



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas



Escuela de Farmacia

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos

Validación De La Metodología Analítica En La Cuantificación De ACETAMINOFÉN En Solución Oral Por Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución (HPLC).

Monografía Para Optar al Título de Licenciado Químico-Farmacéutico

Elaborado por:

- ☆ Eleazar Antonio Parajón García
- ☆ Crithiam Ernesto Parajón Silva
- ☆ Jaime Antonio Peralta Vanegas

Tutor:

- * Msc. Fernando Baca.

Asesor de tesis:

- * Lic. Yader Salgado.

¡A la libertad por la universidad



ÍNDICE

	Pag.
Introducción	1
Objetivos	2
CAPITULO I	3
1. Generalidades de Validación	3
1.1- Definición, importancia y necesidad de validación	3
1.2- Otros términos relacionados con la validación	4
1.3- Necesidad de una validación	5
1.4- Razones que justifican la validación	5
1.5- Cuándo realizar una validación	5
1.6- Para iniciar la validación es necesario previamente	6
1.7- Métodos susceptibles de ser validados	6
1.8- Clasificación de métodos analíticos	7
1.9- Selección y validación de métodos. ISO/IEC 17025	9
1.10- Pasos para la validación	9
1.11- Validación frente a los Métodos oficiales	10
1.12- Puesta a punto. Características de idoneidad	11
1.13- Características de fiabilidad	11
1.14- Análisis cuantitativo	12
1.15- Muestreo	12
1.16- Detección	12
1.17- Integración de señales	12
1.18- Calculo de la composición	12
1.19- Interpretación estadística	13
1.20- Métodos de Farmacopea	13
CAPITULO II	
2. Técnicas de separación analítica	14
CAPITULO III	
3. Cromatografía Fundamento Teórico	16
3.1- Definición	16
3.2- Objetivos de la cromatografía	16
3.3- Apuntes históricos	16



3.4- Importancia	16
3.5- Fase móvil	17
3.6- Fase estacionaria	17
3.7- Columna cromatográfica	17
3.8- El cromatograma	18
3.9- Aumento del rendimiento de una columna cromatográfica	19
3.10- Fenómenos de separación	19
3.11- Clasificación de las técnicas cromatográficas	19
3.12- Parámetros cromatográficos en columna	21

CAPITULO IV

4. Fundamentos de HPLC	24
4.1- Campo de aplicación del HPLC	25
4.2- Razones para el empleo del HPLC	25
4.3- Ventajas del HPLC	26
4.4- Limitaciones del HPLC	26
4.5- Clasificación de las técnicas de HPLC	26
4.6- La cromatografía de reparto	26
4.7- Instrumentación	30

CAPITULO V

5. Parámetros de Validación	37
5.1- Linealidad, rango y sensibilidad	37
5.2- Precisión	40
5.3- Exactitud	43
5.4- Selectividad	47
5.5- Robustez	52
5.6- Límites de detección y cuantificación	56



5.7- Idoneidad del sistema	60
5.8- Incertidumbre	63
5.9- Trazabilidad	67
5.10- Proceso de estimación de la incertidumbre	68
CAPITULO VI	
6. Monografía del Acetaminofén	71
6.1- Analítica	71
6.2- Terapéutica	73
CAPITULO VII	
7. Material y método	77
7.1- Materiales	77
7.2- Reactivos y patrones	78
7.3- Metodología analítica	78
CAPITULO VIII	
8. Diseño de validación	80
8.1- Linealidad	80
8.2- Exactitud	81
8.3- Precisión	82
8.4- Selectividad	84
8.5- Robustez	85
8.6- Limite de detección	86
8.7- Limite de cuantificación	86
8.8- Idoneidad del sistema	87
CAPITULO IX	
9. Referencias bibliográficas	89



INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de ensayos hoy en día, deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad o propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman, están basadas en la información que estos resultados proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permiten demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados precisos, exactos y con un nivel de confianza.

Validar un método analítico consiste en desarrollar, verificar y documentar su validez, en su adecuación a determinados requisitos previamente establecidos por el laboratorio, acorde a sus condiciones interna de trabajo, y de esta manera poder dar respuesta a un problema analítico en particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad, que debe de poseer el método a utilizar para resolver el problema analítico.

Los métodos de análisis por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), han cobrado gran interés debido a la precisión con que cuentan. Además de su precisión, linealidad del método, linealidad del sistema, exactitud, especificidad y proporción, es importante conocer otros factores que influyen en sus resultados, ya que pueden ser variados o modificados, tomándolos en cuenta a la hora de hacer la validación para obtener parámetros y así en un futuro la industria farmacéutica haga comparaciones con el objeto de garantizar una medida del comportamiento del método.

Los analgésicos con propiedades antipiréticas (AAP), propiedades analgésicas de carácter no esteroideo (AINE) constituyen un formidable grupo de fármacos que, por sus cualidades, cubren un número importante de indicaciones terapéuticas, convirtiéndose en compañeros eficaces y cómodos que ayudan a prevenir y aliviar las frecuentes molestias que agobian a nuestra sociedad. En este caso por ser el Acetaminofén un medicamento de gran importancia farmacéutica, la validación de este analito por la técnica HPLC, aplica para su cuantificación, ya que la mayoría de las referencias bibliográficas farmacopéicas refieren este ensayo por la técnica antes mencionada.

Conviene destacar que los resultados obtenidos a través de la validación, permitirán demostrar, sí la capacidad de desempeño de este método de análisis cuantitativo por HPLC, satisface los requisitos establecidos por la Bibliografías implementada en el L.C.C.M. de la UNAN-León. A su vez la información que suministra será un elemento fundamental que sirva como referencia para otras aplicaciones analíticas.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cómo realizar la Validación de la metodología analítica en la cuantificación de un paraaminofenol (ACETAMINOFÉN); en solución oral por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (HPLC o CLAR)?



OBJETIVOS

- **Objetivo General.**

Desarrollo e implementación de la metodología analítica cuantitativa en la validación de Acetaminofén en solución oral, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC o CLAR), que cumpla con las características necesarias para ser utilizado como un método analítico de rutina.

- **Objetivos Específicos.**

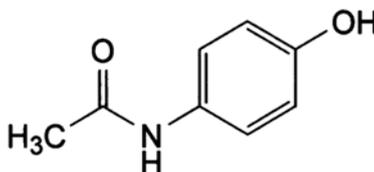
1. Demostrar que la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de Acetaminofén en Solución Oral, cumple con las especificaciones establecidas por la Farmacopea de los Estados Unidos (**USP32/NF28**).
2. Desarrollar los lineamientos a seguir en la validación de la metodología analítica cuantitativa en la determinación de Acetaminofén en solución oral por HPLC.
3. Demostrar mediante los criterios de validación que la técnica por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Acetaminofén en solución oral es exacto, preciso, selecto, lineal y robusto siempre que se trabaje bajo las mismas condiciones propuestas en este trabajo monográfico.



4. Estimar la incertidumbre del mensurando, asociada a los resultados obtenidos de las mediciones del método.

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICA DEL ACETAMINOFÉN.

- **Fórmula estructural y empírica del Acetaminofén:**



- $C_8H_9NO_2$ PM= 151.16 g/mol.
- **Familia química:**
Amidas aromáticas y fenoles sustituidos.
- **Sinónimos:**
N-(4-Hidroxifenil) Acetamida, p-Acetamidofenol, p-Acetaminofenol, Paracetamol, A.P.A.P, tynelol.
- **Nombre químico del Acetaminofén (paracetamol):**
Acetamide, N-(4-hidroxifenil)-4-Hidroxiacetanelide.
- **Contenido:**
Acetaminofén contiene no menos de 98 por ciento y no más de 101% de acetaminofén (paracetamol $C_8H_9NO_2$), calculado sobre la sustancia anhidra.
- **Estado físico, color y olor:**



Polvo cristalino de color blanco, no higroscópico e inodoro.

- **Solubilidad:**

Ligeramente soluble en agua, fácilmente soluble en metanol, etanol y dimetilformamida; muy poco soluble en cloruro de metileno.

- **Punto de fusión:**

De 168 a 172 °C.

