruido más grande y más pequeño observado sobre una distancia ≥ 5 veces el ancho del pico a su altura media y, si fuera posible, igualmente distribuida a ambos lados del pico de interés (ver la *Figura 5*).

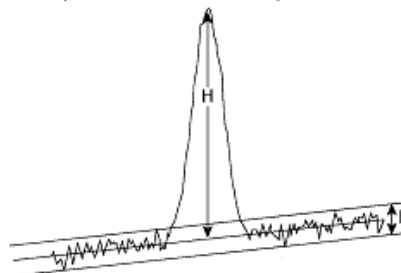


Figura 5. Ruido y pico cromatográfico, componentes de la relación S/N .

Estas pruebas de aptitud del sistema se realizan recolectando datos a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifica en la monografía individual.

La especificación de parámetros definidos en una monografía no excluye el uso de otras condiciones de operación aptas. Se permiten ajustes únicamente cuando

- Se encuentran disponibles estándares adecuados (incluyendo Estándares de Referencia) para todos los compuestos usados en la prueba de aptitud; y
- Esos estándares muestran que los ajustes mejoraron la calidad de la cromatografía con respecto a los requisitos de aptitud del sistema.

No se deben realizar ajustes a los sistemas cromatográficos a fin de cumplir con los requisitos de aptitud del sistema para compensar fallas en la columna o mal funcionamiento del sistema.

Si es necesario realizar ajustes a las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, cada uno de los parámetros en la lista siguiente es la variación máxima que se puede considerar, a menos que se indique algo distinto en la monografía; estos cambios pueden requerir datos de validación adicionales. Para verificar la aptitud del método en estas nuevas condiciones, evaluar las características de desempeño analítico pertinentes que sean potencialmente afectadas por el cambio. Múltiples ajustes pueden tener un efecto acumulativo en el desempeño del sistema y deben considerarse cuidadosamente antes de implementarlos. No se recomienda realizar ajustes a la composición de la fase móvil en la elución en gradiente. Si es necesario realizar ajustes, únicamente se recomiendan cambios en la columna (mismo material de relleno) o ajustes en volumen muerto.

pH de la Fase Móvil (HPLC): El pH de la solución amortiguadora acuosa usada en la preparación de la fase móvil se puede ajustar dentro de $\pm 0,2$ unidades del valor o intervalo especificado.

Concentración de Sales en la Solución Amortiguadora (HPLC): La concentración de las sales usadas en la preparación de la solución amortiguadora acuosa empleada en la fase móvil se puede ajustar dentro de $\pm 10\%$ siempre que se cumpla con la variación del pH permitida (ver arriba).

Relación de los Componentes en la Fase Móvil (HPLC): Los siguientes límites de ajuste aplican a componentes minoritarios de la fase móvil (especificados a 50% o menos). La cantidad de estos componentes se puede ajustar en un $\pm 30\%$ relativo. Sin embargo, el cambio en cualquier componente no puede exceder de $\pm 10\%$ absoluto (es decir, en relación a la fase móvil total). Se puede ajustar un componente minoritario en una mezcla ternaria. A continuación se presentan ejemplos de ajustes para mezclas binarias y ternarias.

Mezclas Binarias

RELACIÓN ESPECIFICADA DE 50:50: 30% de 50 es 15% absoluto, pero esto excede el cambio máximo permitido de $\pm 10\%$ absoluto en cada componente. Por lo tanto, sólo se puede ajustar la relación de la fase móvil dentro del intervalo de 40:60 a 60:40.

RELACIÓN ESPECIFICADA DE 2:98: 30% de 2 es 0,6% absoluto. Por lo tanto, el ajuste máximo permitido se encuentra dentro del intervalo de 1,4:98,6 a 2,6:97,4.

Mezclas Ternarias

RELACIÓN ESPECIFICADA DE 60:35:5: Para el segundo componente, 30% de 35 es 10,5% absoluto, que excede el cambio máximo permitido de $\pm 10\%$ absoluto en cualquier componente. Por lo tanto, el segundo componente sólo puede ajustarse dentro del intervalo de 25% a 45% absoluto. Para el tercer componente, 30% de 5 es 1,5% absoluto. En todos los casos, usar una cantidad suficiente del primer componente para obtener un total de 100%. Como consecuencia, los intervalos de mezclas de 50:45:5 a 70:25:5 ó 58,5:35:6,5 a 61,5:35:3,5 cumplirán con el requisito.

Longitud de Onda del Detector UV—Visible (HPLC): No están permitidas las desviaciones de las longitudes de onda especificadas en el procedimiento. Se usa el procedimiento especificado por el fabricante del detector, u otro procedimiento validado, para verificar que el error en la longitud de onda del detector sea, como máximo, ± 3 nm.

