

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNAN – LEÓN

**MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO QUIMICO-
FARMACEUTICO**

Caracterización de un Material de Referencia Interno de Amoxicilina a partir de un Estándar de Referencia USP, en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, durante el periodo de Febrero a Mayo de 2009.

AUTORES:

Br. Erick José Gallo García.

Br. Karen Jackeline González Esquivel.

Br. Jorge Alberto Hernández Juárez.

TUTOR:

Lic. Roberto Jesús Tórrez Barrera.

León, Nicaragua 2009.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos primeramente a Dios por habernos permitido llegar hasta este momento tan importante de nuestra vida y lograr nuestra más anhelada meta, formarnos Profesionalmente.

A nuestros padres por habernos dado la oportunidad de estudiar y de prepararnos para nuestro futuro.

A nuestro Tutor Lic. Roberto Torres que nos brindo su ayuda y deposito su confianza en nosotros para llevar a cabo este trabajo.

A todo el personal que labora en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos LCCM de la UNAN-León, tanto administrativo como ejecutivo, por permitirnos la realización de esta tesis y brindarnos su incondicional apoyo.

A nuestros profesores por compartir con nosotros su sabiduría, por las enseñanzas y consejos que nos brindaron.

A nuestros amigos y compañeros, por su apoyo incondicional, confianza y lealtad en los buenos y malos momentos a lo largo de los 5 años de nuestra carrera.

Dedicatoria:

La coronación de mi carrera profesional es un aspecto trascendental en mi vida, y hoy que se logra alcanzar esta meta a través de la realización de esta tesis, no puedo dejar de mencionar a las personas que han contribuido a alcanzar este éxito.

Por lo tanto esta tesis la dedico:

A Dios padre, nuestro guía espiritual y el refugio seguro en todos los momentos de nuestras vidas.

A mis padres, quienes a través del transcurso de mi vida me han guiado por el camino correcto, porque siempre han sido mi inspiración y el motivo más grande y por el cual estoy dispuesto a hacerle frente a las dificultades y por ser mi refugio y mi protección ante las adversidades que la vida te presenta.

A mis amigos(as) que durante todo este tiempo han sido una gran ayuda para mi, por saber escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles y por ser siempre incondicional a pesar de nuestras diferencias.

A todas las demás personas que de una u otra manera han contribuido en la realización de este sueño que hoy es una realidad.

Erick Gallo.

Dedicatoria:

Son tantas personas a las cuales debo parte de este triunfo, de lograr alcanzar mi culminación académica, el cual ha sido el mayor anhelo en mi vida.

Dedico esta tesis a Dios, mi Señor, mi Guía, a través de esta meta, podré siempre de tu mano alcanzar otras que espero sean para tu Gloria.

A mi madre la persona más importante en mi vida, ya que ella me dio la vida y la oportunidad de realizar todos mis sueños. Por tu apoyo, guía, confianza, comprensión, cariño y amor, GRACIAS Mama, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensado. Tu esfuerzo, se convirtió en tu triunfo y el mío, TE AMO.

A la Familia Mora Vijil por su ayuda en mis estudios primarios y secundarios en especial a la señora María Estela Vijil de Mora que me dio la oportunidad de iniciar mis estudios para hoy poder culminarlos.

A la familia Maddox por su apoyo y voto de confianza durante el transcurso de mi carrera, sin su ayuda mi éxito no hubiese sido posible.

A Christian Sjut mi amigo incondicional en los buenos y malos momentos, que sin importar la distancia siempre me ha dicho presente.

A mi grupo de tesis que fueron parte del último escalón para poder alcanzar este sueño, este MI SUEÑO, que ahora es una realidad.

A todos mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todo las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría, LOS RECUERDO.

Karen González.

Dedicatoria:

Quiero primeramente agradecerle a Dios por ser el amigo incondicional que nunca falta, ese que muchas veces ha cargado con la cruz que tantas veces se me hace difícil de cargar y que sin necesidad de verlo se que está conmigo

A mis padres que con mucho esfuerzo y dedicación han logrado mi carrera coronar, título que con todo orgullo ofrezco especialmente a mi madre Santos Pastora Juárez que ha sido a lo largo de esta vida un oasis en el desierto, puesto que sus consejos y reclamos han hecho de mi, la persona que ahora soy.

A mis hermanos, especialmente a mi hermana Vanesa Hernández, la cual nunca dejo de creer en mí, y que siempre dijo presente cuando necesitaba ayuda, y a mis hijos Jeffer Hernández y Jorge Hernández que son la inspiración para seguir triunfando.

Finalmente pero no menos importante a nuestro Tutor Roberto Jesús Torres, que con mucha dedicación y paciencia me dio una riqueza de conocimientos.

A mis amigos y compañeros de monografía de los cuales aprendí mucho y que van a dejar una huella en mi vida.

Jorge Hernández.

TEMA

Caracterización de un Material de Referencia Interno de Amoxicilina a partir de un Estándar de Referencia USP, en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, durante el periodo de Febrero a Mayo de 2009.

INDICE

	No de Pag.
1. Resumen.....	1.
2. Introducción.....	2.
3. Antecedentes.....	4.
4. Justificación.....	6.
5. Objetivos.....	7.
6. Marco Teórico.....	8.
7. Parte Experimental.....	34.
8. Resultados y Discusión.....	46.
9. Conclusión.....	59.
10. Recomendaciones.....	60.
11. Bibliografía.....	61.
12. Anexos.	
• Anexo 1: Tabla t-Student.....	62.
• Anexo 2: Tabla de distribución F de Fisher.....	63.
• Anexo 3: Test de Hartley.....	63.
• Anexo 4: Factores utilizados en las graficas de control.....	64.
• Anexo 5: Mediciones de las 4 soluciones del MRI.....	64.
• Anexo 6: Datos para el estudio de estabilidad en las lecturas analíticas....	65.
• Anexo 7: USP Certificate.....	66.
• Anexo 8: Cromatogramas del MR y MRI.....	67.
• Anexo 9: Certificado Interno del Material de Referencia.....	68.



I. RESUMEN

En el campo farmacéutico, en específico, los materiales de referencia son de gran utilidad en los procesos de validación de métodos analíticos, para las determinaciones analíticas de la cantidad de ingrediente activo, así como en el aseguramiento de la calidad de las mediciones realizadas en los laboratorios de control de calidad. Es necesario señalar la importancia particular de contar, en este campo, con métodos que ofrezcan resultados con precisión y veracidad, ya que éstos se usan con fines regulatorios o legales. Los Materiales de Referencia Interno (MRI) apoyan el establecimiento de la trazabilidad al SI de las mediciones elementales que realizan los laboratorios analíticos en cualquier tipo de muestra, jugando un papel importante en las actividades Nacionales e Internacionales de Normalización, en los ensayos de aptitud y en la acreditación de laboratorios. La selección de los MRI debe tener en cuenta no solamente el nivel de incertidumbre requerido para el objetivo deseado, sino también su disponibilidad, costo e idoneidad química y física para el propósito a alcanzar. En este trabajo se proporciona información sobre la caracterización de un Material de Referencia Interno de Amoxicilina realizada en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, mediante el empleo de materiales de referencia USP, específicos para los ensayos demandados por la industria farmacéutica, demostrándose que los resultados que ofrecen los mismos son precisos y veraces, y que proporcionan trazabilidad.



II. INTRODUCCION

Un material de referencia es aquel material o sustancia, en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y estables ya que deben mantenerse en los límites determinados, durante un tiempo especificado y en unas condiciones establecidas de almacenamiento; deben ser lo más similares posible a las muestras reales y deben ser trazables y estar claramente establecidos como para poder ser utilizados en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medida o la asignación de valores a materiales.

Cuando se mencionan los Materiales de Referencia, en realidad se está abordando la calidad de los resultados. El problema de calidad en los laboratorios se traduce en una incertidumbre menor o mayor en sus resultados. El origen de esta incertidumbre es diverso, pudiendo provenir de la metodología utilizada, del error humano, de la instrumentación o de la complejidad de la muestra a analizar. La función principal de los Materiales de Referencia es ofrecer a los usuarios una base para la obtención de medidas exactas.

En los laboratorios de control de calidad farmacéuticos los estándares de referencia de medicamentos son suministrados por La Farmacopea de los Estados Unidos, establecidos y distribuidos los estándares de Referencia con la previa autorización de la junta directiva de la USPC (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos) por recomendación del comité de estándares de referencia USP.

Los estándares de referencia suministrados por la USP, hasta antes del 24 de septiembre del 2008, no venían acompañados por un certificado que dijese su pureza e incertidumbre, únicamente explicaban, que a menos que la etiqueta de un estándar de referencia declarase una potencia o contenidos específicos, se consideraba que dicho estándar de referencia era 100.0% puro para fines farmacopeicos. Esto fue una limitación para que los laboratorios Farmacéuticos garantizaran que sus resultados eran confiables.



Para el 11 de agosto del 2008 la Convención de los E.E.U.U Farmacopeicos anuncio que alcanzo la acreditación a la guía 34 “Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia” de la International Organization for Standardization (ISO). Lanzando al mercado su primer material de referencia certificado de Bromohidrato de Dextromethorphan el 24 de septiembre del 2008. Proveyendo a los laboratorios farmacéuticos una nueva clase de estándares de referencia que aseguren la calidad de sus medidas, al cumplir los requisitos que dispongan los organismos reguladores a si como los clientes.

Cada material de referencia certificado viene con un certificado de análisis que contiene los datos sobre el valor de una propiedad certificada, su incertidumbre, y por primera vez una fecha de vencimiento.

En este trabajo investigativo se caracterizo un Material de Referencia Interno de Amoxicilina para el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN LEON, con el objetivo de garantizar la trazabilidad en las mediciones analíticas y asegurar la calidad de los resultados.



III. ANTECEDENTES

Los materiales de referencia certificados (MRC) se utilizan ampliamente como patrones de medición de cantidades de sustancias y de otras magnitudes químicas y físicas. Sin embargo, es indispensable que estos materiales de referencia sean trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) con el fin de que pueda establecerse una cadena de trazabilidad completa desde los laboratorios de campo hasta las unidades del SI.

El uso de MRC en los laboratorios de ensayos permite mediciones altamente confiables, a bajo costo y referidas (trazables) al SI. Estas mediciones repercuten a su vez, en tomas de decisión acertadas ya sea para el control de un proceso de producción, para la compra de un determinado producto, para verificar el cumplimiento de alguna norma, o bien para lograr la aceptación de un producto o servicio tanto a nivel nacional como internacional.

Como una consecuencia de estos hechos, el uso de MRC, con trazabilidad al SI demostrada, es requisito indispensable para el establecimiento de sistemas de calidad, para la evaluación de la conformidad y para la acreditación de laboratorios de ensayos, lo cual ha generado un incremento considerable en su demanda.

Los MR han sido considerados esenciales para la calibración y comprobar la operación correcta del equipo usado para la determinación de características fisicoquímicas. Todavía hasta los años 70, la elaboración de los MR y los medios de verificar sus características se realizaba con equipo de tecnología avanzada. En los últimos 36 años, muchos laboratorios han limitado o eliminado su actividad en la producción de materiales de referencia. Además existía en estos laboratorios poca actualización y el arte, con respecto a la elaboración de MR, era pobre.

En años recientes ha habido mucho interés de proporcionar confianza adicional a la calidad de los materiales de referencia disponibles en el mercado abierto, la acreditación del laboratorio de ensayo y calibración con ISO/IEC 17025 requiere cada vez de productores de materiales de referencia confiables. En 1996 el Comité de ISO de materiales de referencia (ISO REMCO) produjo la base para un documento de evaluación, la Guía ISO 34: "Requerimientos Generales para la Competencia de Productores de Materiales de Referencia", y esta fue revisada en el 2000.



A razón de esto existen dos documentos internacionales la Guía ISO 34:2000 y la ILAC-G12 “Directrices para los Requerimientos de la Competencia de Productores de Materiales de Referencia” emitida por la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC).

El 11 de agosto de 2008 La convención de los E.E.U.U. Pharmacopeal (USPC) anuncio que alcanzo la acreditación de ACLASS a la guía 34 del International Organization for Standardization (ISO) para los productores del material de referencia (PMR) como un productor internacionalmente acreditado de los materiales de referencia certificados (MRC). La designación de los MRCs representa un rigor adicional en los métodos usados para crear, analizar y asignar valores a los materiales de referencia. USP es la única farmacopea que ha alcanzado esta designación de la ISO.

Según Guillermo Koch, el PhD., principal oficial de la metrología de USP, señala: “Esta acreditación es una señal verdadera no sólo para USP sino también para la salud pública. La tecnología de la medida ha dado pasos grandes significativos en las últimas décadas. Adhiriéndose a los criterios más rigurosos requeridos, permaneciendo en la vanguardia de los avances para asegurar la calidad, la fuerza y la pureza de medicinas y de ingredientes alimentarios”.

USP está desarrollando los criterios para identificar que estándares de referencia son candidatos a convertirse en MRC, basados en las características tales como estabilidad, homogeneidad, necesidad del cliente y otras. En un cierto plazo, en colaboración con fabricantes, cuerpos reguladores, otras farmacopeas y los científicos de la investigación, USP construirán su biblioteca de MRC. Esto proveerá mayor exactitud y disminuirá la incertidumbre.

El 24 de septiembre de 2008 la Convención de los E.E.U.U. Pharmacopeal (USP) anuncio el lanzamiento de su primer material de referencia certificado (MRC), Bromhidrato de Dextromethorphan. USP se convirtió, recientemente en la primera farmacopea global para recibir la acreditación del International Organization for Standardization como productor de MRCs químicos. Este lanzamiento levanta la confianza en las medidas analíticas de los laboratorios de control de calidad de medicamentos.



IV. JUSTIFICACION

Actualmente en el mercado existe un creciente interés por implantar en los laboratorios de análisis Normas de Gestión de la Calidad como la Norma ISO 17025 o su equivalente NTN04-001-01 en Nicaragua. En cualquier sistema de calidad deben existir acciones basadas en el contraste sistemático de las actividades implicadas en el control de calidad, y para ello, en los laboratorios de ensayo es útil e importante emplear materiales de referencia.