- **Constante de disociación o ionización:**

pKa=9.5 a 25 °C. $K_a=3.16 \cdot 10^{-10}$

- **Pruebas de identificación:**

1. Disuélvanse 100 mg de la sustancia problema en 10 ml de agua y agréguese una gota de cloruro férrico al 2.5 %, aparece un intenso color azul violeta.
2. Agréguese 1 ml de Ácido clorhídrico al 7% a 100 mg de la sustancia problema, y llévase a ebullición durante un minuto. Agréguese 10 ml de agua, y enfríese, no se forma precipitado alguno. Agréguese una gota de dicromato de potasio al 10% y agítese, aparece lentamente un color violeta que no vira a rojo.

- **Métodos de análisis:**

- ❖ **Especialidad Farmacéutica:**

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de Acetaminofén según su forma farmacéutica y farmacopeas oficiales.

Bibliografía	Forma Farmacéutica	Método de Análisis
	Cápsulas	HPLC (Fase inversa)



Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXII)	Solución oral	HPLC (Fase inversa)
	Solución efervescente	HPLC (Fase inversa)
	Supositorios	HPLC (Fase inversa)
	Suspensión oral	HPLC (Fase inversa)
	Tabletas	HPLC (Fase inversa)
	Tabletas de liberación retardada	HPLC (Fase inversa)
Farmacopea Británica (BP 2009)	Cápsulas	HPLC (Fase inversa)
	Supositorios	Volumétrico REDOX
	Tabletas	Espectrofotométrico
	Suspensión oral	HPLC (Fase inversa)

❖ **Materia prima:**

En la siguiente tabla se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de Acetaminofén (materia prima) según bibliografías oficiales de análisis.^{1,2,3}

Referencia	Método de Análisis
Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXII)	Espectrofotométrico
Farmacopea Británica (BP 2009)	Volumétrico REDOX CERIMETRÍA
Clarkes	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía de gases CG. • Espectrofotometría.

PROPIEDADES FÁRMACO-TERAPÉUTICAS DEL ACETAMINOFÉN

➤ **Los Paraaminofenoles.**



Los analgésicos con propiedades analgésicas y antipiréticas constituyen un formidable grupo de fármacos que, por sus cualidades, cubren un número importante de indicaciones terapéuticas, convirtiéndose en compañeros eficaces y cómodos que ayudan a sobrellevar las no infrecuentes molestias que acaecen en nuestra vida cotidiana.

➤ **Mecanismo de Acción del Acetaminofén.**

El paracetamol en sentido estricto no es un AINE, ya que carece, al menos desde un punto de vista clínico, de actividad antiinflamatoria. Sin embargo, posee eficacia antitérmica y analgésica comparable a la del AAS (Ácido acetilsalicílico) aunque, obviamente, es menos eficaz que éste en dolores de origen inflamatorio.

Su mecanismo de acción aún es objeto de debate. Recientemente se ha sugerido la existencia de una variante de la COX-2, inducida por altas concentraciones de AINE, que es especialmente sensible a la inhibición del paracetamol (¿tal vez una COX-3?). Las ciclooxigenasas de diversas localizaciones al parecer son diferentemente sensibles a la acción del paracetamol. Así, a diferencia de los AINE, puede estimular la síntesis de prostaglandinas (p. ej., en la mucosa gástrica), no modificarla (pulmón y plaquetas) o inhibirla moderadamente (SNC).

Quizás esto explique su casi nula actividad antiinflamatoria, su acción antitérmica y analgésica, su incapacidad para alterar la agregación plaquetaria y su inocuidad para la mucosa gástrica. Además de inhibir la síntesis de prostaglandinas en el SNC, y en conexión con dicha acción o no, el paracetamol produce analgesia por otros mecanismos centrales, como: inhibición de la hiperalgesia espinal provocada por la activación de los receptores NMDA, interacción con sistemas neuronales que liberan óxido nítrico o facilitan la transmisión inhibitoria serotoninérgica bulbospinal que actuaría sobre receptores 5-HT₃.

➤ **Acciones farmacológicas con interés terapéutico del acetaminofén**

★ **Acción analgésica**

La actividad antiálgica del Acetaminofén es de intensidad moderada o media, alcanzándose un techo analgésico claramente inferior al de los analgésicos opioides, pero frente a éstos presentan la ventaja de no alterar el sensorio o la percepción, lo cual redundo, en conjunto, en una utilización clínica menos comprometida. Es útil en cefaleas de diversa etiología, incluidas las formas moderadas de migraña.



★ **Acción antitérmica**

El efecto antitérmico del paracetamol parece depender de la inhibición preferente de la COX-2 central o de la variante COX-3, en función de su buena penetración al SNC y su dependencia de un entorno, como el neuronal, bajo en peróxidos.

➤ **Relación estructura actividad:**

La actividad antipirética del acetaminofén reside en la estructura del aminobenceno (ver estructura química del acetaminofén). La introducción de otros radicales en el grupo hidroxilo del acetaminofén y en el grupo amino libre de la anilina reduce su toxicidad sin pérdida de la actividad antipirética. Los mejores resultados se obtienen con los éteres alquilfenólicos (etilo en la fenacetina), y con las amidas (acetilo en la fenacetina y el acetaminofén).

➤ **Reacciones adversas:**

Dificultad o dolor al orinar, disminución del volumen urinario, erupción cutánea, neutropenia, pancitopenia o leucopenia, cansancio exagerado, ictericia (hepatitis).

Las reacciones adversas más graves se deben a sobredosis aguda y consiste en necrosis en el hígado, necrosis tubulorrenal y coma hipoglucémico. Los síntomas iniciales de hepatotoxicidad son náuseas, vómitos y dolor abdominal.

Ante la ingestión de dosis altas debe de procederse a la inducción del vomito o el lavado gástrico, seguido de la administración oral de carbón activado, dentro de las primeras cuatro horas de la ingestión. La administración oral del antídoto acetilcisteína ofrece ventajas si se administra antes de que transcurran las primeras diez horas de ingestión del fármaco.

En caso de haber administrado carbón activado, es necesario que se elimine cuando se va a administrar acetilcisteína, ya que interfiere con la adsorción de este antídoto.

➤ **Características farmacocinéticas:**

Absorción:

Se absorbe de forma rápida y casi completa en el intestino delgado con una biodisponibilidad dosis-dependiente entre el 75 y el 90 %. La velocidad de absorción depende fundamentalmente de la velocidad de vaciamiento gástrico: se retrasa con los alimentos (especialmente aquellos ricos en carbohidratos) y fármacos que demoren el vaciamiento (opioides y anticolinérgicos), y se facilita con aquellos que lo aceleren (metoclopramida). La $C_{máx}$ se alcanza en 30-90 min. Se absorbe bien por vía rectal, aunque más lentamente que en el tubo digestivo alto.



Distribución:

Se distribuye de forma casi uniforme por los tejidos y líquidos orgánicos, con un volumen de distribución de 0,9 kg/L. En la leche puede alcanzar concentraciones de 10-15 µg/ml, 2 horas después de la ingestión materna de una simple dosis de 650 mg. A concentraciones terapéuticas (5-20 µg/ml) no se fija a proteínas plasmáticas, aunque a concentraciones tóxicas (p. ej., 300 µg/ml), la fijación varía entre el 20 y el 50 %.

Metabolización:

Es metabolizado hasta el 95 % en el hígado. Los principales metabolitos son conjugados con ácido glucurónico (60 %) o sulfato (35 %). Una pequeña fracción (4-5 %) se convierte en la fracción microsómica, utilizando el sistema de oxidasas mixtas y citocromo P-450, en un metabolito extremadamente reactivo, la N acetilbenzoquinoneimida, que en condiciones normales es inactivado por reacción con los grupos sulfhidrilo del glutatión hepático reducido y, posteriormente, eliminado por la orina como conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico. Con dosis de paracetamol muy elevadas, las vías metabólicas primarias se saturan y la velocidad de formación de este metabolito excede a la de síntesis de glutatión hepático, reaccionando covalentemente con aminoácidos de enzimas y proteínas hepáticas a las que inactiva, y provoca una necrosis hepática aguda.

Eliminación:

Su excreción se opera por vía renal en forma de metabolitos conjugados, y en pequeñas cantidades de compuestos hidroxilados y desacetilados; también se elimina por la leche materna. Su vida media es de 1 a 4 horas.