Fase Estacionaria

LONGITUD DE LA COLUMNA (GC, HPLC): Se puede ajustar tanto como $\pm 70\%$.

DIÁMETRO INTERNO DE LA COLUMNA (HPLC): Se puede ajustar siempre que la velocidad lineal se mantenga constante. Ver *Velocidad de Flujo (HPLC)* más adelante.

DIÁMETRO INTERNO DE LA COLUMNA (GC)—Se puede ajustar tanto como $\pm 50\%$ para GC.

ESPESOR DE LA PÉLICULA (CG CAPILAR)—Se puede ajustar tanto como -50% a 100%.

Tamaño de Partícula (HPLC): El tamaño de partícula se puede reducir tanto como 50%, pero no se puede aumentar.

Tamaño de la Partícula (GC): Es aceptable cambiar la malla de un soporte para GC de un tamaño de partícula mayor a uno menor o de uno menor a uno mayor siempre que la cromatografía cumpla con los requisitos de aptitud del sistema y se mantenga la misma relación del intervalo de tamaño de partícula. La relación del intervalo del tamaño de partícula se define como el diámetro de la partícula más grande dividida por el diámetro de la partícula más pequeña.

Velocidad de Flujo (GC): La velocidad de flujo se puede ajustar tanto como $\pm 50\%$.

Velocidad de Flujo (HPLC): Cuando hayan sido modificadas las dimensiones de la columna, la velocidad de flujo se puede ajustar usando:

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

en donde F_1 es la velocidad de flujo indicada en la monografía, en mL/min; F_2 es la velocidad de flujo ajustada, en mL/min; l_1 es la longitud de la columna indicada en la mo-

nografía; l_2 es la longitud de la columna usada; d_1 es el diámetro interno de la columna indicado en la monografía; y d_2 es el diámetro interno de la columna usada. Además, la velocidad de flujo se puede ajustar en $\pm 50\%$.

Volumen de Inyección (HPLC): El volumen de inyección se puede reducir hasta tanto lo permitan los límites de detección y precisión aceptados; no se permiten aumentos.

Volumen de Inyección y Volumen de División (Split Volume) (GC): El volumen de inyección y el volumen de división se pueden ajustar si la detección y la repetibilidad son satisfactorias.

Temperatura de la Columna (HPLC): La temperatura de la columna se puede ajustar tanto como $\pm 10^\circ$. Se recomienda la termostatación de la columna para mejorar el control y la reproducibilidad del tiempo de retención.

Temperatura del Horno (GC): La temperatura del horno se puede ajustar tanto como $\pm 10\%$.

Programa de Temperatura del Horno (GC): Se permiten ajustes de la temperatura según se especificó anteriormente. Cuando la temperatura especificada se debe mantener o cuando la temperatura debe cambiarse de un valor a otro, se permite un ajuste de hasta $\pm 20\%$.

A menos de se indique algo distinto en la monografía, los parámetros de aptitud del sistema se determinan a partir del pico del analito.

Los valores medidos de R , o R_f o t_R para la muestra no se desvían de los valores obtenidos para el compuesto o la mezcla de referencia en más que los estimados de confiabilidad estadísticamente determinados en valoraciones repetidas del compuesto de referencia. Los tiempos de retención relativos, si se proporcionan en las monografías, son con fines informativos únicamente para facilitar la identificación de los picos. No existen criterios de aceptación pertinentes a los tiempos de retención relativos.

El sistema operativo final debe someterse a una prueba de aptitud para determinar su eficiencia. Realizar inyecciones de las preparaciones apropiadas según se requiera para demostrar una adecuada aptitud del sistema en toda la corrida (según se describe en la sección *Sistema cromatográfico del procedimiento en una monografía*).

La preparación puede ser una preparación estándar o una solución que contenga una cantidad conocida de analito y cualquier material adicional (por ejemplo, excipientes o impurezas) útiles para el control del sistema analítico. Siempre que haya un cambio significativo en el sistema cromatográfico (equipo, componentes de la fase móvil, u otros componentes) o en un reactivo crítico, debería restablecerse la aptitud del sistema. Ningún análisis de muestras es aceptable a menos que se haya demostrado la aptitud del sistema.

CUANTIFICACIÓN

Durante la cuantificación, no tomar en cuenta los picos producidos por disolventes y reactivos o generados por la fase móvil o la matriz de la muestra.