La elección y desarrollo de este tema obedece a la necesidad que el Laboratorio de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Químicas UNAN LEON debe contar con un material de Referencia Interno de Amoxicilina, para obtener resultados exactos y precisos en los ensayos de cuantificación de las distintas muestras que ingresan a dicho laboratorio como son las suspensiones y/o cápsulas de amoxicilina y cumplir con los requisitos establecidos por el ISO/IEC 17025 en el acápite 5.6.3.2.

Además por los altos costos que implica el estar utilizando estándares de referencia certificados para los análisis a determinadas muestras de medicamentos.



V. OBJETIVOS

GENERAL:

- ▲ Caracterizar un Material de Referencia Interno de Amoxicilina a partir de un estándar de referencia USP.

ESPECIFICOS:

1. Verificar la estabilidad del Sistema Cromatografico, a través del cálculo del ruido y deriva del sistema de detección UV-Visible.
2. Estudiar la estabilidad y homogeneidad del Material de Referencia Interno de Amoxicilina.
3. Elaborar las gráficas de control para garantizar la exactitud, repetibilidad y precisión intermedia de la estabilidad en las lecturas analíticas del Material de Referencia Interno de Amoxicilina.
4. Estimar la incertidumbre en la preparación del Material de Referencia Interno de Amoxicilina.
5. Elaborar el Certificado de Análisis interno, del Material de Referencia Interno de Amoxicilina.

MARCO TORGAS



VI. MARCO TEORICO

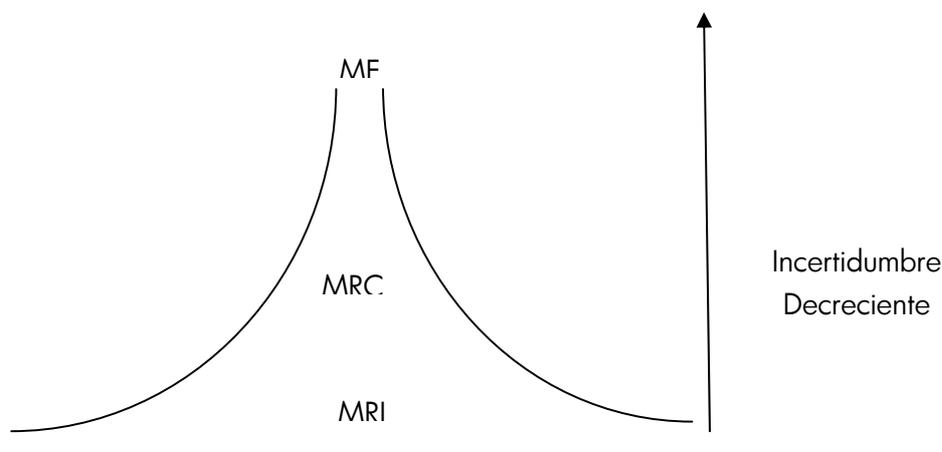
MATERIALES DE REFERENCIA: CONCEPTOS BÁSICOS

MATERIAL DE REFERENCIA

Es un material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos.

JERARQUÍA DE MATERIALES DE REFERENCIA

En la jerarquía metrológica hay diferentes tipos de MR llamados: Material Estándar de Referencia (MER), también llamado Patrón Primario Material de Referencia Certificado(MRC), también llamado Patrón Secundario y Material de Referencia Interno de Trabajo o Terciario (MRI). La clasificación más importante de los MR es en base a su incertidumbre como sigue:



Un Material Estándar de Referencia tiene la calidad metrológica más alta en un campo específico mientras un Material de Referencia certificado es uno cuyo valor está decidido por comparación con el primario. No necesariamente un Material de Referencia Certificado es de calidad inferior a un Material Estándar de Referencia.

Se usan MRI para los tres propósitos siguientes:

- Para calibrar instrumentos.
- Para verificar el desempeño del instrumento o su operador.



- Proveer un medio para el control de calidad.

Un MR de trabajo puede ser primario o secundario. Además algunos materiales tienen sus propiedades certificadas o son trazables, a un patrón ya sea nacional o internacional, y a estos materiales se les llama MRC.

TIPOS DE MATERIALES DE REFERENCIA

Se pueden diferenciar distintos tipos de MR:

- Físicos, como pueden ser de masa (pesas), longitud de onda, temperatura y otras propiedades físicas. [7]
- Sustancias puras, soluciones y mezclas de alta pureza, utilizadas para la calibración en procedimientos de análisis.[7]
- MR matriciales, materiales naturales y/o materiales naturales adicionados a sintéticos usados para la verificación de procedimientos analíticos y en casos específicos para la calibración de instrumentos de medida. [7]

Los MR pueden presentarse bajo la forma de un gas, un líquido o un sólido, puro o compuesto. También pueden tratarse de una pieza para ensayo o análisis o de un artículo manufacturado. En ocasiones necesitan de cierta preparación, como los materiales liofilizados o las disoluciones concentradas.

APLICACIONES

Los Materiales de Referencia son utilizados básicamente, para:

- Calibrar instrumentos o equipos de medición.
- Validar métodos analíticos.
- Comprobar la equivalencia de métodos.
- Verificar el correcto uso del método o detectar errores en su aplicación.
- Contrastar la exactitud de los resultados.
- Asignar valores a un material o sistema.



El laboratorio productor de MR debe disponer de procedimientos para la selección, adquisición, recepción, registro, almacenamiento y utilización de los MR, del mismo modo que para el resto de reactivos y materiales consumibles utilizados en los ensayos y calibraciones.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

El primer paso para seleccionar un MRC debe ser comparar las especificaciones requeridas con las de los MRC disponibles en el mercado, para ello se debe:

- Consultar la información disponible en: catálogos de fabricantes, bancos de datos, publicaciones, recomendaciones, etc. [7].
- Asegurar que el MRC seleccionado está certificado para la medida o propiedad de interés y no es un valor meramente indicativo, y que su procedimiento de certificación tiene un nivel de confianza apropiado y está suficientemente documentado.

En su selección deberán tenerse en cuenta las siguientes características:

➤ Incertidumbre

El valor del certificado debe ser compatible con los requisitos de precisión y exactitud de las determinaciones a realizar (calidad del método, exigencias legales o de acreditación, etc.) y ser los más próximos a los valores reales.

➤ Homogeneidad

El MRC debe ser homogéneo y de composición constante. Se debe prestar atención a los datos sobre estudios de homogeneidad que facilite el fabricante y valorar si es adecuado, teniendo en cuenta el tamaño de muestra recomendado para su uso y la precisión del método utilizado.

➤ Estabilidad

El material preparado debe ser estable en el tiempo, (se debe incluir la fecha de caducidad, si procede) así como ser susceptible para ser transportado. El cliente debe conocer durante



cuánto tiempo permanece estable desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad se extiende a los parámetros certificados y a la matriz.

➤ **Concentración (nivel)**

Interesa elegir el MRC que tenga el valor numérico de la propiedad de interés o característica certificada, lo más similar posible al que se espera encontrar en las muestras o material. A veces es difícil encontrar distintas concentraciones para un mismo MRC. Cuando deba optarse por una concentración única es preferible elegir el valor crítico (por ejemplo: el valor más próximo a un valor límite establecido).

➤ **Matriz**

Conviene que sea la más similar posible a las muestras objeto de análisis y tener información relativa a su origen o composición.

➤ **Presentación o estado físico**

Se debe seleccionar la forma de presentación más estable y con un procedimiento de utilización o preparación más simple, para evitar introducir factores de incertidumbre asociados al resultado de la medida.

➤ **Cantidad o dosificación**

Está en función de que el procedimiento de medida sea, o no, destructivo. Cuando deba prepararse todo el material (por ejemplo, orinas liofilizadas) y ya no pueda utilizarse más adelante, debe seleccionarse, cuando sea posible, una dosificación que permita emplear cantidades más pequeñas.

➤ **Conservación y periodo de validez**

El fabricante debe proporcionar información sobre las condiciones óptimas de transporte, manejo y almacenamiento y, siempre que sea posible, sobre el periodo de validez del MRC. En muchos casos, la garantía de la composición es para un periodo determinado o hasta su utilización.



➤ **Tipo de procedimiento analítico**

Los métodos empleados para su certificación deben ser los que proporcionen la mayor exactitud posible. Los procedimientos utilizados pueden ser distintos según se trate de obtener un resultado aplicando un cálculo sobre las mediciones realizadas en el procedimiento (por ejemplo, la masa de la muestra o el volumen utilizado en una valoración) o bien de cuantificar por interpolación en una curva de calibración, cuando se asume que no hay influencia de la matriz o cuando si existe influencia matricial.

Se indican a continuación, algunos de los problemas o dificultades más habituales que suelen presentarse en la selección de los MRC.

- Escasez de MRC en el mercado. Dificultad de localizar los disponibles y de comunicarse con fabricantes y distribuidores.
- Su alto costo, lo que limita su aplicación. En muchos casos, puede estar en función de la metodología de su certificación. Por ejemplo, los MRC matriciales se obtienen mediante estudios ínter laboratorios que son largos y costosos).
- Escasa información por parte de los fabricantes, lo cual dificulta la evaluación de si un determinado MRC es adecuado a los objetivos.
- El analito requerido no se encuentra certificado en una matriz idéntica o parecida a la composición del producto o de la muestra.
- Dificultad en disponer de distintos niveles de concentración para evaluar el procedimiento en todo su rango de aplicación.
- Una incertidumbre inadecuada para evaluar un procedimiento de medida.
- No poder controlar la toma de muestra, lo que puede suponer una incertidumbre superior al de la etapa de análisis.
- Problemática de su trazabilidad. Patrones en los que se declara su trazabilidad a organismos reconocidos, como NIST, BCR, etc., pero en los que, a veces, no existen garantías sobre el aseguramiento de la misma ni sobre la fiabilidad de su valor certificado.
- Dificultad en su preparación, debido al corto tiempo de vida media del elemento o sustancia de estudio en la matriz de interés.



ADQUISICIÓN

El laboratorio deberá evaluar a los proveedores, mantener un registro de dichas evaluaciones y elaborar una lista de los posibles fabricantes y/o suministradores.

RECEPCIÓN

Al recibirse el MRC deberá prestarse especial atención tanto al material (etiquetado y caducidad), como a la documentación que lo acompaña, siendo siempre recomendable:

- Comprobar el estado del MRC en su recepción (examinar embalajes y envases, comprobar roturas o golpes, estanqueidad, temperatura de recepción o transporte, si fuera el caso, etc.).
- Examinar toda la documentación técnica del MRC y comprobar el contenido del certificado, lo cual debe contener:

Nombre y dirección del organismo que certifica.

Título del documento (certificado de análisis o de medida).

Nombre del material, código y número de lote.

Descripción del MRC.

Utilización prevista (objetivo de la fabricación: calibrar equipos, verificar un método, etc.).

Instrucciones de utilización.

Información sobre aspectos de seguridad.

Nivel de homogeneidad.

Valores certificados y sus incertidumbres.

Trazabilidad.

Valores obtenidos por laboratorios individuales.

Fecha de certificación y periodo de validez.

Nombre y firmas de los certificadores.

En la documentación del fabricante deberá prestarse especial atención, siempre que sea posible, a los datos de trazabilidad a patrones nacionales o internacionales. La norma ISO/IEC 17025 [3], en su punto 5.6.3.1, especifica que el laboratorio debe disponer de un programa y un procedimiento para la calibración de sus patrones de referencia. Los



patrones de referencia deben ser calibrados por un organismo que pueda proporcionar trazabilidad con respecto a las unidades de medida del Sistema Internacional (SI).

REGISTRO Y ETIQUETADO

Una vez que el laboratorio ha verificado que el material cumple con las especificaciones solicitadas, es recomendable registrarlo, identificándolo mediante un código o referencia, por ejemplo con las siglas MRC seguidas de un código numérico relativo a dicha clasificación con base en el documento: Categorization of reference materials — Guidance on, and keywords used for RM categorization [8], que es en donde se establecen los diferentes códigos para la identificación de los MR existentes. En la Tabla se indica el contenido básico de una etiqueta y registro.

Una vez registrado el MRC, y siempre que sea posible, deberá etiquetarse mediante una etiqueta que contenga, como mínimo: código, fecha de recepción, fecha de caducidad y/o apertura del envase e indicaciones especiales de seguridad y almacenamiento.

ETIQUETA DE UN MRC
Código interno MRC.
Tipo de material y características.
Fabricante / Suministrador.
Referencia catálogo / N° de fabricación o lote.
Referencia certificado y emisor.
Fecha de recepción y fecha de caducidad.
Ubicación o almacenamiento.
Persona responsable del MRC.
Información: seguridad, manipulación, etc.
Observaciones.
Historial de su utilización.



ALMACENAMIENTO

Las condiciones de almacenamiento y conservación del MRC deben ser proporcionados por el propio fabricante y dependerán de las características y posibles alteraciones del mismo (termo estabilidad, higroscopicidad, foto sensibilidad, oxidabilidad, etc.).

Los MRC de carácter consumible (productos puros, disoluciones, etc.) se almacenarán en el lugar más idóneo según características y recomendaciones específicas (por ejemplo, en congelador, frigorífico, armario de seguridad, etc.). Los utilizados para calibrar equipos (por ejemplo, pesas certificadas) es recomendable que tengan una utilización restringida, aunque, en general, todos los MRC deben estar bajo control y responsabilidad de una persona.

MANEJO

Las siguientes son algunas recomendaciones para cuando se utilicen los MRC:

- Los MRC no deben usarse de forma rutinaria para el control de calidad. Es más aconsejable utilizar un MRI con trazabilidad al MRC.
- El usuario deberá conocer toda la información necesaria para su correcta utilización antes de cualquier manipulación y tener muy presente el periodo de caducidad para así evitar su uso en condiciones no controladas.
- Cuando se utilice un MRC, la responsabilidad de su uso y manipulación será del usuario. El material deberá ser manipulado con la máxima precaución y escurpulosidad, especialmente en la apertura o conservación, evitando cualquier alteración o contaminación, especialmente en los materiales consumibles.
- Cuando sean MRC consumibles es recomendable anotar en su historial, como mínimo los siguientes datos: la fecha de utilización; la persona que lo utilizó; la aplicación (calibración, validación, etc.) y la cantidad utilizada o remanente.
- Cuando sea preciso tomar alícuotas de los MRC, deberá prestarse especial atención en: mantener la homogeneidad del material, evitar posibles influencias o alteraciones por la humedad, luz, temperatura excesiva, contaminaciones potenciales, etc. Tomar un pequeño volumen por vertido cuando se trate de una disolución y no devolver el material sobrante, ya sea líquido o sólido, al recipiente.