➤ **Aplicaciones terapéuticas:**

Alivio del dolor de baja a moderada intensidad, como cefalea, dismenorrea, neuralgia y mialgia. Disminuye la fiebre de etiología diversa. El paracetamol, como analgésico y/o antipirético, es un buen sustituto del AAS, especialmente cuando éste esté contraindicado o su uso sea desaconsejable: pacientes que reciben terapéutica anticoagulante o uricosúrica, si existe úlcera péptica, gastritis, hernia de hiato, intolerancia o hipersensibilidad al AAS, y en pacientes con hemofilia u otros problemas de la coagulación. No debe usarse en lugar del AAS u otros AINE en el tratamiento de la artritis reumatoidea. Sin embargo, puede usarse para tratar el dolor en una osteoartritis moderada.

➤ **Contraindicaciones, precauciones e interacciones:**



Está contraindicado en casos de hipersensibilidad al acetaminofén, enfermedad hepática, hepatitis viral o insuficiencia renal grave. El aumento de hepatotoxicidad al acetaminofén aumenta en pacientes alcohólicos y en quienes ingieren inductores enzimáticos, como barbitúricos u otros anticonvulsivos. Hace que aumente el efecto de los anticoagulantes orales.

➤ **Advertencias para el paciente:**

Evítese la administración de acetaminofén en dosis mayores a las prescritas. Se deberá tener especial precaución cuando se administre este medicamento a los niños. Guárdese el frasco del fármaco fuera del alcance de los niños. Informe de inmediato al médico si se presenta náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, coloración amarilla de la piel, sangrado o moretones y erupción cutánea.

➤ **Vía de administración y dosis:**

Adultos: Por vía oral, la dosis habitual en adultos es de 500-650 mg/4 horas o 1 g/6-8 horas, sin exceder los 4 g/día. En supositorios, la dosis en adultos es de 650 mg/4-6 horas, sin exceder los 6 supositorios en 24 horas.

Niños: En niños, según su edad, se recomiendan las siguientes dosis 4-5 veces al día: 40 mg (0-3 meses), 80 mg (4-11 meses), 120 mg (1-2 años), 160 mg (2-3 años), 240 mg (4-5 años), 320 mg (6-8 años), 400 mg (9-10 años) y 480 mg (mayores de 10 años). También se ha recomendado para estas edades una dosis de 10 mg/kg por toma. En supositorios, 325 mg/4-6 horas (6-12 años) sin exceder los 2,6 g/24 horas; 120 mg/4-6 horas (3-6 años), sin exceder los 720 mg/24 horas; por debajo de 2-3 años, la dosis debe ser individualizada por el médico en cada caso.

➤ **Presentaciones:**

Tabletas de 325 y 500 mg. Solución oral de 100 mg/5 mL, 120 mg/1 mL, 125 mg/5 mL, 250 mg/5 mL. Supositorios de 60, 100, 125, 250 y 300 mg. En combinación con otros fármacos.^{15,16,25}

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN ANALÍTICA

Casi todas las muestras que se le presentan al analista farmacéutico son mezclas, algunas veces muy complejas. El análisis de estos mismos componentes en presencia de los restantes, puede sin embargo, ser difícil e incluso imposible, a causa de una interferencia de una sustancia en la determinación de otra. Las interferencias adoptan varias formas. La sustancia interferente puede responder cuantitativamente al método analítico para el componente deseado. Algunas veces la interferencia es una respuesta parcial, no cuantitativa, a la determinación. Otra forma comúnmente encontrada de interferencia es la



inadecuación del método analítico para el componente deseado, originando resultados no cuantitativos incluso para este componente.

Cuando no se pueda aplicar directamente un método analítico a una mezcla, debido a posibles interferencias, tal vez sea necesaria una separación de la mezcla en sus componentes.^{17,20}

- **La separación:**

La separación es un proceso físico, mecánico o químico mediante el cual se realiza la extracción de uno o más componentes de una mezcla basándose en las propiedades de estos con respecto a la mezcla.

Entre las propiedades más importantes a ser consideradas para la separación de los componentes de una mezcla se encuentran:^{17,20}

- a) Solubilidad.
- b) Densidad.
- c) Punto de fusión.
- d) Presión de vapor.
- e) Punto de ebullición.

- **Clasificación de los métodos de separación analítica**

Los métodos de separación analítica se pueden clasificar según su naturaleza en:

QUÍMICOS	MECÁNICOS	FÍSICOS
Precipitación	Filtración	Extracción liquido-liquido
Enmascaramiento	Centrifugación	GLC
Intercambio iónico	Diálisis	GSL
Electrodeposición	Cromatografía de exclusión	LLC

Métodos para eliminar interferencias en un análisis químico:

Método	Bases del método
1. Enmascaramiento	Inmovilización del interferente como un



		complejo no reactivo
2.	Separación mecánica de fase	Diferencia de solubilidad de los compuestos formados.
	i) Precipitación y filtración	Diferencia en la volatilidad de los compuestos.
	ii) Destilación	Diferencias en solubilidad de dos líquidos inmiscibles.
	iii) Extracción	Diferencia de la estabilidad de los reactivos con una resina de intercambio iónico.
	iv) Intercambio iónico	
3.	Cromatografía	Diferencia de la velocidad de un movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria.
4.	Electroforesis	Diferencia de la velocidad de migración en un gradiente de campo eléctrico.

CROMATOGRAFÍA

Fundamento teórico

- ¿Que Es La Cromatografía?

La cromatografía, proviene de la conjugación de dos vocablos griegos *kromos* (color) y *graphos* (escribir), literalmente significa escribir con colores. Es difícil definir con rigor el término “CROMATOGRAFÍA” porque el concepto se aplica a una gran variedad de sistemas y técnicas. Sin embargo, todos estos métodos tienen en común el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla se pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil.^{22,13,19}

- Objetivos De La Cromatografía



La cromatografía tiene como objetivo principal separar cada uno de los componentes de una mezcla, con lo que se logra:

- ✓ Evitar la influencia de interferentes.
- ✓ Pre-concentrar el analito de interés.
- ✓ Separar varios compuestos entre si, facilitando su identificación y determinación cuantitativa.

• **Algunos Apuntes Históricos**

El inicio de la cromatografía puede atribuirse al botánico ruso Mikhail Semyonovich Tswett en 1906, quien logro la separación de una mezcla de pigmentos de las plantas, como clorofilas y xantofilas; usando éter de petróleo y una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio. Tswett logro separar diversos compuestos coloreados en bandas o zonas bien definidas en la columna, demostrando que la clorofila es uno de los muchos pigmentos que se encuentran en las hojas de las plantas.

En la actualidad la cromatografía se emplea principalmente para separar compuestos incoloros pero el nombre permanece para describir cualquier técnica que se base en el mismo principio.

• **¿Para Qué Sirve?**

La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación cuantitativa de los compuestos químicos de muestras complejas; ningún otro método de separación es tan poderoso ni tiene tantas aplicaciones como la cromatografía.

☆ **La Fase Móvil**

La fase móvil; es el medio portador de la muestra o en el que se encuentra disuelto el analito de interés, esta pasa a través de la fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquida), un gas (cromatografía de gases) o un fluido supercritico (cromatografía de fluidos supercrítico).

☆ **La Fase Estacionaria**

La fase estacionaria; es el medio poroso en el que se realiza la separación de la muestra, este puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido como soporte. La fase móvil pasa a través de la fase estacionaria introduciendo el analito en esta.