En el intervalo lineal, el área del pico y la altura del pico son generalmente proporcionales a la cantidad de compuesto eluido. Las áreas y las alturas de los picos se miden comúnmente mediante integradores electrónicos, pero se pueden determinar de modos más clásicos. En general, se emplean las áreas de los picos pero pueden ser menos exactas si se producen interferencias. Los componentes medidos se separan de cualquier componente interferente. Se deben minimizar las asimetrías tanto en la parte anterior como en la posterior del pico y se debe evitar la medición de picos dentro de las colas de otros picos.

Aunque se prefiere la comparación de los picos de impurezas con los del cromatograma de un estándar de la impureza a una concentración similar, las pruebas de impurezas pueden basarse en la medición de las respuestas de los picos debidos a impurezas y expresarse como un porcentaje del área del pico del fármaco. El estándar puede ser el mismo fármaco a un nivel correspondiente de impurezas, por ejem-

pico, a 0,5%, asumiendo respuestas idénticas de los picos. Cuando las impurezas deben determinarse con una mayor certeza, usar un estándar de la misma impureza o aplicar un factor de corrección basado en la respuesta de la impureza relativa a la del componente principal.

Método de Estándar Externo: La concentración del componente cuantificado se determina comparando las respuestas obtenidas a partir de la solución muestra con las respuestas obtenidas a partir de una solución estándar.

Método del Estándar Interno: Se introducen cantidades iguales del estándar interno en la solución muestra y en una solución estándar. El estándar interno se selecciona de modo que no reaccione con el material de prueba, se resuelva de los componentes cuantificados (analitos), y no contenga impurezas con el mismo tiempo de retención que los analitos. Las concentraciones de los analitos se determinan comparando los cocientes entre las áreas de sus picos o las alturas de sus picos y el estándar interno en la solución muestra, con los cocientes entre las áreas o alturas de sus picos y el estándar interno en la solución estándar.

Procedimiento de Normalización: El contenido porcentual de un componente del material de prueba se calcula determinando el área del pico correspondiente como un porcentaje del área total de todos los picos, excluyendo aquellos debidos a disolventes o reactivos o que surgen de la fase móvil o de la matriz de la muestra y aquellos por debajo del límite en el que pueden descartarse.

Procedimiento de Calibración: Se determina la relación entre la señal medida o evaluada y la cantidad de la sustancia x (por ejemplo, concentración, masa) y se calcula la función de calibración. Los resultados analíticos se calculan a partir de la señal del analito medida o evaluada y su posición en la curva de calibración.

En las pruebas para impurezas tanto para el *Método del Estándar Externo*, cuando se usa una dilución de la solución muestra para comparación, como para el *Procedimiento de Normalización*, se aplica cualquier factor de corrección indicado en la monografía (por ejemplo, cuando el factor de respuesta está fuera del intervalo de 0,8–1,2).

Cuando la prueba de impurezas indica el total de impurezas o cuando existe una determinación cuantitativa de una impureza, es importante seleccionar un ajuste de umbral apropiado y condiciones apropiadas para la integración de las áreas de los picos. En tales pruebas, el límite en el cual, o por debajo del cual se descarta un pico, es generalmente 0,05%. De esta forma, el ajuste de umbral del sistema de recolección de datos corresponde al menos a la mitad de este límite. Integrar el área del pico de cualquier impureza que no se separe por completo del pico principal, preferiblemente mediante extrapolación valle a valle de la línea base (extrapolación tangencial).

objetos presenta colores iguales, con una fuente de iluminación y no con otra, constituyen un par metamérico. El color de dos objetos es igual para todas las fuentes de iluminación si los espectros de absorción y de reflectancia de los dos objetos son idénticos.

El acromatismo o falta de color es un extremo de cualquier escala de color para la transmisión de luz. Esto implica la ausencia completa de color y, en consecuencia, el espectro visible del objeto carece de absorbancias. A efectos prácticos, el observador en este caso percibe poca o ninguna absorción en el espectro visible.

Atributos del Color—Como la sensación de color tiene un componente subjetivo y otro objetivo, el color no puede describirse exclusivamente en términos espectrofotométricos. Por lo tanto, los atributos comunes del color no pueden corresponder uno a uno con la terminología espectral.

Por lo general se utilizan tres atributos para identificar un color. (1) el matiz, o la cualidad según la cual una familia de colores se distingue de otra, como por ejemplo rojo, amarillo, azul, verde y términos intermedios; (2) el valor, o la cualidad que distingue un color claro de uno oscuro; y (3) la cromaticidad, o la cualidad que distingue un color fuerte de uno débil, o el grado en el cual un color difiere de un gris del mismo valor.