La correcta manipulación y conservación de los MR, especialmente cuando han sido abiertos, es de especial importancia. Las precauciones para su conservación dependerán del tipo de material, pero como norma general deben conservarse a baja temperatura, en un ambiente seco, o en ocasiones, en cámaras de atmósfera inerte y/o protegidos de la luz.

USO DE LOS MRC

Entre las principales finalidades de los MRC, destacan las de:

- Contrastar la exactitud de los resultados que emite el laboratorio permitiendo la detección de errores sistemáticos. Para ello la muestra y el MRC deberán someterse al mismo tratamiento y al mismo proceso analítico para poder comparar los resultados obtenidos en la muestra y en el MR.
- Validar un método analítico y calcular su incertidumbre.
- Calibrar equipos dentro del plan de calibración y/o verificación del laboratorio.
- Siempre que se utilicen MRC es recomendable hacer un seguimiento de los resultados obtenidos, por ejemplo, utilizando gráficos de control. Ello facilitará la detección de posibles errores del método, del equipo, o de los analistas, así como apreciar tendencias en los resultados.

Las mediciones son algo determinante en la actualidad, y mientras más precisas mejor aun, para ello necesitamos contar con los MR para corroborar los resultados que realicemos con los aparatos apropiados. Dichos aparatos serán tan buenos cuando cumplan las normas respectivas, se cuente con MRC y sean calibrados adecuadamente.

CALIDAD DE LOS RESULTADOS Y PROPIEDADES ANALÍTICAS BASICAS

EXACTITUD

- Para obtener resultados de calidad, es imprescindible usar referencias, y de la comparación adecuada y de la bondad de las referencias dependerá su calidad.
- Es una característica que implica su relación inequívoca con estándares o materiales de referencia adecuados a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones en las que la calibración juega un papel preponderante.



Factores que afectan la exactitud

- **Materiales** (Muestras, reactivos, blancos, estándares, etc...)
- **Instrumentales** (instrumentos, estado, calibración)
- **Metodológicos** (método analítico y su gestión en el laboratorio)
- **Temporales** (día y hora)
- **Humanos** (laborantes y técnicos)

TRAZABILIDAD DE UN RESULTADO ANALITICO

El MRC debe ser trazable a patrones de referencia nacionales o internacionales. Esto debe quedar perfectamente reflejado en el certificado que aporte el organismo productor. Desde un punto de vista práctico, no existe un procedimiento normalizado para asegurar la trazabilidad de los parámetros de interés en un MRC, y cada organismo de certificación tiene sus propios métodos de trabajo. Sin embargo, la trazabilidad de un MRC exige la utilización de varios métodos independientes, es decir, que se encuentre el valor de la propiedad que se desea certificar (por ejemplo la concentración de ácido oleico en manteca de cacahuete) utilizando diversos métodos analíticos cuyos principios de medida sean completamente distintos. Algunos organismos productores realizan los análisis en sus propios laboratorios mientras que otros recurren a laboratorios externos de reconocido prestigio. En ambos casos, el valor certificado de la propiedad deseada del MRC se determina en un ejercicio interlaboratorios, como el valor consenso de los resultados obtenidos mediante los diferentes laboratorios participantes.

ELEMENTOS BÁSICOS DE LA CALIDAD

GARANTIA DE CALIDAD

- Actividades diseñadas, ejecutadas y contrastadas para asegurar que la información analítica generada (resultados) tenga el nivel de calidad que previamente se ha establecido y por tanto pueda exigirse.



EVALUACION DE CALIDAD

- Contraste sistemático y continuado de las actividades implicadas en el control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

- Acciones diferenciadas del trabajo ordinario, planificadas y ejecutadas para obtener resultados con un nivel de calidad (exactitud y representatividad) que satisfaga los requisitos impuestos.

ALGUNOS ELEMENTOS DE ESTADISTICA

VALORES ABERRANTES

Cuando uno o más de los resultados que se obtienen de un conjunto de medidas difiere del resto de forma inexplicable. Por esta razón se denominan resultados anómalos (outliers).

Existen varias pruebas estadísticas para comprobar si se rechazan o no estos datos, las más utilizadas son:

TEST DE DIXON (PRUEBA Q):

Es un cálculo simple para pequeñas muestras (tamaño de 3 a 8), el contraste evalúa una medida sospechosa comparando la diferencia entre ella y la medida más próxima en tamaño con el intervalo de medidas.

Criterio:

La hipótesis nula es que el aparente dato anómalo procede de la misma población que el resto de los datos. La hipótesis alternativa es que procede de una población diferente y que por tanto no debe ser considerado. Si Q_c es menor que $Q_{(0,95)}$ se acepta la hipótesis nula. Si el valor de Q calculado supera el valor crítico, se rechaza el valor sospechoso.



TEST DE GRUBB:

Es otro contratos utilizado en el cual se compara la desviación entre el valor sospechoso y la media muestral, con la desviación estándar de la muestra.

Criterio:

La hipótesis nula es que el valor sospechoso procede de la misma población. Si el valor de G calculado supera al valor crítico se acepta la hipótesis alternativa que el dato sospechoso es anómalo.

MÉTODO DE HUBER:

Se basa en el rechazo de los valores que estén fuera de un determinado intervalo. Se calcula la desviación (r) entre los valores individuales y la mediana X_{med} . Se obtiene el valor absoluto de las medianas y la mediana de estos (MAD).

Criterio:

Los valores aberrantes son los que están fuera del siguiente intervalo

$$[(X_{med} - 3.5MAD), (X_{med} + 3.5MAD)]$$

ENSAYO DE COMPARACION DE RESULTADOS APAREADOS

Se pueden reunir de dos en dos formando parejas: $(x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3) \dots (x_n, y_n)$.

Por una parte existe una variable que distingue una de otras y que sabemos que es significativa: $x_1 \neq x_2 \neq x_3 \dots \neq x_n$ también para $y_1 \neq y_2 \neq y_3 \dots \neq y_n$

La procedencia de una pareja de datos es la misma. Pero la determinación de cada una es variable.

Se calcula la media aritmética de las diferencias

Se calcula la desviación estándar de las diferencias



Las ecuaciones son las siguientes:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)}{n} \text{ y el valor de } S_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}$$

Luego se encuentra el valor de t calculado con la siguiente fórmula:

$$t_c = \frac{\bar{d}}{S_d} \sqrt{n}$$

El valor de t calculado se compara con el de tabla a un nivel de confianza con n-1 grados de libertad. (Ver tabla en anexo 1)

$$H_0: \bar{X}d = 0$$

Las hipótesis a formularse son: $H_a: \bar{X}d \neq 0$

COMPARACIÓN DE VARIAS MEDIAS MUESTRALES MEDIANTE ANOVA DE UN FACTOR

El análisis de varianza es una herramienta estadística que permite comparar simultáneamente varias medias muestrales. Las medias se comparan para establecer si son todas iguales o si al menos una de ellas es distinta de las demás. El nombre **ANOVA** hace alusión a que la comparación que la realiza es mediante el cálculo y la comparación de dos varianzas.

El ANOVA es útil:

- En la comparación de los resultados entre varios laboratorios.
- Para comparar los efectos producidos por diversos cambios en las condiciones de trabajo (pH, concentración de reactivos, tiempos de reacción etc.)
- Para la optimización de procedimientos de laboratorios.



Ejemplo de un diseño experimental de datos de un factor.

Réplicas	Factor: Laboratorios, Analista, Método...			
	1	2	3	... q
1	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X _{1q}
2	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X _{2q}
:	X _{n1}	X _{n2}	X _{n3}	X _{nq}
n				
Media			
S _j	S ₁		

Las hipótesis que nos formulamos:

$$H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \bar{x}_n$$

$$H_a : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \bar{x}_3 \neq \bar{x}_n$$

Sin embargo el valor que se encuentra es el de Fisher.

En el cual se compara la varianza que se obtiene entre los grupos de resultado (entre muestras con la varianza que se obtiene dentro de los resultados (dentro de las muestras)

$$F_c = \frac{SC^2}{SR^2}$$

Donde SC²: es la varianza entre los grupos

SR²: es la varianza (residual) dentro de los grupos.



El valor de F calculado se compara con el valor de F de tabla a un Nivel de confianza dado y un determinado grado de libertad con un contraste unilateral. (Ver tabla anexo 2)

Si el valor de F calculado es menor que el F de tabla se acepta la hipótesis nula y se dice que no existen diferencias significativas entre los promedios de los grupos de resultados. Las ecuaciones para el cálculo son:

ENSAYOS DE COMPARACIÓN DE MAS DE DOS VARIANZAS.

Test de Hartley

Contraste relativamente simple.

Se utiliza para diseños balanceados que tengan el mismo # de grados de libertad.

El parámetro a calcular es la división de la varianza máxima de la serie de resultados entre la varianza mínima de la serie de resultados.

$$r_{\max} = \frac{S^2_{\max}}{S^2_{\min}}$$

El valor de r calculado se compara con el valor de r de tabla, el cual está en función del # de series y de los grados de libertad. (Ver tabla anexo 3).

INCERTIDUMBRE

INCERTIDUMBRE: La Guía para la Expresión de la Incertidumbre (GUM ISO 1993) define la incertidumbre de medición como un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al *mensurando* [10].

Mensurando: Cantidad sujeta a medición (masa, volumen, mol, temperatura, corriente, absorbancia, etc.)

Incertidumbre estándar u (xi): cuando la incertidumbre se expresa como desviación estándar.



Incertidumbre estándar combinada (Uc): cuando los resultados son obtenidos por combinación de incertidumbres estándares de otras variables, a través de la propagación de la incertidumbre.

Incertidumbre expandida o total (Ue): Se define como el intervalo dentro del cual se asegura cae el resultado de la medición del mensurando con un grado de confianza especificado.

CALCULO DE INCERTIDUMBRES EN ANÁLISIS QUÍMICO

Un análisis químico consta de numerosos pasos u operaciones, cada uno de los cuales llevan asociados errores (indeterminados y/o sistemáticos), por lo tanto, el error del resultado final será consecuencia de la acumulación de los errores individuales de estas operaciones.

El cálculo de la incertidumbre del resultado final a partir de las incertidumbres asociadas a cada una de las operaciones individuales, mediante un tratamiento matemático denominado de propagación de errores.

En un análisis químico obtenemos un valor y , que depende de un número de variables de entrada x_i ($i = 1, \dots, n$) según la función:

$$y = G(x_1, \dots, x_n)$$

Si estas variables x_i son independientes y se aplica la ley de propagación de las varianzas, se obtiene:

$$U_y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial G}{\partial x_i} \right)^2 * u_{x_i}^2$$

Donde:

n = número de variables de entrada.

U_{x_i} = incertidumbre de la variable de entrada x_i .

U_y = incertidumbre de la variable de salida y .



Por lo tanto, podemos calcular la incertidumbre del resultado final (U_y) en función de las incertidumbres de las variables de entrada (U_{x_i}).

A partir de la incertidumbre del resultado final se calcula lo que se denomina incertidumbre expandida (U_e), que se obtiene por la ecuación:

$$U_e = K * U_y$$

Donde K es el factor de cobertura que habitualmente se toma igual a 2 con lo que se obtiene un nivel de confianza del 95%. Ver anexo 4.

La incertidumbre asociada a una variable x_i se puede evaluar por los métodos (denominados de tipo A y de tipo B).

Evaluación tipo A

La incertidumbre de una magnitud de entrada X_i obtenida a partir de observaciones repetidas bajo condiciones de repetibilidad, se estima con base en la dispersión de los resultados individuales.

Si X_i se determina por n mediciones independientes, resultando en valores q_1, q_2, \dots, q_n , la mejor estimada x_i para el valor de X_i es la media de los resultados individuales:

$$x_i = \bar{q} = \frac{1}{n} * \sum_{j=1}^n q_j$$

La dispersión de los resultados de la medición q_1, q_2, \dots, q_n para la magnitud de entrada X_i se expresa por su desviación estándar experimental:

$$s(q) = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{j=1}^n (q_j - \bar{q})^2}$$

La incertidumbre estándar $u(x_i)$ de X_i se obtiene finalmente mediante el cálculo de la desviación estándar experimental de la media:

$$u(x_i) = s(\bar{q}) = \frac{s(q)}{\sqrt{n}}$$



Así que resulta para la incertidumbre estándar de X_i :

$$u(x_i) = \frac{1}{\sqrt{n}} * \sqrt{\frac{1}{n-1}} * \sum_{k=1}^n (q_j - \bar{q})^2$$

Para una medición que se realiza por un método bien caracterizado y bajo condiciones controladas, es razonable suponer que la distribución (dispersión) de los q_j no cambia, o sea se mantiene prácticamente igual para mediciones realizadas en diferentes días, por distintos metrólogos, etc. (esto es, la medición está bajo control estadístico). En este caso esta componente de la incertidumbre puede ser más confiablemente estimada con la desviación estándar ***sp* obtenida de un solo experimento anterior**, que con la desviación estándar experimental $s(q)$ obtenida por un número n de mediciones, casi siempre pequeño.

La incertidumbre estándar de la media se estima en este caso por:

$$u(x_i) = \frac{S_P}{\sqrt{n}}$$

Cabe mencionar que n es el número de mediciones repetidas para evaluar $x = q$ promedio, mientras sp se determinó por un número distinto (y grande) de mediciones.

No se puede dar una recomendación general para el número ideal de las repeticiones n , ya que éste depende de las condiciones y exigencias (meta para la incertidumbre) de cada medición específica. Hay que considerar que:

Aumentar el número de repeticiones resulta en una reducción de la incertidumbre por repetibilidad, la cual es proporcional a uno entre raíz de n .

Un número grande de repeticiones aumenta el tiempo de medición, que puede ser contraproducente, si las condiciones ambientales u otras magnitudes de entrada no se mantienen constantes en este tiempo. En pocos casos se recomienda o se requiere n mayor de 10. Por ejemplo cuando se caracterizan instrumentos o patrones, o se hacen mediciones o calibraciones de alta exactitud.



Para determinar el impacto que tiene n en la incertidumbre expandida puede estimarse su influencia en el número de grados efectivos de libertad, de ser aplicable este concepto.

Otras fuentes de incertidumbre que se evalúan con este método son la reproducibilidad y las obtenidas al hacer una regresión lineal.