☆ **La Columna Cromatográfica**

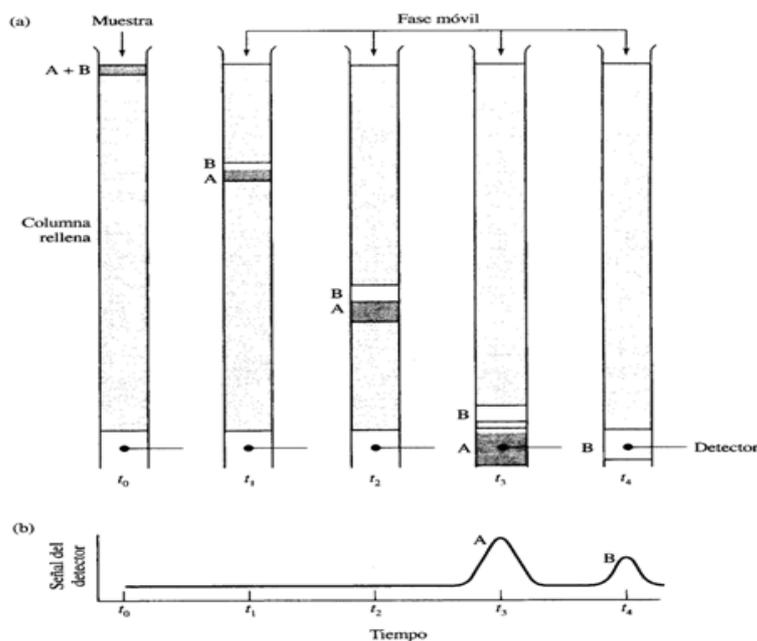


La columna cromatográfica es el lugar donde ocurre la separación. El éxito o fracaso de una separación cromatográfica dependerá del relleno y de los materiales de construcción de la misma. Las columnas se pueden elaborar de cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o teflón.

El relleno de las columnas puede ser un sólido o un líquido recubierto por un sólido. Las columnas se clasifican según el propósito del proceso cromatográfico en:

- Empacadas
- Analíticas
- Preparativas
- Capilares

La separación de los componentes de una mezcla depende de la capacidad de retención que tenga la fase estacionaria sobre estos, o de otra forma de la afinidad de los componentes de la mezcla por la fase estacionaria. Si son frecuentemente retenidos por la fase estacionaria (poseen mayor afinidad por esta), se moverán mas lentamente con el fluido de la fase móvil en la columna, lo contrario ocurre si son poco retenidos (poseen poca afinidad). Como consecuencia de las diferencias de movilidades se obtienen bandas o zonas que pueden ser detectadas y registradas en los llamados cromatogramas (*ver figura 1*).



a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de los componentes A y B por elución en una columna cromatográfica. b) señal del detector en varios momentos de la elución mostrados en a.



(Figura 1)

Son muchos los factores que pueden afectar la eficiencia de las columnas cromatográficas entre estos tenemos:

- ✓ Longitud de la columna.
- ✓ Diámetro de la columna.
- ✓ Tamaño de las partículas del relleno.
- ✓ Naturaleza de las fases.
- ✓ Cantidad de fase estacionaria.
- ✓ Temperatura de la columna.
- ✓ Velocidad de la fase móvil.
- ✓ Cantidad de muestras inyectada.

☆ **El Cromatograma**

Si durante la elución se coloca en el extremo de la columna un detector que responda a la concentración del soluto y se hace un gráfico de la señal como función del tiempo, se obtiene una serie de picos, como se muestra en la figura anterior (b). Este gráfico denominado cromatograma es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo se puede utilizar para identificar los componentes de la muestra; el área bajo los picos proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de una especie.

☆ **Aumento Del Rendimiento De Una Columna Cromatográfica**

Diversas variables químicas y físicas influyen en la velocidad de separación de las bandas y en su ensanchamiento. Como consecuencia, con frecuencia se pueden mejorar las separaciones si se controlan las variables que; aumenten la velocidad de separación de las bandas (picos cromatográficos) y disminuyan la velocidad de ensanchamiento de las bandas.

☆ **Fenómenos De Separación**



En la cromatografía pueden ocurrir dos fenómenos importantes y que prácticamente son los rectores del proceso de separación: **la adsorción** y **la absorción**.

- ✓ La **adsorción**: es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficies interfacial.
- ✓ La **absorción**: es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene esta para formar mezclas o reaccionar químicamente con esta.

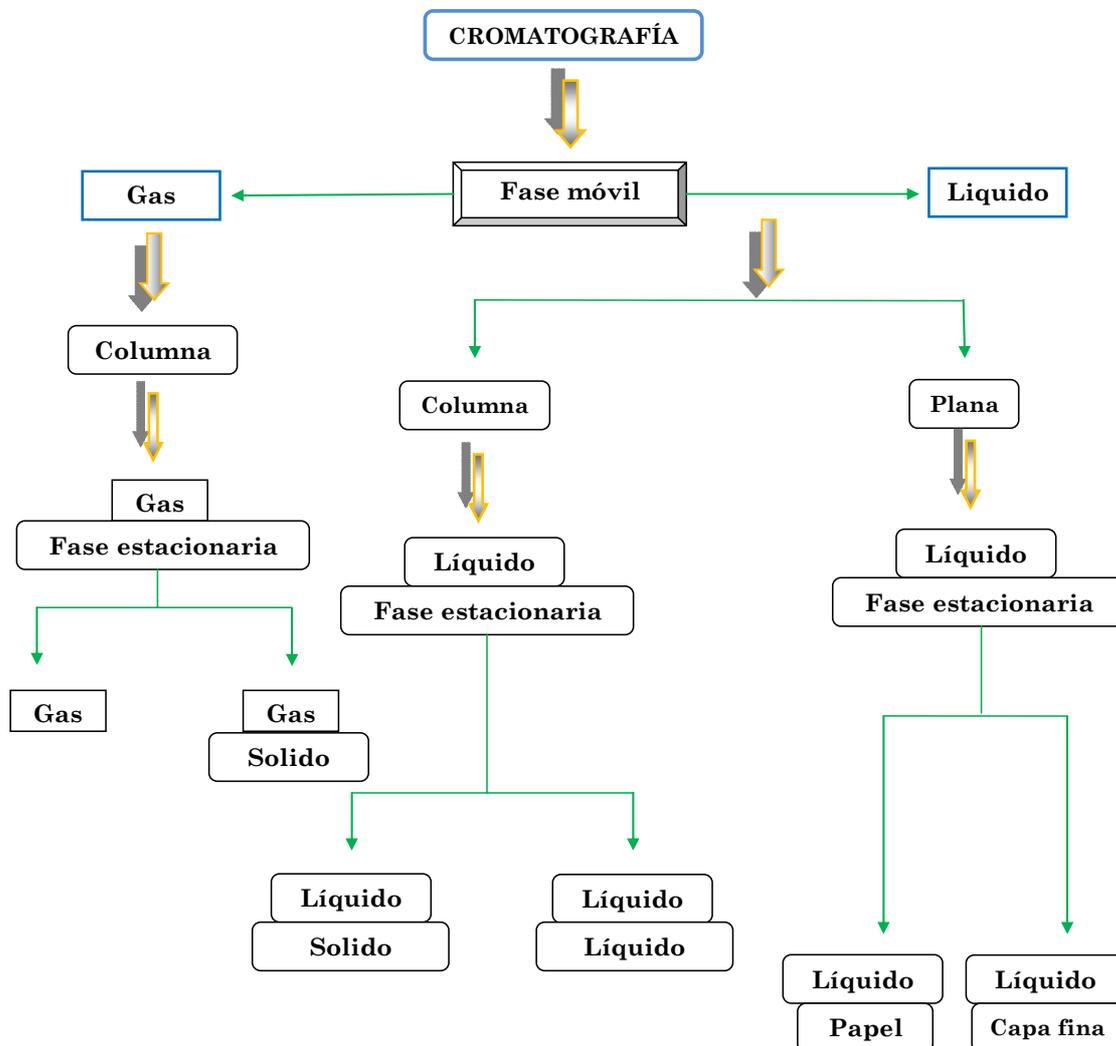
☆ **Clasificación De Las Técnicas Cromatográficas**

Los métodos cromatográficas se clasifican según:

- ❖ La naturaleza de la fase móvil y fase estacionaria.
- ❖ La forma física de la cama de la fase estacionaria.
- ❖ Por su mecanismo de separación.
- ❖ La relativa polaridad de las dos fases.
- ❖ El procedimiento del desarrollo cromatográfico.^{11,14,22}



☆ Por la naturaleza de la fase móvil y fase estacionaria:



☆ Por La Forma Física De La Cama De La Fase Estacionaria:

- ❖ **Cromatografía en columna:** la fase estacionaria está contenida en un tubo cilíndrico (la columna).
- ❖ **Cromatografía plana:** la fase estacionaria esta esparcida en un plano.



★ Por El Mecanismo De Separación:

- ❖ Cromatografía de adsorción.
- ❖ Cromatografía de reparto.
- ❖ Cromatografía de intercambio iónico.
- ❖ Cromatografía de exclusión molecular.