Los tres atributos del color se pueden utilizar para definir un espacio de color tridimensional, en el cual se ubica cualquier color por sus coordenadas. El espacio de color elegido es visualmente uniforme si la distancia geométrica entre dos colores en el espacio de color es directamente una medida de la distancia del color entre ellos. A menudo se eligen coordenadas cilíndricas por conveniencia. Los puntos a lo largo del eje longitudinal representan valores del oscuro al claro o del negro al blanco y poseen un matiz indeterminado y ninguna cromaticidad. Centrándose en una sección transversal perpendicular al eje del valor, el matiz se determina por el ángulo con respecto al eje longitudinal y la cromaticidad se determina por la distancia desde el eje longitudinal. Los matices rojos, amarillos, verdes, azules, morados e intermedios están dados por diferentes ángulos. Los colores a lo largo de un radio de una sección transversal tienen el mismo matiz, que se convierte en un matiz más intenso a medida que se aleja. Por ejemplo, el agua incolora o acromática tiene un matiz intermedio, valor alto y ninguna cromaticidad. Si se agrega un soluto de color, el agua adopta un matiz específico. A medida que se agrega más soluto, el color se torna más oscuro, más intenso, o más profundo; es decir, generalmente la cromaticidad aumenta y el valor disminuye. Sin embargo si el soluto es de color neutro, es decir, gris, el valor disminuye, no se observa un aumento en la cromaticidad y el matiz permanece indeterminado.

Las mediciones espectroscópicas de laboratorio pueden convertirse en mediciones de los tres atributos de color. Los resultados espectroscópicos para tres luces o estímulos elegidos se ponderan mediante tres funciones de distribución para producir los valores tricromáticos, X , Y , Z (ver *Color—Medición Instrumental* {1061}). Las funciones de distribución se determinaron en experimentos de comparación de color con sujetos humanos.

Los valores tricromáticos no son coordenadas en un espacio de color visualmente uniforme; sin embargo, se han propuesto varias transformaciones que son cercanas a la uniformidad, una de las cuales se describe en el capítulo citado {1061} *Color—Medición Instrumental*. El valor es a menudo una función solamente del valor de Y . La obtención de uniformidad en el subespacio de matiz y cromatismo ha sido menos satisfactoria. En un sentido práctico, esto significa que en una comparación visual de colores, cuando dos objetos difieren significativamente en matiz, resulta difícil decidir cuál tiene mayor cromaticidad. Esto señala la importancia de elegir un estándar de comparación lo más parecido posible al color de la muestra, especialmente para los atributos de matiz y cromaticidad.

{631} COLOR Y ACROMATISMO

Definición—A los efectos de este capítulo, el color se puede definir como la percepción o la respuesta subjetiva de un observador al estímulo objetivo de energía radiante en el espectro visible que se extiende en el intervalo de longitudes de onda de 400 nm a 700 nm. El color percibido es una función de tres variables: las propiedades espectrales del objeto, tanto absorbentes como reflectantes; las propiedades espectrales de la fuente de iluminación; y las características visuales del observador.

Se dice que dos objetos poseen colores iguales para una fuente específica de iluminación cuando un observador no puede detectar una diferencia de color. Cuando un par de

ANEXO XVII

**CAPÍTULO GENERAL VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS
FARMACOPEICOS USP 36**

cional que se vaya a incluir en los resultados, por ejemplo, cromatogramas y espectros de muestra, junto con cualquier información adicional en caso de desviaciones. El protocolo también debe explicar la forma en que habrá de tratarse cualquier desviación de los criterios de aceptación. Todos los cambios realizados al protocolo de transferencia como consecuencia de una falla en los criterios de aceptación deberán ser aprobados antes de recolectar datos adicionales.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

El procedimiento debe presentarse por escrito de manera detallada y con instrucciones explícitas, de modo que un analista capacitado pueda llevarlo a cabo sin dificultad. Las reuniones previas a la transferencia entre la unidad que transfiere y la unidad receptora son útiles para aclarar cualquier cuestión y contestar preguntas relacionadas con el proceso de transferencia. Cuando se cuente con datos de validación completa o parcial, estos deberán estar disponibles para la unidad receptora, junto con todos los detalles técnicos requeridos para llevar a cabo la prueba en cuestión. En algunos casos, la presencia en las instalaciones de las personas implicadas en el desarrollo o validación iniciales durante la transferencia puede ser de utilidad. Para el caso de cromatografía líquida o de gases, se debe expresar claramente el número de muestras repetidas y las secuencias de inyección, mientras que, para la prueba de disolución, se debe estipular el número de unidades de dosificación individuales.