Evaluación tipo B

En una evaluación tipo B de la incertidumbre de una magnitud de entrada se usa información externa u obtenida por experiencia. Las fuentes de información pueden ser:

- Certificados de calibración.
- Manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento.
- Normas o literatura.
- Valores de mediciones anteriores.
- Conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición.

Distribuciones de probabilidad

La cuantificación de una fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual se refiere este valor. Las distribuciones que aparecen más frecuentemente son:

a) Distribución normal

Los resultados de una medición repetida afectada por magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal. En particular, la distribución de la media de una serie de mediciones repetidas se aproxima a una normal independientemente de la distribución de las lecturas individuales. También la incertidumbre indicada en certificados de calibración se refiere generalmente a una distribución normal.



b) Distribución rectangular

En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo.

Ejemplos típicos son la resolución de un instrumento digital o la información técnica sobre tolerancias de un instrumento. En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.

c) Distribución triangular:

Si además del conocimiento del límite superior e inferior hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.

Por ejemplo, en un baño termostático, que se utiliza para medir la densidad de un líquido, la temperatura puede tener una ligera deriva. Si se mide la temperatura antes y después de la medición de la densidad (resultando en T_1 y T_2), se puede suponer para el momento de la medición de la densidad una temperatura de $(T_1+T_2)/2$ con una distribución triangular entre T_1 y T_2 .

d) Otras distribuciones

Pueden encontrarse también distribuciones como la U, en la cual los extremos del intervalo presentan los valores con probabilidad máxima, típicamente cuando hay comportamientos oscilatorios subyacentes.

Determinación de las incertidumbres estándar

Con el fin de combinar contribuciones de la incertidumbre que tienen distribuciones diferentes, es necesario representar los valores de las incertidumbres originales como



incertidumbres estándar. Para ello se determina la desviación estándar de la distribución asignada a cada fuente.

a) *Distribución normal:*

La desviación estándar experimental de la media calculada a partir de los resultados de una medición repetida.

Cuando se dispone de valores de una incertidumbre expandida U y la distribución del mensurando es o se supone normal, como los presentados por ejemplo en certificados de calibración, se divide U entre el factor de cobertura k , obtenido ya sea directamente o a partir de un nivel de confianza dado:

b) *Distribución rectangular:* $u(x_i) = \frac{U}{k}$

Si la magnitud de entrada X_i tiene una distribución rectangular con el límite superior a_+ y el límite inferior a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$$

Y la incertidumbre estándar se calcula por: $u(x_i) = \frac{a_+ + a_-}{\sqrt{12}}$

O por: $u(x_i) = \frac{a/2}{\sqrt{3}}$

Donde $a/2$ es el semiancho del intervalo a con: $a = a_+ - a_-$

Una aplicación típica es la resolución de un instrumento digital. También la incertidumbre relacionada con el número finito de cifras significativas de datos tomados de la literatura puede ser tratada con esta distribución (siempre y cuando no haya indicios que la incertidumbre en realidad es mayor que la incertidumbre relacionada con la última cifra significativa). Si se aplica a la resolución o a datos tomados de la literatura, a corresponde al último dígito significativo o a la última cifra significativa respectivamente.



c) *Distribución triangular:*

Como en una distribución rectangular, para una magnitud de entrada X_i que tiene una distribución triangular con los límites a_+ y a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$$

La incertidumbre estándar se calcula en este caso por:

$$u(x_i) = \frac{a_+ + a_-}{\sqrt{24}} = \frac{a/2}{\sqrt{6}}$$

Combinación

El resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes es la incertidumbre estándar combinada $uc(y)$.

La contribución $u_i(y)$ de cada fuente a la incertidumbre combinada depende de la incertidumbre estándar $u(x_i)$ de la propia fuente y del impacto de la fuente sobre el mensurando. Es posible encontrar que una pequeña variación de alguna de las magnitudes de influencia tenga un impacto importante en el mensurando, y viceversa.

Se determina $u_i(y)$ por el producto de $u(x_i)$ y su coeficiente de sensibilidad c_i (o factor de sensibilidad):

$$u_i(y) = c_i * u(x_i)$$

Coefficiente de sensibilidad

El coeficiente de sensibilidad describe qué tan sensible es el mensurando con respecto a variaciones de la magnitud de entrada correspondiente. Para su determinación existen varios métodos:

a) *Determinación a partir de una relación funcional*

Si el modelo matemático para el mensurando $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$ describe la influencia de la magnitud de entrada X_i suficientemente bien mediante una relación funcional.



El coeficiente de sensibilidad c_i se calcula por la derivada parcial de f con respecto a X_i :

$$c_i = \left. \frac{\partial f(X_1, \dots, X_N)}{\partial X_i} \right|_{X_1=x_1 \dots X_N=x_N}$$

b) *Otros métodos de determinación:*

Si la influencia de la magnitud de entrada X_i en el mensurando Y no está representada por una relación funcional, se determina el coeficiente de sensibilidad c_i por una estimación del impacto de una variación de X_i en Y según:

$$c_i = \frac{\Delta Y}{\Delta X_i}$$

Esto es, manteniendo constantes las demás magnitudes de entrada, se determina el cambio de Y producido por un cambio en X_i por una medición o a partir de la información disponible.

CROMATROGRAFIA HPLC

La **Cromatografía líquida de alta eficacia** o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces **Cromatografía líquida de alta presión** o *High pressure liquid chromatography* (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la *HPLC isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza



del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el Acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

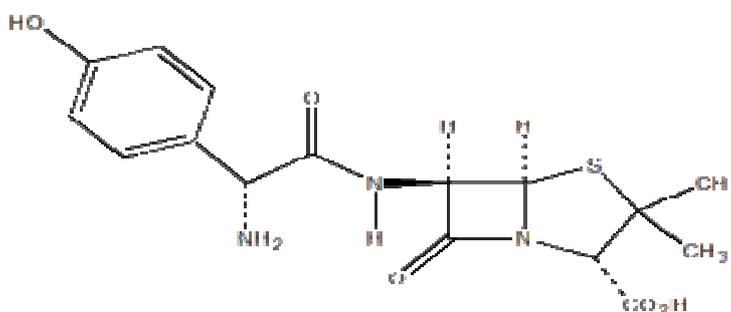
Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de Acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/Acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de Acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.



AMOXICILINA

La **amoxicilina** es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de un amino penicilina. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram-negativos. Por esto se emplea a menudo como primer remedio en infecciones de diferente gravedad, tanto en medicina humana como también en veterinaria. Se utiliza por vía oral o parenteral, aunque la forma parenteral (intramuscular o intravenosa) no está aprobada en todos los países [9].

Formula estructural de la Amoxicilina Base



Datos Generales:

Nombre sistemático: **Acido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) Acetamido]-3,3-dimetil-7o**

Nombre común: **Amoxicilina.**

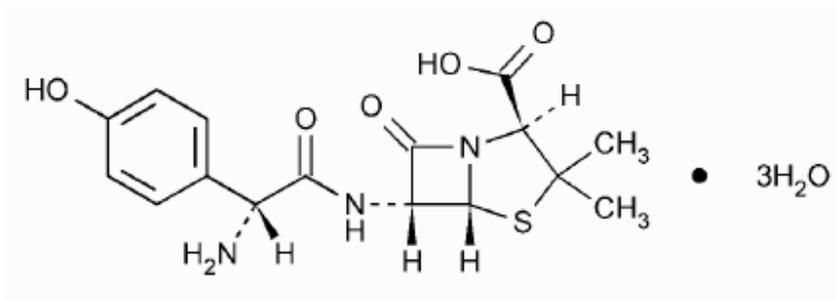
Fórmula molecular **C₁₆H₁₉N₃O₅S.**

Masa molecular: **365,41 g/mol.**

Apariencia: **Polvo Blanco.**



Formula estructural de la Amoxicilina Trihidrato



Molecular Formula

$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Molecular Weight

419.45

Propiedades:

pH: entre 3,5 y 6,0 en una solución que contiene 2 mg por ml.

Solubilidad: 1g en 400 g. de agua, 1 en 1000 de etanol, y 1 en 200 de metanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

Constante de disociación: pK_a 2.4, 7.4, 9.6.

Coefficiente de partición: $\text{Log } P$ (octanol), 0.87

Espectro Ultravioleta: Amoxicilina Trihidrato: Acido acuoso 230 nm ($A=225$ a), 272nm ($A=26$ a); Acuoso alcalino 247 nm($A=286$ b), 291 ($A=62^a$).



VII. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 EQUIPOS, MATERIALES Y MUESTRA

7.1.1 EQUIPOS:

1. Cromatografo Liquido Marca Varian 920 LC con detector UV Visible, Automuestreador y Calentador de Columna manejado por el Software Galaxie Chromatography Data System Versión 1.9.301.220
2. Balanza Analítica Electrónica marca A&D.
3. pHMETRO Marca METTLER TOLEDO.
4. Filtrador Millipore.
5. Filtrador al vacio Marca SIBATA.

7.1.2 MATERIALES:

1. Balones volumétricos Pírex Clase A de 2000 y 50 ml.
2. Probeta Pírex de 100 y 500 ml.
3. Beacker KIMAX de 100 ml y Pírex de 10 y 20 ml.
4. Pipetas volumétricas Clase A de 5 y 10 ml.
5. Espátula.
6. Filtros de Nylon Marca Varian de 0.45 μ m Tamaño de poro x 13 mm de diámetro.
7. Filtros de Nylon Marca Varian de 0.45 μ m Tamaño de poro x 47 mm de diámetro

7.1.3 REACTIVOS:

1. Buffer: Fosfato Monobásico de Potasio pH=5
2. Regulador de pH: Hidróxido de Potasio.
3. Acetonitrilo grado HPLC.
4. Agua Destilada.
5. Estándar: Material de Referencia de Amoxicilina Trihidrato USP.
6. Materia Prima: Amoxicilina Trihidrato.



7.1.4 MUESTRA:

La muestra está constituida por 20g de Amoxicilina Trihidrato, adquirida en los meses de noviembre y diciembre del año 2008 gracias a la donación del laboratorio PANZYMA, conteniendo las siguientes especificaciones:

- Código PANZYMA: 20029
- Lote: 27078/MP
- Fecha de vencimiento: 2010/20/06

7.2 Análisis Fisicoquímico

El análisis fisicoquímico se realizó de acuerdo a la técnica descrita en la Farmacopea Norteamericana USP 29 – NF 24 (“Amoxicilina para Materia Prima”) [11].

- **Descripción**
- **Ensayo**

7.3 Preparación de soluciones

7.3.1 Preparación de la solución Buffer de Fosfato Monobásico de Potasio:

1. Se pesan exactamente 13.6 g de Fosfato Monobásico de fosfato.
2. Se transfieren cuantitativamente a un balón volumétrico de 2000 ml.
3. Se adicionan 100 ml de agua destilada hasta que se disuelva completamente.
4. Se lleva a un volumen de 1900 ml.
5. Ajustar el pH de esta solución a 5.0 ± 0.1 con Hidróxido de potasio al 45% P/P.
6. Una vez ajustado el pH aforar a 2000 ml.
7. Filtrar y desgacificar el buffer usando un filtro de Nylon de $0.45\mu\text{m}$ Tamaño de poro x 47 mm de diámetro.

7.3.2 Preparación de la solución de Hidróxido de Potasio al 45 % P/P:

Pesar exactamente 11.25 g de hidróxido de potasio y adicionar 13.75 g de agua destilada y agitar hasta disolución completa y dejar enfriar.



7.3.3 Preparación de la Solución del Material de Referencia de Amoxicilina:

1. Pesar exactamente en un pedazo de papel aluminio de 2 x 2 cm 25 mg del estándar de referencia de amoxicilina.
2. Transferir los 25 mg del MR a un balón de 50 ml.
3. Adicionar 20 ml de solución buffer de fosfato pH 5.0 ± 0.1 curando el papel aluminio para evitar que queden residuos del estándar adheridos a él.
4. Agitar la solución mecánicamente por 5 minutos y sonificar posteriormente en baño ultrasónico durante 2 minutos.
5. Dejar equilibrar térmicamente la solución a temperatura ambiente.
6. Aforar con solución buffer.
7. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de Nylon de $0.45\mu\text{m}$ Tamaño de poro x 47 mm de diámetro.
8. Adicionar 2 ml de la solución filtrada a un vial.

7.3.4 Preparación de la Solución del Material de Referencia Interno de Amoxicilina:

1. Pesar exactamente en un pedazo de papel aluminio de 2 x 2 cm 25 mg de Materia prima de amoxicilina Trihidrato (material de referencia interno de amoxicilina)
2. Transferir los 25 mg de materia prima de amoxicilina a un balón de 50 ml.
3. Adicionar 20 ml de solución buffer de fosfato pH 5.0 ± 0.1 curando el papel aluminio para evitar que queden residuos adheridos a él.
4. Agitar la solución mecánicamente por 5 minutos y sonificar posteriormente en baño ultrasónico durante 2 minutos.
5. Dejar equilibrar térmicamente la solución a temperatura ambiente.
6. Aforar con solución buffer.
7. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de Nylon de $0.45\mu\text{m}$ Tamaño de poro x 47 mm de diámetro.
8. Adicionar 2 ml de la solución filtrada a un vial.



7.4 PROCEDIMIENTOS

7.4.1 Procedimiento para calcular el Ruido y la Deriva del sistema de detección UV-Visible:

El cálculo del ruido y la deriva se hizo a través del programa Galaxie Chromatography Data System, usando como fase móvil una solución que contenga 98% de Buffer de Fosfato pH 5 y 2% de Acetonitrilo e inyectando solución blanco 10 veces.

7.4.2 Procedimiento para la determinación de la estabilidad del sistema Cromatografico

Para determinar la estabilidad del sistema cromatografico se preparó una solución de material de referencia interno de amoxicilina conteniendo una concentración de 0.5 mg/ml. Esta solución se inyectó 10 veces y mediante el programa Galaxie determinamos el número de platos teóricos y asimetría de los picos.

7.4.3 Procedimiento para el estudio de la estabilidad de las lecturas analíticas del Material de Referencia Interno de Amoxicilina

Para el estudio de la estabilidad de las lecturas analíticas del material de referencia interno de amoxicilina se preparó una solución de Material de referencia interno, que contenía 0.5 mg/ml, en solución buffer de fosfato pH 5, esta solución se inyectó 10 veces al día, durante 5 días. Los resultados de las áreas de los picos obtenidos se utilizaron para elaborar las cartas de control a partir del análisis de ANOVA, tanto para la exactitud de las mediciones analíticas como para la repetibilidad.