★ Por La Relativa Polaridad De Las Fases:

- ❖ Cromatografía en fase normal.
- ❖ Cromatografía en fase reversa.

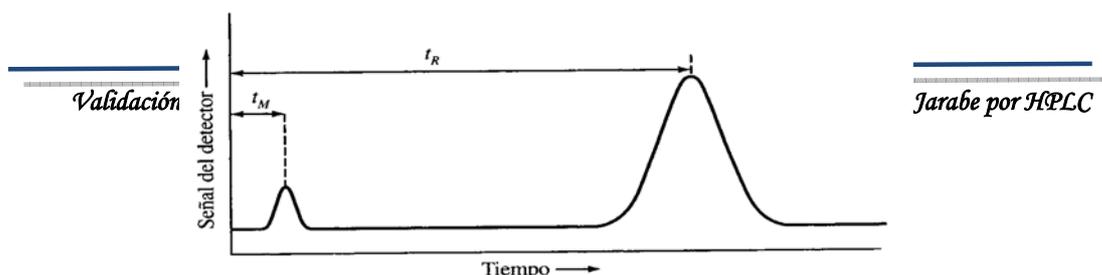
★ Por El Procedimiento Del Desarrollo Cromatográfico:

- ❖ Cromatografía frontal.
- ❖ Cromatografía de desplazamiento.
- ❖ Cromatografía de elución.

• Parámetros Cromatográficos En Columna

★ Tiempo de retención

En la figura siguiente, (*figura 3*) se muestra un cromatograma característico para una muestra que contiene un solo analito. El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector se denomina tiempo de retención. El pico pequeño de la izquierda corresponde a una especie que no es retenida por la columna. El tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector se denomina tiempo muerto.^{11,14,20}





(Figura 2)

El tiempo de retención es considerado también como una medida de la cantidad de tiempo que el soluto gasta en el interior de una columna cromatográfica; por lo cual se deduce que el tiempo de retención, es el tiempo que tarda el soluto en la fase móvil más el tiempo que tarda este en la fase estacionaria.

El tiempo de retención es un importante parámetro a ser considerado en cromatografía, ya que nos sirve para identificar (posición del pico), o confirmar la presencia de un analito específico en una mezcla de interés. Generalmente se identifica el tiempo de retención de un estándar puro y se compara este con el obtenido en una mezcla. Si el tiempo de retención es igual al del estándar se confirma o identifica la presencia del analito.

★ **Factor de retención o factor de capacidad**

Es la relación de tiempo que tarda el soluto en la fase estacionaria y móvil.

Debido a que todos los solutos tardan la misma cantidad de tiempo en la fase móvil, el factor de retención es una medida relativa y lineal de la retención de los solutos por la fase estacionaria. Como se muestra en la figura 2, el tiempo de retención y el tiempo muerto se pueden obtener fácilmente de un cromatograma. Cuando el factor de retención para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención; cuando el factor de retención es del orden de 20 a 30 o tal vez mayor, los tiempos de elución son excesivamente largos. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en la que el factor de retención de una especie química sea del orden de 2 a 10.

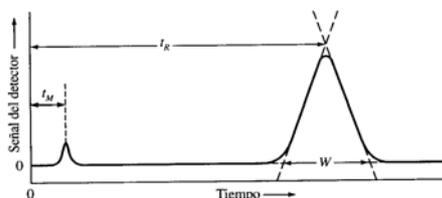
★ **Factor de selectividad**

El factor de selectividad de dos analitos en una columna cromatográfica, proporciona una medida de que también los separa la columna. De lo anterior dicho se espera un factor de selectividad mayor a la unidad.

★ **Número de platos teóricos**



Es una medida de la eficacia de una columna cromatográfica en términos cuantitativos, relacionada con el ancho de un pico y su tiempo de retención. En la figura 3 se ve como se calcula el número de platos teóricos a partir de un cromatograma.



(Figura 3)

☆ Altura De Platos Teóricos

Es una medida de la eficacia de una columna cromatográfica, relacionada con la longitud del relleno de la columna y el número de platos teóricos.

La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta a medida que es mayor el número de platos teóricos y la altura es menor.

☆ Factor De Resolución

Es una medida cuantitativa de la capacidad de una columna cromatográfica, relacionada con su habilidad de separar componentes vecinos (adyacentes) de una mezcla. Por lo general valores de resolución mayores de 1, indican buenas separaciones de picos adyacentes; mientras que valores menores de 1, expresan poca separación de picos adyacentes (*Ver figura 4*). En la figura 5 se ilustra la significación de este término; en ella se muestra los cromatogramas de las especies A y B correspondientes a tres columnas con resoluciones diferentes. La resolución de una columna se define como:

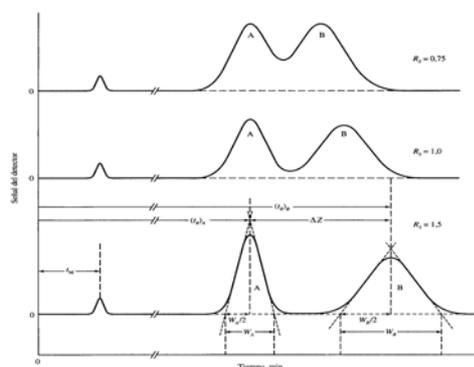
En cromatografía los analistas deben de establecer un compromiso entre la mejor separación de los componentes de una mezcla y el tiempo que tarda en resolverse la mezcla.

Un mejor tiempo de análisis no necesariamente mejora la resolución de una mezcla, por otra parte un mayor tiempo de análisis generalmente deforma los picos dificultando su integración.

Algunos de los factores a tomar en cuenta en la mejoría de la resolución de una mezcla son:



- ✓ La velocidad de flujo de la fase móvil.
- ✓ La longitud de la columna.
- ✓ La polaridad de la fase móvil.



(Figura 4)

☆ Factor De Asimetría

Es la razón de las mitades de un pico cromatográfico a un 10% de la altura total de un pico. Este indica el grado de deformación o perfección de los picos; se calcula de la siguiente manera:

☆ Volumen De Retención

Es el volumen de la fase móvil necesario para lograr el desplazamiento de un soluto desde el punto de inyección hasta el detector.

☆ Altura Del Pico

Es la distancia en unidades de medida del detector, tomada desde la base del pico en el cromatograma hasta el punto máximo de altura. El máximo de altura denota la máxima concentración de un analito en una mezcla, por lo que ésta puede variar en función de la concentración del analito y en algunos casos ser usada para la elaboración de rectas de calibrado.

☆ Área Del Pico

Es el área que ocupa el pico calculada, desde la base del pico en el cromatograma hasta el punto máximo de su altura. El área al igual que la altura aumenta en función de la concentración de un analito en una mezcla, por lo que esta puede ser usada para la elaboración de rectas de calibrado.^{11,14,23,24}



CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN

- **Fundamentos**

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o CLAR), que requiere de un instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o en sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es la técnica más versátil y utilizada de todos los tipos de cromatografía por elución. Los que trabajan en el ámbito químico la utilizan para separar y determinar las especies presentes en muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. La fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como una mezcla de solutos y la fase estacionaria es sólida; esta técnica es independiente de la volatilidad y estabilidad de los compuestos a ser separados.

Las razones de popularidad de esta técnica analítica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria farmacéutica dichas sustancias pueden ser muestras biológicas como las proteínas, oligosacáridos,

triglicéridos; así como también fármacos difíciles de analizar tanto cuantitativa como cualitativamente.

La técnica se completa con una serie de detectores cuya aplicabilidad se centra en distintas familias de compuestos (detector diferencial de índice de refracción y detector de fluorescencia), además se incorporan detectores de carácter universal, como son el UV-VIS de fila de fotodiodos y el de más reciente desarrollo detector de espectrometría de masas. El proceso de separación en esta técnica depende de las interacciones que se establecen entre el analito y la fase estacionaria y móvil respectivamente; estableciéndose diversos equilibrios químicos tales como analito-fase estacionaria, analito-fase móvil y fase móvil-fase estacionaria.

- **Campos de aplicación del HPLC**

Existen muchos campos de aplicación para esta técnica, entre los que podemos mencionar:

- ✓ Análisis de medicamentos.
- ✓ Análisis de polímeros sintéticos.