INFORME DE TRANSFERENCIA

Una vez que la transferencia se ha completado exitosamente, la unidad receptora debe preparar un informe de transferencia, que describa los resultados obtenidos con respecto a los criterios de aceptación, junto con las conclusiones que confirmen que la unidad receptora está ahora calificada para llevar a cabo el procedimiento. Asimismo, todas las desviaciones deben estar minuciosamente documentadas y justificadas. Se considera que la transferencia ha sido exitosa cuando se cumplen los criterios de aceptación y la unidad receptora está calificada para llevar a cabo el procedimiento. De lo contrario, la transferencia del procedimiento no se considerará completa hasta que se hayan adoptado las acciones correctivas y efectivas para cumplir con los criterios de aceptación. Una investigación puede ofrecer pautas sobre la naturaleza y el grado de las acciones correctivas, las cuales pueden variar desde capacitación adicional y aclaraciones, hasta enfoques más complejos, dependiendo del procedimiento en particular.

<1225> VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS FARMACOPEICOS

Los procedimientos de prueba para la evaluación de los niveles de calidad de los artículos farmacéuticos están sujetos a diversos requisitos. Según el Artículo 501 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los ensayos y especificaciones de las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional constituyen normas legales. Los reglamentos sobre Buenas Prácticas de Fabricación Vigentes [21 CFR 211.194(a)] requieren que los

métodos de prueba, que se utilizan para evaluar el cumplimiento de los artículos farmacéuticos con las especificaciones establecidas, deben cumplir normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. Sin embargo, según estas reglamentaciones [21 CFR 211.194(a)(2)] no se exige que los usuarios de los métodos analíticos descritos en *USP-NF* validen la exactitud y confiabilidad de estos métodos, sino que solamente comprueben su aptitud bajo las condiciones concretas de uso. Al reconocer el carácter legal de las normas USP y NF, es esencial, por lo tanto, que las propuestas para adoptar procedimientos analíticos farmacopeicos nuevos o revisados, estén respaldadas por suficientes datos de laboratorio que documenten su validez.

El texto de este capítulo informativo ha sido armonizado, en la medida de lo posible, con los documentos *Validación de Procedimientos Analíticos* y el texto suplementario *Método de Armonización* (ICH, por sus siglas en inglés), que tratan sobre procedimientos analíticos incluidos como parte de las solicitudes de registro presentadas en la UE, Japón y EE.UU.

PRESENTACIÓN A LOS COMPENDIOS

Las presentaciones de procedimientos analíticos, nuevos o revisados, a los compendios de la USP deben contener información suficiente para permitir que los miembros del Consejo de Expertos de la USP y sus Comités de Expertos evalúen los méritos relativos de los procedimientos propuestos. En la mayor parte de los casos, se evalúa si la descripción del procedimiento analítico es entendible y completa, se determina la necesidad de los procedimientos, y se evalúa la documentación que sustenta que los métodos han sido validados adecuadamente. La información puede variar dependiendo del tipo de método de que se trate. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la documentación presentada constará de las siguientes secciones.

Justificación—Esta sección debe identificar la necesidad del procedimiento y describir la capacidad del procedimiento específico propuesto y por qué se lo prefiere sobre otros tipos de determinaciones. Para procedimientos revisados, debe proporcionarse una comparación de las limitaciones del procedimiento farmacopeico actual y las ventajas ofrecidas por el procedimiento propuesto.

Procedimiento Analítico Propuesto—Esta sección debe incluir una descripción completa del procedimiento analítico lo suficientemente detallada como para permitir que expertos en la técnica puedan repetirlo. La reseña debe incluir todos los parámetros operativos importantes e instrucciones específicas, tales como la preparación de reactivos, realización de pruebas de aptitud del sistema, descripción de blancos utilizados, precauciones y fórmulas explícitas para el cálculo de los resultados de las pruebas.

Datos—Esta sección debe proporcionar una documentación minuciosa y completa de la validación del procedimiento analítico. Debe incluir resúmenes de los datos y cálculos experimentales que fundamenten cada una de las características de desempeño analítico aplicables. Estas características se describen en la siguiente sección.