- Para realizar el análisis de ANOVA de un Factor, demostramos si las varianzas de los resultados obtenidos entre los días eran homocedasticas o heterocedasticas a través del test de Hartley. Las hipótesis planteadas fueron:

$$H_0 : S_{D1}^2 = S_{D2}^2 = S_{D3}^2 = S_{D4}^2 = S_{D5}^2$$

$$H_1 : S_{D1}^2 \neq S_{D2}^2 \neq S_{D3}^2 \neq S_{D4}^2 \neq S_{D5}^2$$



Criterio de aceptación:

Si la r calculado es mayor al r al 95% se rechaza la hipótesis nula. (Ver anexo 3)

- Una vez que demostramos que las varianzas eran homocedasticas aplicamos el análisis de varianza de un factor, lo cual nos permitió demostrar si existía diferencia significativa dentro y/o entre los días, en los cuales se determinará las áreas de los picos obtenidos. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

$$H_0 : \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5$$

$$H_1 : \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5$$

Criterio de aceptación:

Si la F calculado es mayor al F al 95% se rechaza la hipótesis nula. (Ver anexo 2)

Los resultados del cálculo del ANOVA de un factor se anotaran en una tabla.

La razón de la raíz de la varianza dentro de los días, entre la media global nos permitirá encontrar la exactitud de la estabilidad de las lecturas analíticas del material de referencia interno de amoxicilina, expresada como un %RSD, según ecuación N° 1.

$$\% RSD = \frac{\sqrt{S_{DD}^2}}{X} * 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

La Repetibilidad de la estabilidad en las lecturas analíticas del material de referencia interno de amoxicilina expresada como un %RSD se calcula mediante la ecuación N° 2:

$$\% RSD = \frac{\sqrt{\frac{S_{ED}^2 - S_{DD}^2}{n} + S_{DD}^2}}{X} * 100 \quad [\text{Ec. 2}]$$

Las graficas de control para monitorear la exactitud y repetibilidad de la estabilidad de las lecturas analíticas del material de referencia interna de amoxicilina se elaboraron tomando en cuenta las ecuaciones consideradas en la siguiente tabla:



Limites	Exactitud	Repetibilidad
LS+3S	$\bar{X} + 3 \frac{S_{PI}}{C_n \sqrt{n}}$	
LS+2S	$\bar{X} + 2 \frac{S_{PI}}{C_n \sqrt{n}}$	$\sqrt{\frac{(n-1)S_r^2}{\chi_{\alpha/2}^2}}$
LC	\bar{X}	$\sqrt{S_{DD}^2}$
LI-2S	$\bar{X} - 2 \frac{S_{PI}}{C_n \sqrt{n}}$	$\sqrt{\frac{(n-1)S_r^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2}}$
LS-3S	$\bar{X} - 3 \frac{S_{PI}}{C_n \sqrt{n}}$	

Tabla: Ecuaciones para la elaboración de la carta de control, para la exactitud, repetibilidad y precisión intermedia.

Donde Cn: Es un factor utilizado para la elaboración de los gráficos de control y que depende del número de lecturas que se realizan por días para el control de la exactitud y repetibilidad siendo en este caso de 0.7979 para 2 lecturas por día. (Ver Anexo 4)

7.4.4 Procedimiento para el estudio de la homogeneidad del Material de referencia interno de amoxicilina

La homogeneidad del material de referencia interno se demostró a través del estudio de cuatro soluciones que se prepararon de la siguiente manera:

1. Se mezcló en una bolsa, mecánicamente, por una hora el contenido de 20 gramos del material de referencia interno de amoxicilina.
2. Se extendió de manera homogénea, sobre una superficie plana todo el material y se trazó de manera imaginaria cuatro cuadrantes de los cuales se tomaron 25mg de material de referencia de cada uno de ellos.



3. Se prepararon las cuatro soluciones de material de referencia interno siguiendo los pasos establecidos en el punto 7.3.4.
4. Se inyectaron al Cromatografo, 10 µl de solución hasta completar 5 lecturas de cada una de las cuatro soluciones.
 - Con las áreas obtenidas demostramos si las varianzas de los resultados entre las soluciones eran homocedasticas o heterocedasticas a través del test de Hartley. Las hipótesis planteadas fueron:

$$H_0 : S_{D1}^2 = S_{D2}^2 = S_{D3}^2 = S_{D4}^2 = S_{D5}^2$$

$$H_1 : S_{D1}^2 \neq S_{D2}^2 \neq S_{D3}^2 \neq S_{D4}^2 \neq S_{D5}^2$$

Criterio de aceptación:

Si la r calculado es mayor al r al 95% se rechaza la hipótesis nula.

ANOVA DE UN FACTOR

Una vez que demostramos que las varianzas eran homocedasticas aplicamos el análisis de varianza de un factor, lo cual nos permitió demostrar si existía diferencia significativa dentro y/o entre las soluciones.

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

$$H_0 : \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5$$

$$H_1 : \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5$$

Criterio de aceptación:

Si F calculado es mayor que F al 95% se rechaza la hipótesis nula y decimos que el material de referencia interno no es homogéneo.

Los resultados del cálculo del ANOVA de un factor se anotaron en la tabla respectiva.



7.3.5 Procedimiento para el estudio de la estabilidad del estándar interno de Amoxicilina.

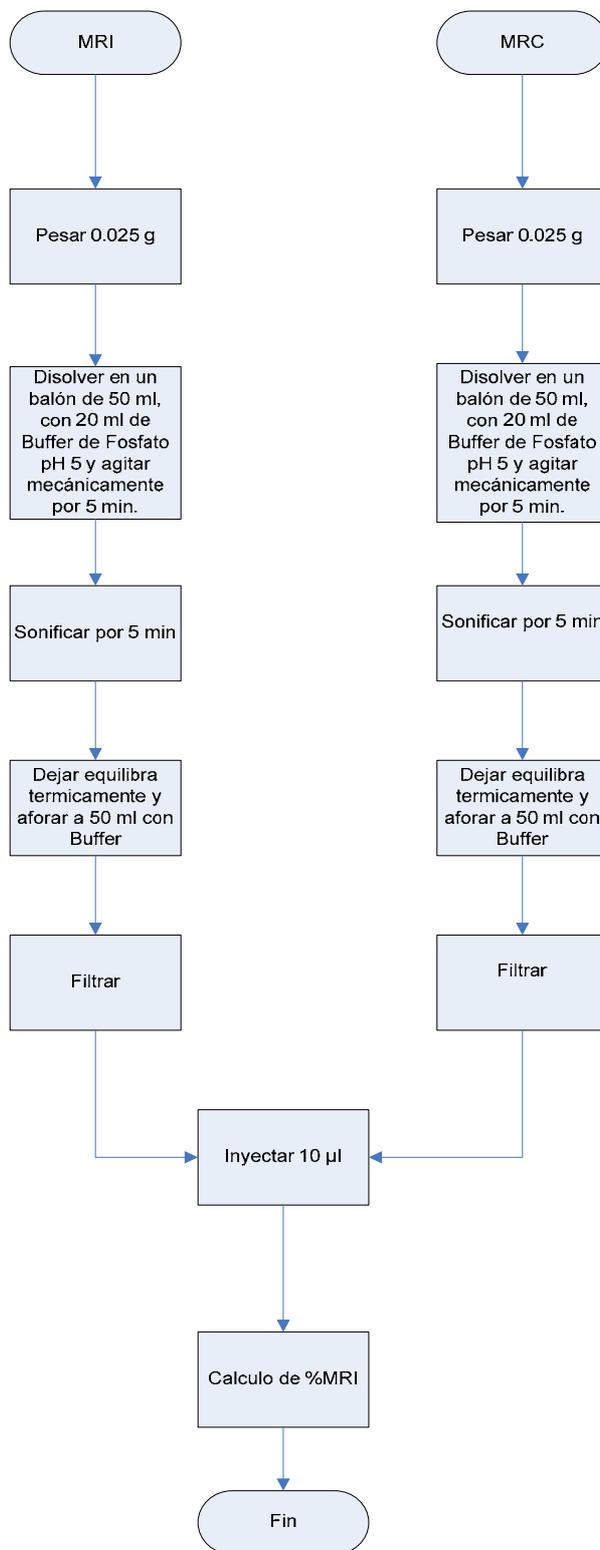
1. Para el estudio de la estabilidad del estándar interno de amoxicilina se prepararon tres soluciones a tres niveles de concentración: 0.25, 0.5 y 0.75 mg/ml del material de referencia interno de amoxicilina.
2. Se inyectó 10 µl de estas soluciones en el Cromatografo, 3 veces seguidas cada 0, 2, 4, 6, 12,18, 24, 36, 46, 52 Horas.
3. Se graficaron las áreas obtenidas a cada tiempo en función de sus concentraciones y mediante el estudio de la magnitud de la pendiente se demostró en que tiempo el estándar se degrado.

7.3.6 Procedimiento para la elaboración del material de referencia interno:

El procedimiento para la elaboración del material de referencia interno de amoxicilina se resume en el siguiente Flujograma:



Flujograma para la Preparación del MRI.





7.3.6.1 Condiciones Cromatográficas:

- Columna Marca Agilent Zorbax eclipse XDB-C18 de tamaño de partícula 5 μm .
diámetro interno y 15 cm de largo.
- Longitud de onda 230 nm.
- Velocidad de flujo: 1ml/minuto.
- Temperatura de la columna: 25° C.
- Volumen de inyección: 10 μl .
- Composición de la fase móvil: 98% Buffer y 2% Acetonitrilo.
- Número de platos teóricos: no menos de 1700
- Factor de coe: no más de 2.5
- Desviación estándar relativa para réplicas de inyecciones: no más que el 2.0%

7.4.6.1 Procedimiento para la inyección del material de referencia certificado y el material de referencia interno.

1. Inyectamos de manera alterna 10 μl de MRC y luego 10 μl de MRI, hasta completar 10 lecturas.
2. Comprobamos si existían datos outliers a través de la prueba de Grubbs.
3. Comparamos las medias de ambas soluciones mediante la prueba de medias apareadas:

Las hipótesis planteadas fueron:

$$H_0 : \bar{x}_A = \bar{x}_B$$
$$H_1 : \bar{x}_A \neq \bar{x}_B$$

Criterio de aceptación:

Si la t calculada es mayor a la t al 97.5% se rechaza la hipótesis nula para n-1 grados de libertad. (Ver anexo 1)



7.4.6.2 Modelo matemático para encontrar el porcentaje pureza del material de referencia interno

$$\%MRI = \frac{\bar{A}_{MRI} * M_{MRC} * P * V_2}{\bar{A}_{MRC} * V_1 * M_{MRI}} * 100 \quad [\text{Ec. 3}].$$

Donde:

% de MRI: Es el porcentaje de Amoxicilina Trihidrato presente en el Material de Referencia Interna.

\bar{A}_{MRI} : Es el área promedio de las 10 inyecciones del material de referencia interno.

\bar{A}_{MRC} : Área promedio de las 10 inyecciones del material de referencia certificado.

M_{MRC} : Es la cantidad de material de referencia certificado pesado en miligramos.

M_{MRI} : Es la cantidad de material de referencia interno pesado en miligramos.

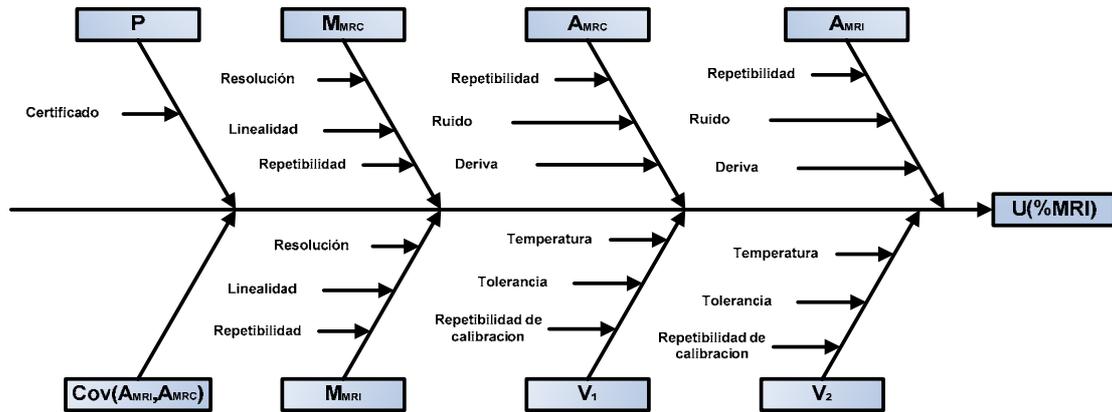
V_1 : Volumen del balón en el cual se preparo el material de referencia certificado.

V_2 : Volumen del balón en el cual se preparo el material de referencia interno.

P: Pureza del material de referencia certificado de Amoxicilina (Ver anexo 5).

7.3.6.3 Procedimiento para estimar la incertidumbre en la preparación del Material de Referencia Interno.

Las fuentes de incertidumbre que influyen en la preparación del material de referencia interno de amoxicilina están determinadas por el número de variables que componen al modelo matemático, así como los factores relacionados a la incertidumbre de los equipos (Cromatografo y detector, Ruido y Deriva) e instrumentos usados para preparar las soluciones, condiciones ambientales y determinación de las áreas de los picos. En el siguiente diagrama de causa y efecto se identifican todas las variables que influyen en la incertidumbre de la pureza del material de referencia interno de Amoxicilina.



7.3.7 Elaboración del certificado interno del material de referencia interno de amoxicilina

Una vez que se estudiaron las propiedades del estándar de referencia interno (estabilidad, homogeneidad, pureza e incertidumbre) se procedió a la elaboración de un certificado interno que contiene los siguientes aspectos:

1. Encabezado: Contiene el logotipo, nombre del laboratorio donde se elaboró el material de referencia y la cita siguiente: certificado de análisis interno del material de referencia.
2. Título: Certificado del material de referencia interno de Amoxicilina.
3. Número de lote.
4. Fórmula estructural y molecular
5. Peso molecular.
6. Valor de la propiedad certificada con su incertidumbre.
7. Cantidad contenida en el embase.
8. Apariencia.
9. Riesgos.
10. Condiciones de almacenamiento.
11. Instrucciones de uso.
12. Procedimiento por medio del cual se obtuvo la incertidumbre.
13. Firma del responsable de control de calidad.



VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

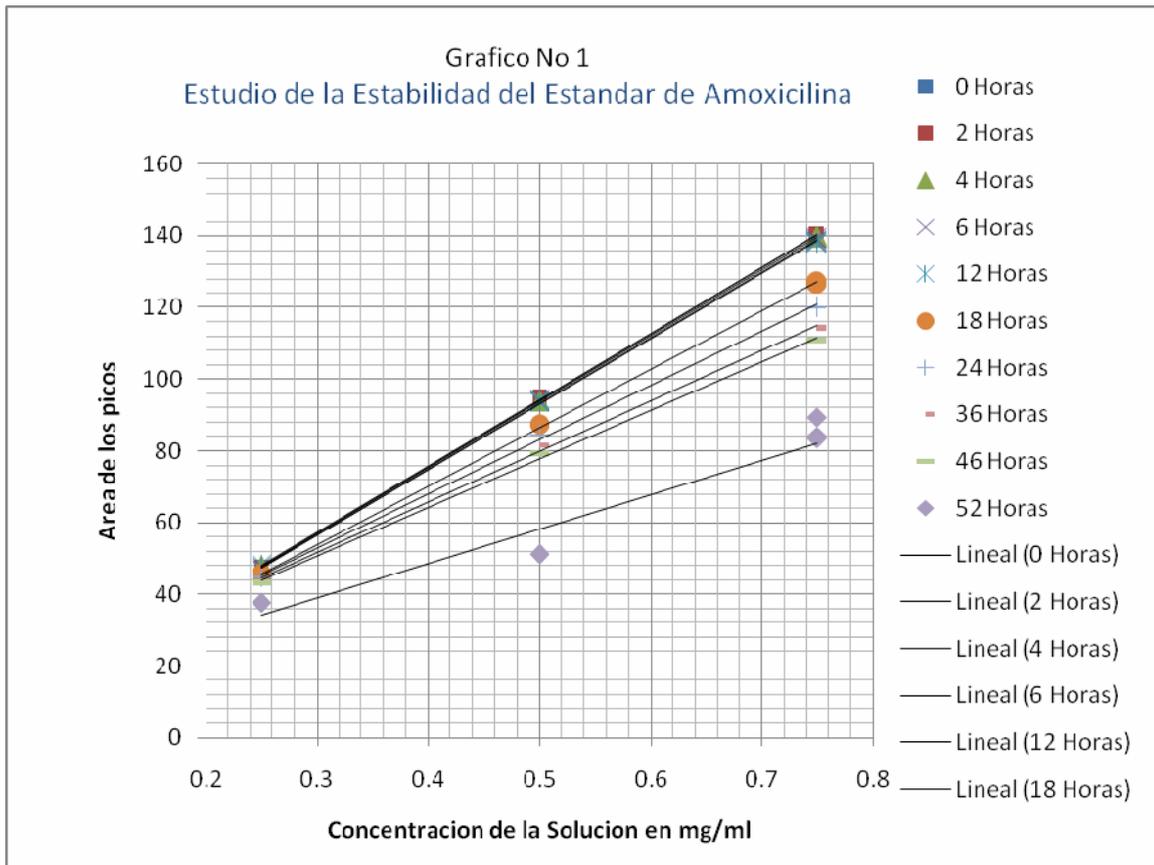
Detección de la estabilidad del sistema Cromatografico Ruido y Deriva

<i>Parámetros</i>	<i>Valores Promedios</i>	<i>% RSD</i>	<i>USP</i>
N	2260.814	1.39	No menos que 1700
Tr	3.827	0.28	
As	0.876	0.59	No más de 2.5
Áreas	94.44	0.20	No más que 2%
Ruido	0.4693		
Deriva	0.0341		

Tabla N° 1

Discusión:

Los datos de la tabla N°1 muestran los resultados correspondientes al estudio de la estabilidad del sistema cromatografico, en la misma podemos observar que el número de platos teóricos (N) es mayor a 2000, el factor de asimetría (As) es 0.876, y la desviación estándar relativa para las replicas de las áreas de 10 inyecciones sucesivas es de 0.2%, los parámetros utilizados para demostrar que el sistema esta estable están en concordancia con los establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (Ver columna 4 de la tabla 1). El valor del ruido y la deriva fueron de 0.4693 y 0.0341 respectivamente.



Discusión:

En el gráfico N° 1, se muestran los resultados obtenidos al realizar el estudio de la estabilidad del material de Referencia Interno de Amoxicilina, en el que se observa que durante las primeras 6 Horas el estándar permanece estable, y luego de 12 horas la solución comienza a degradarse, acelerándose a partir de las 18 horas, por lo tanto el estándar solo se mantiene estable durante estas 6 horas, debiendo prepararse cada vez que se realice un análisis.



Resultados del estudio de Homogeneidad del MRI de Amoxicilina.

<i>Parámetros</i>	<i>Solución 1</i>	<i>Solución 2</i>	<i>Solución 3</i>	<i>Solución 4</i>
Media	92.86	92.74	92.72	92.74
Varianza	0.028	0.008	0.017	0.118
r_{cal} Hartley	14.75		r_{tabla}	20.6

Tabla N°2

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Varianza</i>	<i>F calculado</i>	<i>Valor critico de F</i>
Entre las soluciones	0.0615	3	0.0205	0.479	3.24
Dentro de los soluciones	0.684	16	0.04275		
Total	0.7455	19			

Tabla N°3

Discusión:

En las tablas N° 2 y N° 3 se muestran los resultados para el análisis de homogeneidad del MRI de Amoxicilina. Para el estudio de la homogeneidad del estándar interno fue necesario demostrar que las varianzas entre las cuatro soluciones son homocedásticas y que no existe diferencia significativa entre las cuatro soluciones.

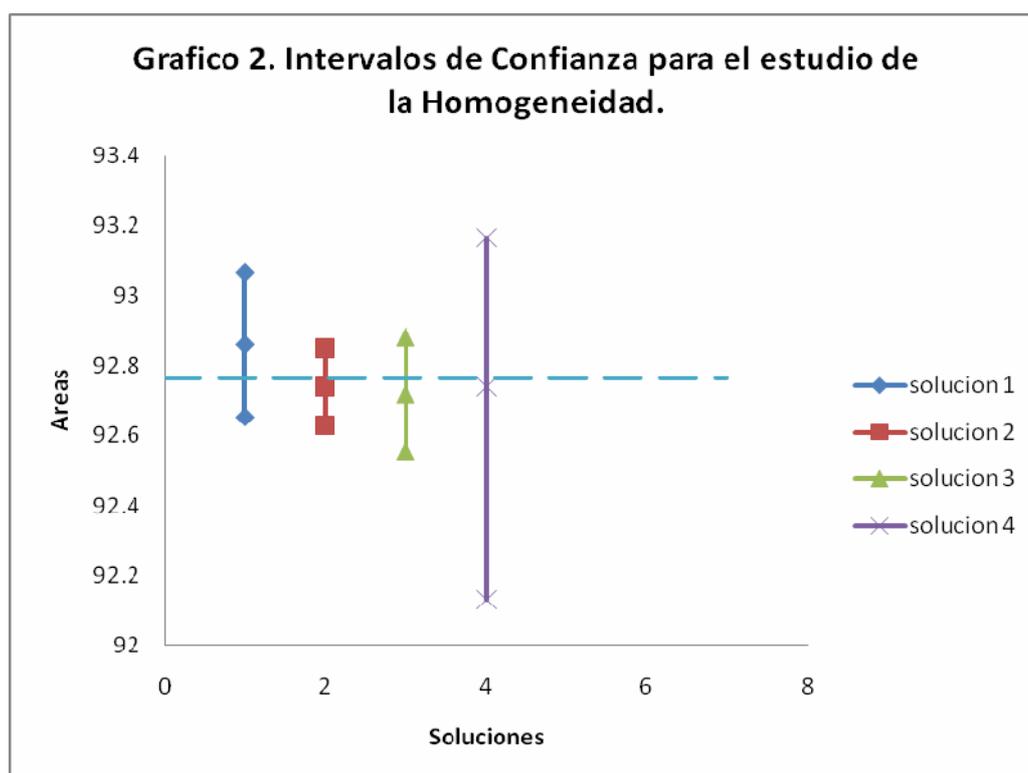
En la tabla N° 2 el valor del r calculado del test de Hartley, para el estudio de la homocedasticidad, es mucho menor al valor de r de tabla, por lo tanto las varianzas de los cuatros grupos de resultados se considera que son iguales.

Para ver la diferencia entre las cuatro soluciones se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA).



En la tabla N° 3 se resumen los resultados para el análisis de las varianzas, en el cual la F de Fisher calculada es mucho menor al F crítico por lo tanto el material de referencia se considera que es homogéneo.

Las diferencias de los resultados se muestran en la gráfica N° 2 de los intervalos de confianza. Como puede verse las varianzas son homogéneas y por lo tanto hay repetibilidad en las soluciones.





Resultados del estudio de la Estabilidad de las Lecturas analíticas del Material de Referencia Interno Amoxicilina

<i>Parámetros</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>%RSD</i>
Repetibilidad	0.184	0.193
Precisión Intermedia	0.563	0.590
Gran media	95.408	
Test Hartley	$R_{cal}=4.99$	$R_{tabla}=7.11$

Tabla N° 4

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Varianza</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre los días	11.4668	4	2.8667	84.31	2.58
Dentro de los días	1.53	45	0.034		
Total	12.9968	49	0.5150154		

Tabla N° 5

Discusión:

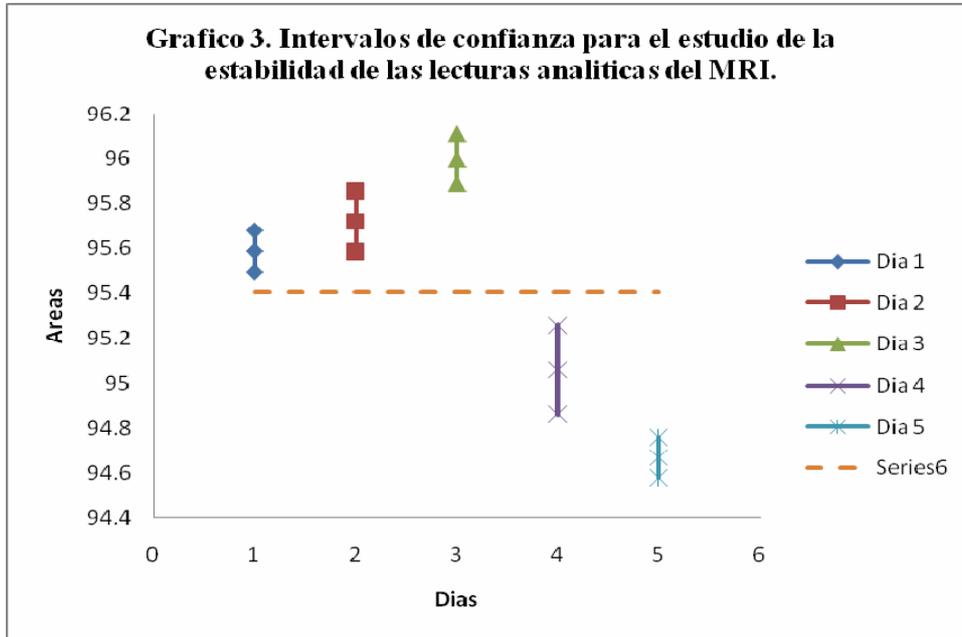
Las tablas N° 4 y N° 5, contienen los datos sobre la Repetibilidad, la Precisión Intermedia y el estudio de la homogeneidad de las varianzas para el estudio de la estabilidad de las lecturas analíticas del material de referencia interno de amoxicilina.

De los valores de la tabla 4 se deduce que las varianzas de los resultados obtenidos durante los 5 días son homocedasticas ya que el r_{cal} del test de Hartley es menor al r_{tabla} . La repetibilidad, bajo iguales condiciones de trabajo y la precisión intermedia, dados como un porcentaje RSD son menores al 1%. Lo que nos indica que existe una buena precisión entre las mediciones.

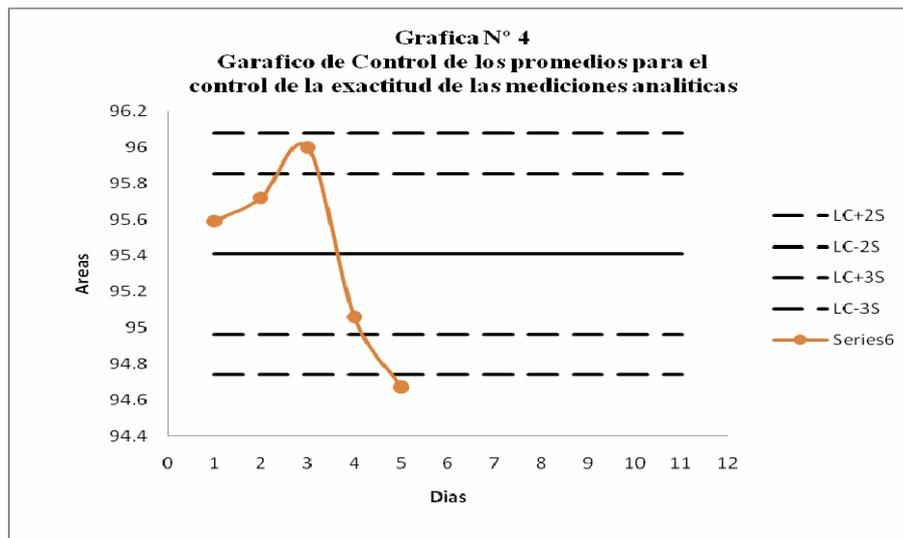
Para comprobar, si no existen diferencias entre las medias, de los grupos de resultados se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Los resultados se muestran en la tabla 5 en la cual se puede ver que existen diferencias significativas entre los resultados entre los días, puesto que el F calculado es mucho mayor al F de tabla.



Las diferencias en los resultados pueden verse en el gráfico N° 3 de los Intervalos de Confianza, donde se nota mayor variación de los resultados en los días 3 y 5.