- ✓ Control de pureza y calidad de diversos productos.
- ✓ Análisis de sustancias contenidas en matrices biológicas.
- ✓ Análisis de residuos de plaguicidas y herbicidas.
- ✓ Análisis de sustancias tóxicas para el medio ambiente.
- ✓ Separación de biopolímeros.
- ✓ Aislamiento y purificación de sustancias sensibles.
- ✓ Análisis de sustancias termolábiles.

- **Razones Para El Empleo Del HPLC**

Existen muchas razones para el empleo de esta técnica entre estas podemos enumerar las siguientes:

- ✓ Presenta la posibilidad de usar una gran cantidad de fases estacionarias.
- ✓ Posee una gran versatilidad en cuanto a la posibilidad de usar distintos aparatos y sus posibles acoplaciones.
- ✓ Es posible utilizar una gran variedad de fases móviles y combinaciones de ellas.
- ✓ Posee un amplio campo de posibilidades de uso.

- **Ventajas del HPLC**

HPLC presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas entre ellas tenemos:

- ✓ Es posible usar un gran número de variables durante la manipulación de la separación de mezclas de solutos.
- ✓ Es posible analizar un gran espectro de sustancias incluyendo a las polares y no volátiles.
- ✓ Posee una mejor resolución y separación.
- ✓ Posee tiempos de análisis más cortos.
- ✓ Posee una sensibilidad del orden de los 10^{-10} g.
- ✓ Sus tiempos de retención son más reproducibles.



- **Limitaciones del HPLC**

Esta técnica posee una serie de limitaciones, entre las que podemos enumerar:

- ✓ Problemas de solubilidad de algunas sustancias.
- ✓ El gasto de solventes es muy elevado durante un análisis.
- ✓ No es posible utilizarlo cuando la cantidad de muestra es muy pequeño.
- ✓ Algunos tipos de sustancias no son detectables con detectores convencionales, por lo que hace necesario emplear otras técnicas o acoplaciones para lograr detectarlas.

- ☆ **Clasificación de las técnicas de HPLC**

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, existen varios tipos de HPLC, entre estos tenemos:

1. Cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido.
2. De adsorción o cromatografía líquido-sólido.
3. De intercambio iónico o cromatografía iónica.
4. Cromatografía en fase normal.
5. Cromatografía de exclusión molecular.
6. Cromatografía en fase reversa.
7. Cromatografía de reparto.

- ☆ **La Cromatografía De Reparto**

Debido a que en este trabajo monográfico se utiliza esta modalidad cromatográfica se hará énfasis solo en esta clasificación del HPLC.

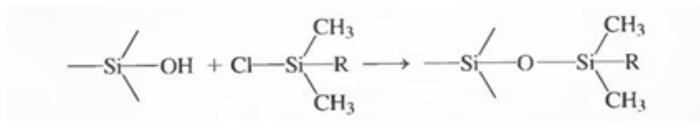
El tipo de HPLC más utilizado es la cromatografía de reparto, en la que la fase estacionaria es un segundo líquido inmisible con la fase móvil líquida. La cromatografía de reparto puede dividirse en variantes líquido-líquido y de líquido-fase enlazada. La diferencia entre estas dos modalidades radica en la forma de mantener la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del empaquetamiento. En la cromatografía líquido-líquido, el líquido se mantiene por adsorción física, mientras que en la de fase enlazada se enlaza químicamente. En sus inicios, la cromatografía de



reparto solo era del tipo liquido-liquido, pero ahora predomina la de fase enlazada dada su mayor estabilidad.

☆ Empaquetamientos De Fases Enlazadas

Muchos empaquetamientos de fase enlazada se preparan por reacción de un órgano clorosilano con los grupos –OH formados en la superficie de partículas de sílice por hidrólisis con ácido clorhídrico diluido caliente. El producto es un organosiloxano.



La reacción de uno de estos sitios SiOH en la superficie de una partícula puede representarse como sigue:

Donde R es frecuente mente un grupo octilo u octaldecilo de cadena recta. Otros grupos funcionales orgánicos que se han enlazado en superficies de sílice son las aminas alifáticas, éteres y nitrilos, así como también hidrocarburos aromáticos. Así pues están disponibles muchas polaridades distintas para la fase estacionaria enlazada.

Los empaquetamientos de fases enlazadas tienen la ventaja de una estabilidad mucho mayor que las fases estacionarias que se mantienen inmóviles físicamente. En estas últimas, se precisa del recubrimiento periódico de las superficies solidas, ya que la fase estacionaria se disuelve gradualmente en la fase móvil. Además, la elución en gradiente no resulta práctica con empaquetamientos liquido-liquido, de nuevo a causa de las partículas por solubilidad en la fase móvil. La desventaja principal de los empaquetamientos de fase enlazada es su capacidad de muestra un tanto limitada.

☆ Selección de la fase móvil y estacionaria

El éxito de la cromatografía de reparto requiere el equilibrio apropiado entre las fuerzas intermoleculares de los tres participantes en el proceso de separación (analito, fase móvil y fase estacionaria). Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en base a la polaridad relativa de cada uno de los tres componentes. En general, la polaridad de los grupos funcionales orgánicos comunes en orden creciente es:

Hidrocarburos < Olefinas < haluros < sulfuros < éteres < compuestos nitro < esteres ~ Aldehído ~ Cetonas < Alcoholes ~ Aminas < Sulfonas < sulfóxidos < Amidas < Ácidos

Como norma muchas separaciones cromatográficas se realizan haciendo coincidir la polaridad del analito con la de la fase estacionaria, para luego emplear una fase móvil de



polaridad muy distinta. En general, el procedimiento tiene más éxito que cuando se hace coincidir la polaridad del analito con la de la fase móvil y ambas son distintas de la que corresponde a la fase estacionaria. En este caso, es frecuente que la fase

estacionaria no puede competir exitosamente por los componentes de la muestra, por lo que los tiempos de retención se hacen demasiado breves para aplicaciones prácticas. En el otro extremo está la situación en que las polaridades del analito y la fase estacionaria son muy similares, en cuyo caso los tiempos de retención se hacen excesivamente prolongados.

☆ Aplicaciones De La Cromatografía De Reparto

En la siguiente tabla se muestra las aplicaciones más comunes de la cromatografía de reparto, enlazada químicamente.

Aplicaciones características de la cromatografía de reparto.

Campos	Muestras típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos.
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orinas, estrógenos.
Química forense	Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos.
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
Productos de industria química	Aromáticos condensados, tensoactivos, colorantes.
Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, fenoles.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. En estas condiciones el soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida.

☆ Clasificación:

- ❖ Cromatografía en fase normal.
- ❖ Cromatografía en fase reversa.



→ Cromatografía en fase normal

Se caracteriza por separar compuestos en base a su polaridad. Utiliza una fase estacionaria polar (grupos ciano ($--C_2H_4CN$), amino ($--C_3H_6NH_2$) y diol ($--C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$)), y una fase móvil no polar (hexano, isopropil éter, cloroformo); la fuerza de absorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y por lo tanto también aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción depende de los grupos funcionales del compuesto de interés y de factores estéricos. El uso de solventes polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención, mientras que los solventes no polares tienden a aumentarlo.

◆ Principio:

Las partículas polares se unen a la matriz sólida polar y son retenidas en esta. Las partículas de polaridad media son poco retenidas por la matriz sólida polar. Las partículas apolares son rechazadas por la matriz sólida polar y son eluidas con el flujo de fase móvil. La elución de las partículas polares y de polaridad media se consigue entre otras cosas cambiando la polaridad de la fase móvil.

→ Cromatografía en fase reversa

El 75-90% de las aplicaciones en HPLC se realizan en modalidad invertida. Consiste en una fase estacionaria no polar (octaldecilsiloxano) y una fase móvil de polaridad moderada (como agua, búferes, Alcohol metílico, Acetonitrilo y tetrahidrofurano). El tiempo de retención es mayor para moléculas no polares, mientras que las polares eluyen más rápidamente. Se ha calculado que más de tres cuartas partes de todas las separaciones con HPLC se llevan a cabo en fase reversa con empaques de siloxano de octilo. Con estos materiales los grupos hidrocarbonados de cadena larga están alineados paralelos unos a otro y perpendiculares a la superficie de la partícula, la cual le da un aspecto de cepillo a la superficie hidrocarbonada no polar. La fase móvil que más se emplea con estos empaques es una solución de distintas concentraciones de disolventes como metanol, Acetonitrilo o tetrahidrofurano. El pH no debe ser mayor que 7.5 porque esto generaría la hidrólisis del siloxano y la destrucción del relleno de la columna.