VALIDACIÓN

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de procedimientos descritos en este documento se indican en la *Tabla 1*. Dado que las opiniones pueden diferir respecto a la terminología y al uso, cada una de las características de desempeño se define en la siguiente sección de este capítulo, junto con un esbozo de un método o métodos típicos mediante los cua-

les puede medirse. Las definiciones hacen referencia a "resultados de las pruebas". La descripción del procedimiento analítico debería definir cuáles son los resultados de las pruebas para el procedimiento. De acuerdo con ISO 5725-1 y 3534-1, un resultado de una prueba es "el valor de una característica que se obtiene al llevar a cabo un método de prueba específico. El método de prueba debería especificar que debe realizarse una o varias mediciones individuales, y que su promedio, u otra función apropiada (tal como la mediana o la desviación estándar), debe informarse como el resultado de la prueba. Asimismo, puede requerir que se apliquen correcciones estándar tales como corrección de los volúmenes de gas a temperatura y presión estándar. Por consiguiente, un resultado de una prueba puede ser un resultado calculado a partir de diversos valores observados. En el caso más simple, el resultado de una prueba es en sí el valor observado". Aunque no necesariamente, un resultado de una prueba también puede ser el valor final informable que se compararía con los criterios de aceptación de una especificación. La validación de métodos de propiedades físicas puede implicar la evaluación de modelos quimiométricos. No obstante, las características analíticas típicas usadas en la validación de métodos se pueden aplicar a los métodos derivados del uso de modelos quimiométricos.

Tabla 1. Características Analíticas Típicas Utilizadas para la Validación de Métodos

Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de Detección
Límite de Cuantificación
Linealidad
Intervalo
Robustez

Los efectos de las condiciones de procesamiento y el potencial de segregación de materiales deben considerarse durante la obtención de una muestra representativa que se usará en la validación de procedimientos.

En el caso de procedimientos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: una presentación a la USP de un procedimiento analítico revisado o utilización de un procedimiento general establecido con un nuevo producto o materia prima (ver más adelante en *Datos Requeridos para la Validación*).

Los documentos de ICH aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.

El Capítulo (1225) tiene como propósito proporcionar información apropiada para validar una amplia variedad de procedimientos analíticos. La validación de procedimientos farmacopeicos puede involucrar algunas o todas las características analíticas típicas sugeridas que se usan en la validación de métodos, según se especifican en la *Tabla 1* y se categorizan por tipo de método analítico en la *Tabla 2*. Para algunos procedimientos farmacopeicos los principios fundamentales de validación se pueden extender más allá de las características sugeridas en el Capítulo (1225). Para estos procedimientos, se remite al usuario al capítulo farmacopeico individual para aquellas características específicas de validación analítica, así como cualquier requisito de validación específico.

Características de Desempeño Analítico

EXACTITUD

Definición—La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo. [Nota sobre terminología: La definición de exactitud en (1225) y ICH Q2 corresponde únicamente a inesgadez. Para el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) y en los documentos de la Organización Internacional de Normalización (ISO), "exactitud" tiene un significado distinto. Para ISO, exactitud combina los conceptos de inesgadez (nombrada mediante el término "veracidad") y precisión].

Determinación—En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (p.ej., un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico ("spike") como la comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco, pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta relativa) debe ser utilizado siempre que se lo conozca.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente esté comprendido dentro de un intervalo alrededor de 1,0; o alternativamente, que el valor de la pendiente sea cercano a 1,0. En ambos casos, el intervalo o la definición de cercanía deberían especificarse en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad, y del producto. No es aceptable

establecer un criterio de aceptación basado en la falta de significancia estadística para la hipótesis nula de que la pendiente es 1,0.

La exactitud de los métodos de propiedades físicas se puede evaluar a través del análisis de materiales de referencia estándar o, alternativamente, se puede considerar la aptitud de las metodologías mencionadas anteriormente para cada caso en particular.

PRECISIÓN

Definición—La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo.

Determinación—La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas.

Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba.

ESPECIFICIDAD

Definición—Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. [NOTA—Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término "selectividad," reservando "especificidad" para procedimientos que resulten completamente selectivos.] Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes implicancias:

Pruebas de Identificación: garantizan la identidad del analito.

Pruebas de Pureza: garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, impurezas orgánicas volátiles).

Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

Determinación—En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que estas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños.

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (p.ej., un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (p.ej., luz, calor, humedad, hidrólisis ácida/alcalina y oxidación). En una valoración, deben compararse los resultados; en pruebas de impureza cromatográfica, deben compararse los perfiles de impurezas.

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (p.ej., utilizando arreglo de diodos o espectrometría de masas) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente.

Para la validación de especificidad de determinaciones cualitativas y cuantitativas mediante métodos espectroscópicos, se deben consultar los capítulos relacionados con temas como espectrofotometría en el infrarrojo cercano, espectroscopía raman y difracción de rayos X sobre polvo.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Definición—El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración de analito (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra.

Determinación—Para procedimientos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados para su consideración como procedimientos farmacopeicos oficiales, casi

nunca es necesario determinar el límite de detección real. Más bien, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de detección requerido. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza con una concentración del 0,1%, debería demostrarse que el procedimiento detectará de modo confiable la impureza a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Definición—El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de analito (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra.