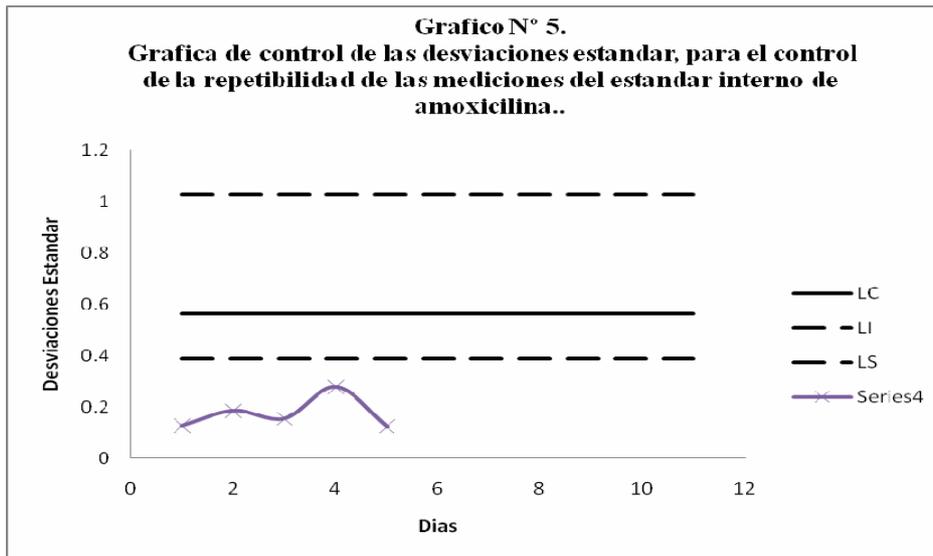


A partir de las medias y desviación estándar de la precisión intermedia, se elaboraron los gráficos de control para la exactitud y Repetibilidad de los datos analíticos, los cuales pueden verse en los gráficos N° 4 y N°5.





En el gráfico N° 4 se observa que en el día 3 existe un punto dentro del límite de control de advertencia volviendo a control el día cuatro y saliendo de control estadístico el día 5. Esta variación en la exactitud de las mediciones pudo ser ocasionada por problemas eléctricos y técnicos relacionados a corte de energía y/o errores de pesada.



El grafico N° 5 se observa que existe una buena Repetibilidad de las mediciones analíticas.



Resultados de las áreas del MR Y MRI

N°	MR	MRI
1	94*	94.8
2	94.4	94.9
3	94.4	94.8
4	94.4	94.3
5	94.5	94.5
6	94.6	94.9
7	94.4	94.3
8	94.7	94.9
9	94.6	94.5
10	94.4	94.8
Promedio	94.44	94.67

Tabla N° 6

Discusión:

En la tabla N° 6 se encuentran los resultados de las áreas de los picos del MR y del MRI de Amoxicilina. Al determinar la existencia de datos anómalos mediante el Test de Grubbs se encontró que el dato 1 del MR era anómalo puesto que el test estadístico de Grubbs para ese valor fue de 2.316, siendo mayor que el 5% de su valor crítico y menor o igual que el 1% de su valor crítico (Valor crítico al 5% 2.29, valor crítico al 1% 2.482). Este dato se considera anómalo pero no aberrante ya que ha de esperarse que el 5% de los resultados de un grupo salgan de control estadístico, por lo que el resultado se debe conservar para realizar los cálculos de la Pureza del MRI. Para los otros grupos de resultados (MRI) se determino que no existían datos anómalos.

Al aplicar el estadístico de las medias apareadas (t) para demostrar si existían diferencias significativas entre las medias de ambos grupos de resultados se demostró que si existía diferencia entre ambas media ya que el t_{cal} fue mayor al t_{tabla} ($T_c = 2.379$, $T_{tabla} = 2.262$), por lo que discernimos que el contenido de amoxicilina en el material de referencia interno debe ser diferente de la concentración en la solución del estándar de referencia.



Resultados de las fuentes de incertidumbre que influyen en la preparación del Material de Referencia Interno.

Variable	Fuente	Especificación	Distribución	Fórmula	Incertidumbre
Pureza	Certificado	0.1%	Rectangular	$u_p = \frac{a}{\sqrt{3}}$	0.00057735
Masa MRI	Resolución	0.1mg	Rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.000028867
	Linealidad	0.0002g	Rectangular	$u_L = \frac{L}{\sqrt{3}}$	0.00011547
	Repetibilidad	7.07107×10^{-5}	t Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	4.08248×10^{-5}
Área MR	Repetibilidad	0.18973666	t Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.060000002
	Ruido	0.469	Rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.135388638
	Deriva	0.0341	Rectangular	$u_D = \frac{D}{2\sqrt{3}}$	0.00984382
Cov(MRI, MRC)	Medias apareadas	$u(A_i, A_c) = \frac{\sum (A_{Ri} - \bar{A}_{Ri})(A_{RC} - \bar{A}_{RC})}{n(n-1)}$			0.000133333
Área MRI	Repetibilidad	0.245175674	t-Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.077531355
	Ruido	0.469	Rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.135388638
	Deriva	0.0341	Rectangular	$u_D = \frac{D}{2\sqrt{3}}$	0.00984382



Continuación Tabla N° 7

<i>Variable</i>	<i>Fuente</i>	<i>Especificación</i>	<i>Distribución</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Incertidumbre</i>
Masa MRI	Resolución	0.1mg	rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.000028867
	linealidad	0.0002g	Rectangular	$u_L = \frac{L}{\sqrt{3}}$	0.00011547
	Repetibilidad	7.07107×10^{-5}	t Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	4.08248×10^{-5}
Volumen 1	Temperatura	0.5 °C	Rectangular	$u_T = \frac{\Delta T}{2\sqrt{3}}$	0.144337567
	Tolerancia	0.05	Triangular	$u_T = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.024494897
	Repetibilidad	0.017002957	t-Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.0053766807
Volumen 2	Temperatura	0.5 °C	Rectangular	$u_T = \frac{\Delta T}{2\sqrt{3}}$	0.144337567
	Tolerancia	0.05	Triangular	$u_T = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.024494897
	Repetibilidad	0.017002957	t-Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.0053766807

Tabla N° 7



Resultados para el cálculo de la Incertidumbre combinadas para cada parámetro que influye en la incertidumbre del cálculo de la pureza del material de referencia interno.

<i>Variable</i>	<i>Ecuación</i>	<i>Incertidumbre combinada</i>
Pureza	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.00057735
Masa MRI	$u_R = \sqrt{u_{Rep}^2 + u_{Res}^2 + u_L^2}$	0.00012111
Masa MRI	$u_R = \sqrt{u_{Rep}^2 + u_{Res}^2 + u_L^2}$	0.00012111
Área MRI	$u_R = \sqrt{u_{Rep}^2 + u_{Ruid}^2 + u_D^2}$	0.15639773
Área MR	$u_R = \sqrt{u_{Rep}^2 + u_{Ruid}^2 + u_D^2}$	0.14848952
Cov(MRI, MRC)	$u(Cov) = 2 * \left(\frac{\partial C_{MRI}}{\partial A_{MRI}} \right) \left(\frac{\partial C_{MRC}}{\partial A_{MR}} \right) u_{(A_{MR}, A_{MRI})}$	-0.00029972
Volumen 1	$u_R = \sqrt{u_T^2 + u_{Rep}^2 + \left(\frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}} \right)^2}$	0.02593855
Volumen 2	$u_R = \sqrt{u_T^2 + u_{Rep}^2 + \left(\frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}} \right)^2}$	0.02593855

Tabla N° 8: α factor de expansión cubica del solvente $2.07 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$



Calculo de la incertidumbre combinada tomando como factor de cobertura de $K=2$ para un 95.45% de intervalos de confianza

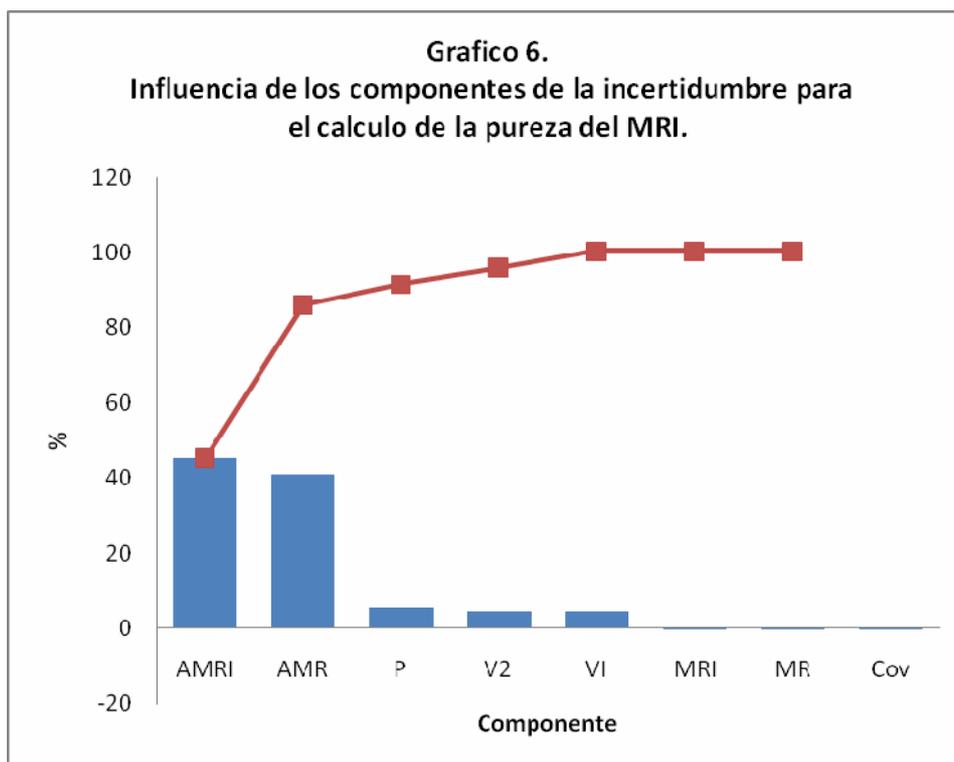
VARIABLES	valor XI	ui	Ci	Ciui	(Ciui) ²
AMRC	94.44	0.14848952	-1.061452148	-0.15761452	0.02484234
AMRI	94.67	0.15639773	1.058873359	0.165605387	0.02742514
MRC	25	0.00012111	4.009741635	0.000485604	2.3581E-07
MRI	25	0.00012111	-4.009741635	-0.0004856	2.3581E-07
V2	50	0.02593855	2.004870817	0.052003444	0.00270436
VI	50	0.02593855	-2.004870817	-0.05200344	0.00270436
P	1	0.00057735	100.2435409	0.057875635	0.00334959
Cov					-0.00029972
				SUMA	0.06072654
				U _c	0.24642756
				U _{Ex}	0.49285511

Tabla N° 9

Discusión:

En las tablas número 7, 8 y 9 se muestran los resultados para los cálculos de las incertidumbres de los 8 componentes que influyen en la determinación de la Pureza del Estándar Interno de Amoxicilina. Al sustituir los valores dados en la columna 2 de la tabla N° 9 en la ecuación 3 podemos determinar la pureza del estándar interno de Amoxicilina siendo este de 100.24% y su incertidumbre expandida de 0.50%.

La tabla N° 9 también nos permite ver el cálculo de la incertidumbre expandida U_{Ex} , la cual se determino sacado la raíz cuadrada de la sumando del producto de los coeficientes de sensibilidad por sus incertidumbre al cuadrado, el factor de cobertura usado para calcular dicha incertidumbre fue de 2 para un intervalo de confianza del 95.45%.



Discusión:

El gráfico N° 6 nos muestra el porcentaje de contribucion de los componetes individuales a la incertidumbre combinada, el que mas contribuye a la incertidumbre es el área de los picos del material de referencia interno y el que menos contribuye es la covarianza.



CONCLUSION

Se demostró, a través del estudio de estabilidad, que la solución del estándar interno de amoxicilina es estable durante las primeras 6 horas de su preparación. Presentando homogeneidad, debido a que obtuvo el mismo valor de las propiedades medidas dentro de las mismas unidades y entre todas las unidades de estudio. La pureza e incertidumbre del estándar interno de amoxicilina se estableció tomando en cuenta todos los componentes que influyen en su determinación siendo esta de (100.24 ± 0.50) %, con un factor de cobertura de 2 para un intervalo de confianza del 95.45%.



RECOMENDACIONES

1. Los Laboratorios de Control de Calidad de Medicamentos deben implementar el uso de materiales de referencia certificados para garantizar la exactitud y trazabilidad de sus resultados y que cumplan con los requisitos establecidos por la Norma ISO/IEC 17025.
2. Los Laboratorios de Control de Calidad de Medicamentos deben participar en ensayos de aptitud para asignar valores a los estándares de referencia internos usados para el control de la calidad de sus mediciones.
3. Los Laboratorios de Control de Calidad de Medicamentos deben adquirir estándares certificados USP, ya que este organismo recientemente alcanzo la acreditación ISO como Fabricante de material de referencia certificado y a partir de estos elaborar sus propios MRI.
4. Que en estudios posteriores se determine la potencia de Materiales de Referencia Internos a través del ensayo Microbiológico, ya que este trabajo se baso estrictamente en el ensayo Fisico-quimico.



BIBLIOGRAFIA

1. DÍAZ JIMÉNEZ J. C., (2007) “Caracterización de líquidos para ser usados como materiales de referencia certificados” CENAM, Aguascalientes, 109, p 14-23.
2. Comité Conjunto para las guías en Metrología (JCGM) (ES), (Marzo 2009), “Vocabulario Internacional de Términos Fundamentales y Generales de Metrología”, *Norma Internacional*, México, Tercera Edición.
3. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL PARA LA NORMALIZACIÓN, ISO/IEC 17025(ES), (2005), “Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración”, *Norma Internacional*, Ginebra, Segunda Edición
4. Guía ISO 30: 1992, Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia.
5. Ian M, Peter J, Barry N, Edwin R. 2005. “Redefinition of the kilogram, ampere, Kelvin and mole: a proposed approach to implementing CIMP recommendation 1”. Institute of Physics Publishing.
6. Guía ISO 33 Uso de los materiales de referencia certificados.
7. Guía ISO 34 Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia
8. Categorization of reference materials — Guidance on, and keywords used for RM categorization
9. THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN Department of Pharmaceutical Sciences “Clarke’s Isolation and Identification of Drugs”, (1986) Second Edition, London, 1223 p. 348-349.
10. JCGM 100:2008 Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. (2008) First Edition.
11. USP 29/NF 24, edición en Español., Farmacopea de los Estados Unidos de América p. 182.