Un compuesto con cadena alquílica larga se asocia con un tiempo de retención mayor debido al aumento de la liposolubilidad de la molécula. Aun así las moléculas con estructura química grande pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria.



El pH puede cambiar la liposolubilidad del compuesto, la mayoría de los métodos utilizan una solución amortiguadora para controlar el valor del pH, neutralizar la carga del compuesto y mejorar la separación cromatográfica

◆ **Principio:**

Las partículas apolares se unen a la matriz sólida apolar y son retenidas en esta. Las partículas de polaridad media son muy poco retenidas por la matriz sólida apolar. Las partículas polares son rechazadas por la matriz sólida apolar y son eluidas con el flujo de la fase móvil. La elución de las partículas apolares y de polaridad media se consigue entre otras cosas cambiando la polaridad de la fase móvil.

● **Instrumentación para HPLC**

Con el objetivo de alcanzar un caudal de eluyente razonables con rellenos de tamaño de partícula entre 2 y 10 μm , que por otra parte son comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilogramo fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para HPLC tiende a ser más sofisticado y caro. La figura 5 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un HPLC típico.

La instrumentación general para HPLC incorpora los siguientes componentes que se muestran en la figura 5.

1. Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes.
2. Sistemas de bombeo.
3. Amortiguadores de pulso.
4. Sistemas de inyección de la muestra.
5. Columna y precolumna para cromatografía líquida.
6. Sistema de detección (detector).
7. Registrador o interfase.
8. Sistemas de procesamiento de datos.
- 9.

☆ **Recipientes para la fase móvil**



Los equipos modernos para HPLC vienen equipados con varios recipientes de vidrio o de acero inoxidable con capacidad de 500 ml o más para los disolventes. Es indispensable tomar precauciones para eliminar los gases disueltos y las partículas de polvo de los líquidos.

★ **Filtración y desgasificación del solvente o mezcla de ellos:**

Hasta los solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema de HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado del solvente en el depósito para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente del solvente, o de condensación o polimerización del solvente. Las partículas pueden originar costosos daños a la bomba de HPLC, al guardar columnas y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de instrumento tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes para HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una botella del solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el depósito del solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El oxígeno disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayores interferencias en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El nitrógeno disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en las columnas de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones en la línea de base. El dióxido de carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

★ **Métodos de filtración de solventes para HPLC**

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC (*Véase figura 5*):

- ✓ Filtro a la Entrada del Solvente.
- ✓ Filtración al Vacío.

- ✓ Filtración en Línea.

★ **Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC**



Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- ✓ Zonificación.
- ✓ Burbujear Helio.
- ✓ Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo.
- ✓ Desgasificación al Vacío en Línea.

☆ Disolventes para HPLC

Algunas propiedades de solventes usados en HPLC:

- ✓ Alta pureza (ser grado HPLC).
- ✓ Estabilidad (se debe de asegurar que el sistema Cromatográfico sea lo más estable posible para hacerlo más repetible y reproducible).
- ✓ Alta Polaridad.
- ✓ Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión.
- ✓ Disolver la muestra.
- ✓ No degradar o disolver la fase estacionaria.
- ✓ Miscibles con otros disolventes para formar mezclas útiles.
- ✓ Ser compatible con el detector utilizado. (transparencia óptica cuando se utilizan detectores espectrofotométricos).

☆ Programación de solventes en HPLC

Existen dos métodos de programación de solventes en HPLC equipados con bombas binarias o cuaternarias.

- ◆ **Isocrático:** Cuando se mantiene constante la composición de la fase móvil a lo largo del análisis.
- ◆ **Gradiente de elución:** Cuando se cambia la composición de la fase móvil a lo largo del análisis. En este caso se utiliza dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta.



☆ Sistema de bombeo en HPLC

Las bombas para cromatografía de líquidos de alta resolución deben cubrir los siguientes requisitos:

- ✓ Debe producir presiones estables de más 6000 psi (lb/pulg²).
- ✓ Mantener el flujo libre de pulsaciones.
- ✓ Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min).
- ✓ Control y reproducibilidad del flujo de solvente.
- ✓ Ser resistentes a la corrosión por diversos disolventes.

Se utilizan tres tipos de bombas:

- ◆ Bombas reciprocas.
- ◆ Bombas neumáticas.
- ◆ Bombas de desplazamiento o tipo jeringa.

Las presiones elevadas que generan las bombas para cromatografía líquida no representan ningún peligro de explosión porque los líquidos no son muy compresibles. La rotura de algún componente cuando mucho produce un escurrimiento del disolvente. Por seguridad hay que evitar estas fugas porque pueden provocar un incendio.

☆ Amortiguadores de pulsos

Muchos de los detectores utilizados para HPLC son sensibles a las variaciones de flujo, más notablemente los detectores de índice de refracción, electroquímicos y de conductividad. Aun los detectores de fluorescencia y de absorbancia en ultravioleta muestran un incremento en el ruido del detector e interferencia con la cuantificación cuando la modulación del flujo es excesiva en un sistema de HPLC.

Un método muy sencillo de amortiguación contiene un fuelle flexible o un gas compresible en la porción superior cerrada de un tubo en T para absorber parte de la

energía de pulsación. Cuando la bomba se rellena, esta energía se libera para ayudar a suavizar la pulsación de la presión. Este tipo de amortiguadores tienen grandes volúmenes de fluidos, que requieren presiones mayores a 1000 psi para una operación efectiva.

Los amortiguadores de pulso que utilizan un fluido compresible separado de la fase móvil por un diafragma flexible inerte ofrecen muchas ventajas: fácil cambio de la fase móvil, efectividad a bajas presiones del sistema, intervalo dinámico amplio y volumen muerto mínimo. Este tipo de amortiguadores de pulso, el fluido compresible se expande cuando el pistón de la bomba se retrae, manteniendo la presión del sistema y constante el flujo.



☆ Sistemas de inyección de la muestra

El lugar donde se introduce la muestra al cromatógrafo de líquidos se llama inyector y puede ser manual o automático.

La muestra debe de ser soluble en la fase móvil y se introduce en un orden de partes por millón, ya que la sensibilidad es muy alta aunque esta depende del detector.

Los volúmenes de muestra que se inyectan, deberán de ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna.

Hay varios tipos de modos de inyección:

- a. El método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión (limitado a 1500 psi) con un diafragma “septum” a la entrada de la columna.
- b. Mediante las denominadas válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

Aunque en la cromatografía de líquidos se acostumbra inyectar las muestras con jeringa en un orificio de elastómero, este método no es muy reproducible y está limitado a presiones de menos de 1500 psi. El método que da mejores resultados es el que utiliza asas de muestreo. Por lo general, estos aditamentos ya vienen con los cromatógrafos de líquidos modernos y traen varias asas intercambiables con capacidad de 5 a 500 μL . La inyección con un asa de este tipo es reproducible hasta unos cuantos décimos de porcentaje relativo.

☆ Columnas para HPLC

La columna es el espacio físico donde se produce la separación, físicamente debe reunir ciertas características básicas:

- ✓ Ser resistentes: debe de resistir altas presiones.
- ✓ Ser químicamente estable.

El material para estas columnas es generalmente de acero inoxidable, aunque también pueden emplearse tubo tygon cuando las presiones son muy bajas (< 600 psi). La longitud de las columnas varía entre 5 y 30 cm y tiene un diámetro interno de 1 a 5 mm. Los empaques tienen un tamaño de partícula de 3 a 10 μm . Estas columnas pueden tener entre 40000 a 60000 platos/m.

Actualmente, se consigue microcolumnas de alta resolución con un diámetro interno de 1 a 4.6 mm y una longitud de 3 a 7.5 cm. Estas columnas se empaquetan con partículas de 3 a 5 μm , pueden tener hasta 100000 platos/m y tiene la ventaja de que las separaciones analíticas son más rápidas y ahorran disolvente. Esto último es importante porque es



necesario utilizar disolventes muy puros, que son más costosos y además se desechan después de llevar a cabo el análisis.