Determinación—Para procedimientos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados para su consideración como procedimientos farmacopeicos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Más bien, debe demostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0,1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificará de modo confiable el analito a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del enfoque utilizado, el límite de cuantificación debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas al límite de cuantificación.

LINEALIDAD E INTERVALO

Definición de Linealidad—La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. En esta sección, la "linealidad" se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración. En algunos casos, para lograr la linealidad, puede ser necesario transformar la concentración y/o la medida. (Notar que los factores de corrección usados en el análisis de regresión pueden cambiar cuando se aplica la transformación.) Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o el recíproco, aunque otras transformaciones son aceptables. Si no se puede lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal.

Definición de Intervalo—El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (p.ej., porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico.

Determinación de Linealidad e Intervalo—La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales en función de la concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (p.ej., mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

Valoración de un Fármaco (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.

Determinación de una Impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.

Para Uniformidad del Contenido: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (p.ej., inhaladores de dosis fija).

Para Pruebas de Disolución: $\pm 20\%$ por encima del intervalo especificado (p.ej., si los criterios de aceptación de un producto de liberación controlada cubren una región de 30%, después de 1 hora, y hasta 90%, después de 24 horas, el intervalo validado sería de 10% a 110% de la cantidad declarada).

La definición tradicional de linealidad, es decir, el establecimiento de una relación lineal o matemática entre la concentración de la muestra y la respuesta, no es aplicable al análisis del tamaño de partícula. Para el análisis de tamaño de partícula, se define un intervalo de concentración (que depende del instrumento y el tamaño de partícula) tal que

la distribución de tamaño de partícula medida no se ve afectada por cambios en la concentración dentro del intervalo de concentración definido. Las concentraciones por debajo del intervalo de concentración definido pueden introducir un error debido a una pobre relación señal-ruido, mientras que las concentraciones que exceden el intervalo de concentración definido pueden introducir un error debido a dispersiones múltiples.

ROBUSTEZ

Definición—La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.

APTITUD DEL SISTEMA

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa. Variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas. En la cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo.

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento específico dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando. Son especialmente importantes en el caso de procedimientos cromatográficos. Las presentaciones a la USP deberían tener en cuenta los requisitos indicados en la sección *Aptitud del Sistema* en el capítulo de pruebas generales *Cromatografía* (621).

Datos Requeridos para la Validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Este capítulo cubre sólo

las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación. Estas categorías se indican a continuación.

Categoría I—Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II—Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III—Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV—Pruebas de identificación.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la *Tabla 2* se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Los procedimientos generales ya establecidos (p.ej., determinación volumétrica de agua, endotoxinas bacterianas) deben verificarse para establecer su aptitud para el uso, tal como su exactitud (y la ausencia de posibles interferencias) cuando se utilizan para un producto nuevo o materia prima nueva.

Al validar métodos de propiedades físicas, se deben considerar las mismas características de desempeño requeridas para cualquier procedimiento analítico. Asimismo, se debe evaluar el uso de las características de desempeño para cada caso en particular, a fin de determinar que el procedimiento es adecuado para el uso previsto. Los criterios de aceptación específicos para cada parámetro de validación deben ser congruentes con el uso previsto para el método.

Los métodos físicos también se pueden clasificar en las cuatro categorías de validación. Por ejemplo, la validación de un método espectroscópico cuantitativo puede implicar la evaluación de *Características de Desempeño Analítico* de *Categoría I* o *Categoría II*, dependiendo de los requisitos del método. Las mediciones de propiedades físicas cualitativas, tales como tamaño de partícula, área superficial, densidad aparente y densidad por asentamiento, las cuales pueden tener un impacto sobre las características de desempeño, generalmente se ajustan mejor a la *Categoría III*. Las *Características de Desempeño Analítico* de *Categoría IV* por lo general se aplican a la validación de métodos espectroscópicos de identificación cualitativa. No obstante, las diversas técnicas se pueden usar para distintos propósitos, y el uso específico del método y las características del material en análisis se deben considerar al aplicar definitivamente una categoría a un tipo de método en particular.