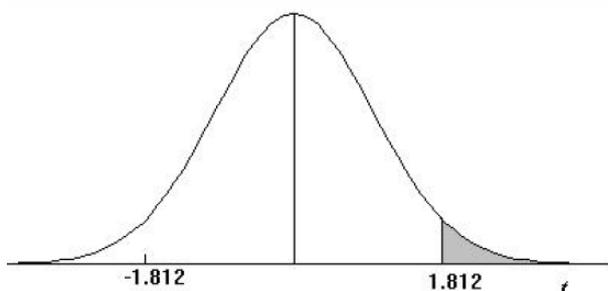
AMENOS



ANEXO 1

TABLA 2: DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT

Puntos de porcentaje de la distribución t



Ejemplo

Para $\phi = 10$ grados de libertad:

$$P[t > 1.812] = 0.05$$

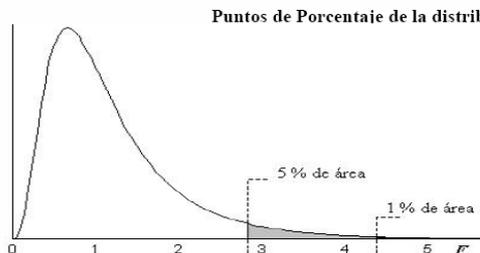
$$P[t < -1.812] = 0.05$$

α r	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	0,679	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,290



ANEXO 2

TABLA 4: DISTRIBUCIÓN F DE FISHER



Ejemplo:

Para $n_1 = 9, n_2 = 12$ grados de libertad:

$P[F > 2.80] = 0.05$

$P[F > 4.39] = 0.01$

		5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F																										
		n1 grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																										
n_2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	n_2		
1	161	199	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	246	248	249	250	251	252	253	253	254	254	254	254	1		
2	4052	4999	5404	5624	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6083	6107	6143	6170	6209	6234	6260	6286	6302	6324	6334	6350	6360	6366	6366	2		
3	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.49	19.50	3		
4	98.50	99.00	99.16	99.25	99.30	99.33	99.36	99.38	99.39	99.40	99.41	99.42	99.43	99.44	99.45	99.46	99.47	99.48	99.48	99.48	99.49	99.49	99.50	99.50	99.50	4		
5	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.71	8.69	8.66	8.64	8.62	8.59	8.58	8.56	8.55	8.54	8.53	8.53	8.53	5		
6	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.34	27.23	27.13	27.05	26.92	26.83	26.69	26.60	26.50	26.41	26.35	26.28	26.24	26.18	26.15	26.13	26.13	6		
7	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.87	5.84	5.80	5.77	5.75	5.72	5.70	5.68	5.66	5.65	5.64	5.63	5.63	7		
8	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.45	14.37	14.25	14.15	14.02	13.93	13.84	13.75	13.69	13.61	13.58	13.52	13.49	13.46	13.46	8		
9	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.64	4.60	4.56	4.53	4.50	4.46	4.44	4.42	4.41	4.39	4.37	4.37	4.37	9		
10	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.96	9.89	9.77	9.68	9.55	9.47	9.38	9.29	9.24	9.17	9.13	9.08	9.04	9.02	9.02	10		
11	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.96	3.92	3.87	3.84	3.81	3.77	3.75	3.73	3.71	3.69	3.68	3.67	3.67	11		
12	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.60	7.52	7.40	7.31	7.23	7.14	7.09	7.02	6.99	6.93	6.90	6.88	6.88	12		
13	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.53	3.49	3.44	3.41	3.38	3.34	3.32	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23	3.23	13		
14	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.36	6.28	6.16	6.07	5.99	5.91	5.86	5.79	5.75	5.70	5.67	5.65	5.65	14		
15	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.24	3.20	3.15	3.12	3.08	3.04	3.02	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93	2.93	15		
16	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.56	5.48	5.36	5.28	5.20	5.12	5.07	5.00	4.96	4.91	4.88	4.86	4.86	16		
17	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.03	2.99	2.94	2.90	2.86	2.83	2.80	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71	2.71	17		
18	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.01	4.92	4.81	4.73	4.65	4.57	4.52	4.45	4.41	4.36	4.33	4.31	4.31	18		
19	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.86	2.83	2.77	2.74	2.70	2.66	2.64	2.60	2.59	2.56	2.55	2.54	2.54	19		
20	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.60	4.52	4.41	4.33	4.25	4.17	4.12	4.05	4.01	3.96	3.93	3.91	3.91	20		

ANEXO 3

Test de Hartley. Comparación de Varianzas

Tabla de valores de r al 95 % de nivel de confianza. k es el número de varianzas y ν son los grados de libertad para cualquier serie.

$\nu \backslash k$	2	3	4	5	6
2	39.0	87.5	142	202	266
3	15.4	27.8	39.2	50.7	62.0
4	9.6	15.5	20.6	25.2	29.5
5	7.15	10.8	13.7	16.3	18.7
6	5.82	8.34	10.4	12.1	13.7
7	4.99	6.94	8.44	9.7	10.8
8	4.43	6.00	7.18	8.12	9.03
9	4.03	5.34	6.31	7.11	7.80
10	3.72	4.85	5.67	6.34	6.92



ANEXO 4

Factores utilizados en la elaboración de los gráficos de control.

n	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cn	0.7979	0.8862	0.9213	0.9400	0.9515	0.9594	0.9650	0.9693	0.9727

ANEXO 5

Mediciones de las 4 soluciones del MRI

No	Áreas			
	solución 1	solución 2	solución 3	solución 4
1	92.9	92.7	92.8	92.6
2	92.7	92.9	92.6	93
3	92.7	92.7	92.6	93
4	93.1	92.7	92.7	92.2
5	92.9	92.7	92.9	92.9



ANEXO 6

Datos para el estudio de la estabilidad en las lecturas analíticas

No	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
1	95.6	96	95.8	94.8	94.8
2	95.6	95.8	96.1	94.9	94.7
3	95.8	95.9	96.1	95.1	94.8
4	95.8	95.7	96.1	95	94.6
5	95.6	95.6	95.9	94.9	94.6
6	95.5	95.8	96	95.1	94.6
7	95.5	95.7	96	95.3	94.7
8	95.5	95.7	96.1	95.5	94.7
9	95.4	95.7	96.2	95.4	94.8
10	95.6	95.3	95.7	94.6	94.4
Promedio	95.59	95.72	96	95.06	94.67
S	0.12866839	0.18737959	0.15634719	0.27968236	0.12516656
varianza	0.01655556	0.03511111	0.02444444	0.07822222	0.01566667



ANEXO 7

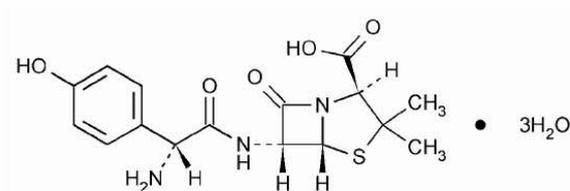


U.S. Pharmacopeia
The Standard of QualitySM

USP Certificate

Amoxicillin

LOT J0C043



Molecular Formula

$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$

Molecular Weight

419.45

CAS Number

61336-70-7

LABEL TEXT

Amoxicillin

200 mg

CAUTION! May Cause Allergy

Do not dry before using. This is the trihydrate form of amoxicillin.

For quantitative applications, use a value of 862 μ g of amoxicillin per mg on the as-is basis.

Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a freezer.

FOR USE WITH SPECIFIED USP-NF TESTS • NOT FOR USE AS A DRUG • READ MSDS BEFORE USING

CAT. NO. 1031503

USP Rockville, MD

LOT J0C043

USP certifies that the USP Reference Standards Committee, in accordance with their rules and procedures, determined that this USP Reference Standard lot is suitable to assess compliance with the monograph standards for which it is specified. The critical characteristics of this lot are usually determined independently in three or more laboratories, including USP, FDA, and academic or industrial collaborators.

QA Director



Calculation Value

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in USP or NF compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the Official USP Reference Standards catalog. In some cases, the previous lot may still be considered official. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date." Ordinarily, the previous lot is carried in official status for about one year after the current lot enters distribution.

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current when used. To ensure up-to-date information, USP publishes the Official USP Reference Standards Catalog, which contains official lot designations. This information is also available on the USP web site, at www.usp.org, as well as in the bimonthly subscription publication, *Pharmacopeial Forum*.

Instructions for Use

Follow the instructions in the appropriate USP or NF Monographs and General Requirements for Tests and Assays of the current *USP-NF*. In the event that instructions on the label of this lot differ from those found in the current *USP-NF*, those on the label supersede any instructions listed in Chapter <11>.

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP MAKES NO REPRESENTATION OR WARRANTY WITH RESPECT TO THE ACCURACY, COMPLETENESS, OR CURRENTNESS OF THIS CERTIFICATE; AND USP SPECIFICALLY DISCLAIMS ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS, IMPLIED, OR STATUTORY, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. USP DOES NOT WARRANT THAT THE INFORMATION CONTAINED HEREIN MEETS THE CUSTOMER'S REQUIREMENTS. USP SHALL NOT BE LIABLE ON ACCOUNT OF ANY SUCH ERRORS OR OMISSIONS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.
This document is not a Material Safety Data Sheet.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2004 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. All rights reserved.



ANEXO 8

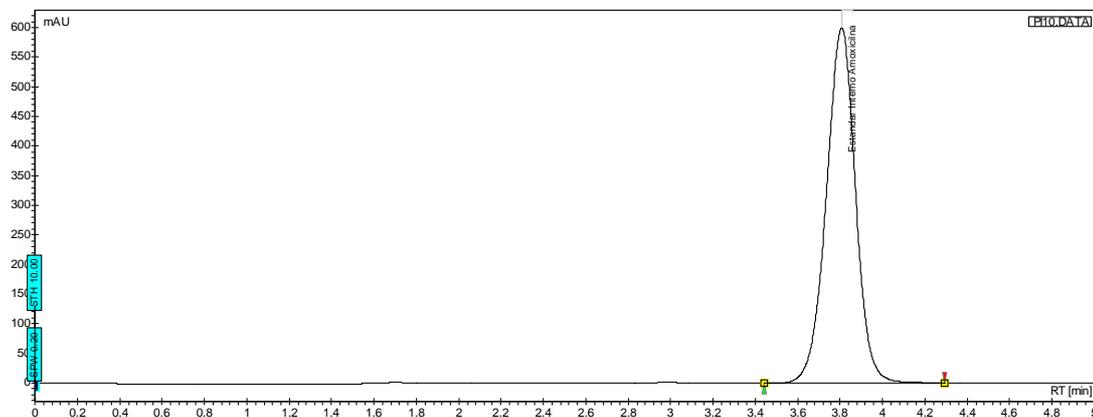


Figura 1. Cromatograma del material de referencia interno de Amoxicilina

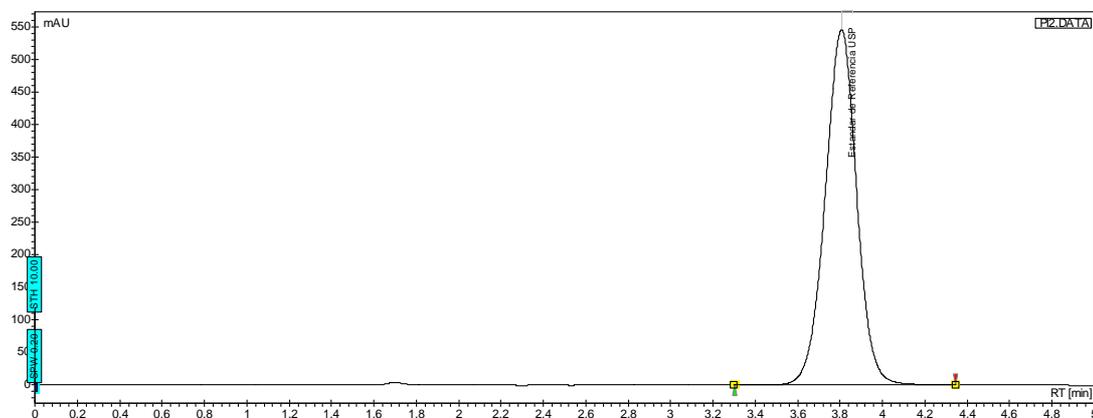


Figura 2. Cromatograma del material de referencia USP.

LCCMLaboratorio de
Control de Calidad
de Medicamentos

CERTIFICADO DE ANALISIS

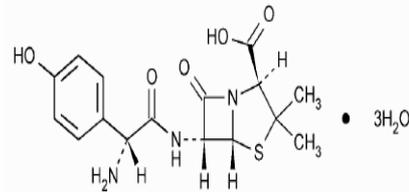
Certificado Interno de Material de Referencia



AMOXICILINA

Certificado de Material de Referencia Interno

Lote: 27078/MP



Molecular Formula

C₁₆H₁₉N₃O₅S·3H₂O

Molecular Weight

419.45

Valor Certificado de sus propiedades: 100.24% ± 0.50.

Producido y Certificado por: Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos LCMM

Tamaño: 20 g.

Apariencia: Polvo blanco.

Riesgos: Precaución, Puede causar alergia.

Almacenamiento: Manténgase bien cerrado. Protéjase de la luz. Guárdese en Refrigeración.

Instrucciones de Uso: No se seque antes de usar. Para aplicaciones cuantitativas use 862 mg de amoxicilina por mg de base.

Valores de Incertidumbre: La incertidumbre en el valor certificado de sus propiedades esta expresada como una incertidumbre expandida, U, al 95.45 % intervalo de confianza y está calculado de acuerdo al método descrito en la Guía GUM-1995. La incertidumbre expandida está calculada como $U=K\mu_c$, donde el factor de cobertura $K=2$, y μ_c incertidumbre combinada.

LCCM

Laboratorio de
Control de Calidad
de Medicamentos

CERTIFICADO DE ANALISIS

Certificado Interno de Material de Referencia



Periodo de Validez: La Certificación del material de Referencia Interno de Amoxicilina del lote es válida hasta el 20 de junio del 2010.

Fecha de emisión del Certificado: 19 de Junio de 2009.

Director, QA