La validez de un procedimiento analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la conclusión exitosa de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un procedimiento es adecuado para sus aplicaciones previstas. Los procedimientos farmacopeicos oficiales también están suje-

Tabla 2. Datos Requeridos para la Validación

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

ANEXO XVIII

TABLA DE LA DISTRIBUCIÓN t-Student

2 colas	80%	90%	95%	98%	99%
$\alpha/2$	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
ν					

1 cola	90%	95%	97.5%	99%	99,5%
α	0.10	0.05	0.025	0,01	0,0015
ν					
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Fuente:(Instituto de Salud Pública, 2010, p. 61 – 62)

ANEXO XIX

Tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran

$\alpha = 0.05$

<i>k</i>	<i>n</i>													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.336	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

Fuente: Recuperado de: <http://profmejias.blogspot.com/2015/12/hablemos-de-revision-de-conocimientos.html>, (5 de junio 2016).

TABLA F
F DISTRIBUCIÓN ($\alpha=0,05$)

F crítico	Grados de libertad del numerador									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20
1	161.44622	199.49948	215.70668	224.58335	230.16037	233.98752	236.76694	238.88424	240.54316	241.88193
2	18.51276	19.00003	19.16419	19.24673	19.29629	19.32949	19.35314	19.37087	19.38474	19.39588
3	10.12796	9.55208	9.27662	9.11717	9.01343	8.94067	8.88673	8.84523	8.81232	8.78549
4	7.70865	6.94428	6.59139	6.38823	6.25607	6.16313	6.09421	6.04103	5.99880	5.96435
5	6.60788	5.78615	5.40945	5.19216	5.05034	4.95029	4.87586	4.81833	4.77246	4.73506
6	5.98737	5.14325	4.75706	4.53369	4.38737	4.28386	4.20667	4.14681	4.09901	4.05996
7	5.59146	4.73742	4.34683	4.12031	3.97152	3.86598	3.78705	3.72572	3.67667	3.63653
8	5.31764	4.45897	4.06618	3.83785	3.68750	3.58058	3.50046	3.43810	3.38812	3.34717
9	5.11736	4.25649	3.86254	3.63309	3.48166	3.37376	3.29274	3.22959	3.17890	3.13727
10	4.96459	4.10282	3.70827	3.47805	3.32584	3.21718	3.13547	3.07166	3.02038	2.97824
11	4.84434	3.98231	3.58743	3.35669	3.20388	3.09461	3.01233	2.94798	2.89622	2.85362
12	4.74722	3.88529	3.49030	3.25916	3.10587	2.99612	2.91335	2.84857	2.79638	2.75339
13	4.66719	3.80557	3.41053	3.17912	3.02543	2.91527	2.83210	2.76691	2.71436	2.67102
14	4.60011	3.73889	3.34389	3.11225	2.95825	2.84773	2.76420	2.69867	2.64579	2.60216
15	4.54307	3.68232	3.28738	3.05557	2.90130	2.79046	2.70663	2.64080	2.58763	2.54371
16	4.49400	3.63372	3.23887	3.00692	2.85241	2.74131	2.65720	2.59109	2.53767	2.49351
17	4.45132	3.59154	3.19677	2.96471	2.81000	2.69866	2.61430	2.54796	2.49429	2.44992
18	4.41386	3.55456	3.15991	2.92775	2.77285	2.66130	2.57672	2.51016	2.45628	2.41170
19	4.38075	3.52189	3.12735	2.89511	2.74006	2.62832	2.54354	2.47677	2.42270	2.37793
20	4.35125	3.49283	3.09839	2.86608	2.71089	2.59898	2.51401	2.44707	2.39282	2.34787
21	4.32479	3.46679	3.07247	2.84010	2.68478	2.57271	2.48758	2.42046	2.36605	2.32095
22	4.30094	3.44336	3.04912	2.81671	2.66127	2.54906	2.46377	2.39650	2.34193	2.29669
23	4.27934	3.42213	3.02800	2.79554	2.64	2.52766	2.44223	2.37481	2.32011	2.27472
24	4.25968	3.40283	3.00879	2.77629	2.62065	2.50819	2.42263	2.35508	2.30024	2.25474
25	4.24170	3.38520	2.99124	2.75871	2.60299	2.49041	2.40473	2.33706	2.28210	2.23648
26	4.22520	3.36901	2.97516	2.74260	2.58679	2.47411	2.38831	2.32053	2.26545	2.21972
27	4.21001	3.35413	2.96035	2.72777	2.57189	2.45911	2.37321	2.30531	2.25013	2.20430
28	4.19598	3.34039	2.94668	2.71407	2.55812	2.44526	2.35926	2.29127	2.23598	2.19004
29	4.18297	3.32766	2.93403	2.70140	2.54538	2.43244	2.34634	2.27825	2.22288	2.17685
30	4.17089	3.31583	2.92228	2.68963	2.53355	2.42052	2.33435	2.26616	2.21070	2.16458

Fuente:(Instituto de Salud Pública, 2010, p. 61 – 62)