Construcción de las columnas:

- Tubo de acero inoxidable (presiones hasta 10000 psi).
- Ocasionalmente, tubo de vidrio con paredes resistentes (presiones hasta 600 psi)

El diámetro interno de una columna de HPLC determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Con un diámetro interno mayor de 10 mm, se utiliza normalmente para la purificación de compuestos para su posterior utilización. Con un diámetro interno menor de 4-5 mm se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, aumentan la sensibilidad y minimizan el consumo de disolvente. Existen columnas de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masa.

☆ **Rellenos de la columna**

✓ **Relleno pelicular**

Esferas de vidrio o polímero no porosas de 30 a 40 μm de diámetro. En la superficie de las esferas se deposita una capa delgada y porosa de sílica, alúmina, polímero.

✓ **Rellenos de partículas porosas**

Micro partículas porosas con 3 a 10 μm de diámetro. Las micro partículas son de sílica o alúmina o de un polímero. Se recubren muchas veces con películas orgánicas que se unen químicamente o físicamente a la superficie.

☆ **Columnas termostatazadas**

La mayoría de las aplicaciones no requieren control de la temperatura y se trabaja a temperatura ambiente. Aunque la temperatura constante mejora el cromatograma. Los instrumentos modernos tienen control de temperaturas desde ambiente de 100-150 °C

☆ **Precolumna**

Para prolongar la vida de las columnas analíticas frecuentemente se insertan delante de ellas guarda columnas (precolumna) que actúan como filtros físicos y químicos. Las guarda columnas son relativamente cortas (usualmente de 5 cm) y contiene una fase estacionaria similar a la de la columna analítica. Protegen a la columna analítica de la contaminación por partículas que provienen de una fase móvil contaminada o de la degradación de las válvulas de inyección de muestras.



Un guarda columna prolonga la duración de la costosa columna de separación capturando los componentes de la muestra fuertemente retenidos, e impidiendo que contaminen gradualmente las capas superiores de las columnas analíticas. Por diseño los guarda columnas son desechables y periódicamente se reemplazan, sustituyen o reacondicionan.

☆ Sistema de detección en HPLC

El detector cromatográfico es el recurso mediante el cual se identifica y mide la cantidad de componentes separados de una muestra. Para HPLC no existe un sistema de detección universal con alta sensibilidad como existe para la cromatografía de gases. El detector que se va a utilizar depende de la naturaleza de la muestra.

☆ Característica para un detector ideal en HPLC

- Selectividad.
- Sensibilidad o detectabilidad.
- Respuesta.
- Ruido y límite de detección.
- Rango lineal.
- Volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de la banda.
- No destructivo de la muestra.
- Tiempo de respuesta corto que sea independiente del caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo.

El detector se coloca al final de las columnas, indicando los momentos de aparición de los componentes, y proporciona los análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos.

El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, insensible a los cambios de presión y temperatura.

En resumen los diferentes detectores utilizados en HPLC se pueden clasificar en:

☆ Detectores basados en la medida de una propiedad del efluente



- ✦ Índice de refracción

☆ **Basados en la medida de una propiedad del soluto**

- ✦ Absorbancia en el UV-VIS
- ✦ Fluorescencia
- ✦ Electroquímico
- ✦ Detector masas acoplado

☆ **Detectores espectrofotométricos:**

Los detectores que más se emplean para la cromatografía de líquidos son los que miden la absorción de la radiación ultravioleta o visible (UV-Vis). En el comercio existe fotómetros y espectrofotómetros diseñados especialmente para las columnas cromatográficas, los primeros utilizan líneas de 254 y 280 nm (detector de longitud de onda fija), de una fuente de mercurio debido a que muchos grupos funcionales adsorben en estas regiones. Para la detección simple de especies absorbentes existen instrumentos menos costosos que utilizan fuentes de filamentos de tungsteno o de un isótopo radiactivo del hidrógeno el deuterio combinados con filtros de interferencia.

Los detectores espectrofotométricos son más versátiles que los fotómetros y son los que se utilizan en los instrumentos de alta resolución; los aparatos modernos están equipados con sistemas de diodos que pueden medir un espectro completo cuando el analito sale de la columna, así mismo cada vez se utilizan más las técnicas en las que se combina la resolución por HPLC con un detector de espectrometría de masas. Estos sistemas permiten identificar los analitos que salen de las columnas de HPLC.

Los modernos equipos de HPLC traen una celda de flujo en forma de Z (Figura 5); para minimizar el ensanchamiento de banda extra-columna, el volumen de las celdas debe ser lo menor posible de 1 a 10 μL y las longitudes de las cubetas de 2 a 10 mm.

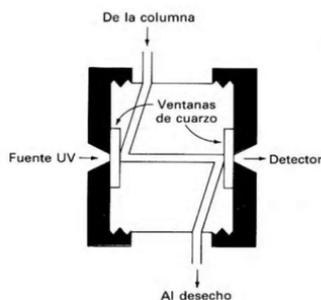


Figura 5. Celda del detector ultravioleta en HPLC

☆ Detectores de absorbancia ultravioleta con monocromadores

a. Serie de diodos:

- ✓ Permiten recoger el espectro de absorción del analito en interés.
- ✓ Obtener cromatogramas tridimensionales útiles para la determinación cualitativa.

b. Detector de absorbancia en el infrarrojo

- ✓ Con transformada de Fourier (FTIR).^{13,14,19,13,24}

VALIDACIÓN

Generalidades:

• Definición, Importancia y Necesidad De Validación

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo:

- ☆ Especificar e implementar.
- ☆ Aprobar.
- ☆ Documentar.

Existen varias formas de llevar a cabo una validación, de acuerdo a sus objetivos y alcances, los cuales dependen del analista, del laboratorio y del uso que se haga del método; además el analista debe conocer los resultados esperados y definir el nivel de confianza. El laboratorio que desarrolla o aplica el método es el responsable del proceso de validación.



Veamos cuatro de las posibles definiciones de validación:

- El establecimiento de una base de datos experimental que certifica el rendimiento de un método analítico teniendo en cuenta su objetivo de diseño.
- La confirmación por medio de una evaluación, con la cual se suministra la evidencia necesaria para ratificar que los objetivos de diseño del método bajo especificaciones particulares se cumplen en su totalidad.

- Obtención de pruebas con arreglo a las Normas de Correcta Fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto (Según las Normas de Correcta Fabricación (edición 99)).

- Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de la calidad previamente establecidos.⁴

Dos palabras claves en estas cuatro definiciones reúnen los dos objetivos primordiales de una validación:

- a. Establecer un método.
- b. Confirmar su desempeño por medio de tratamientos estadísticos y apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general.

De ahí radica la importancia de una adecuada validación, ya que establece bajo qué circunstancias debe realizarse un análisis asegurando que los datos obtenidos cumplen en la totalidad la calidad deseada, brindando seguridad y respaldo. Además, proporciona criterios para el rechazo o reanálisis de lecturas anómalas.

La validación de un método, generalmente, está íntimamente relacionada con el desarrollo del método. En efecto, a menudo es difícil saber de forma exacta, cuándo termina el desarrollo del método y cuando comienza la validación.

En la figura 6 se esquematiza el ciclo de una validación, en teoría éste se repite indefinidamente debido a los continuos avances instrumentales y/o al desarrollo de nuevas técnicas.



Figura 6. Ciclo de la validación

- **Otros términos relacionados con la validación**

- ✓ **Cualificación**

El término validación se amplía a veces para incluir el concepto de cualificación y consiste en la operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos.⁵

- ✓ **Calibración**

Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.^{4,5}

En resumen, los términos "Validación, Cualificación y Calibración", son conceptos que suelen emplearse de forma indistinta, sin embargo conceptualmente son diferentes. Validar es verificar documentalmete que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. Cualificar es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (máquina, equipo, instrumento, etc.). Calibración es una parte de la cualificación. Por consiguiente se puede decir que los métodos deben ser validados y los aparatos deben ser cualificados.

- **Necesidad de una validación**

Eurachem, una asociación europea de laboratorios focalizada en el mejoramiento y estandarización de los métodos de análisis químico, propone los siguientes principios para promover una buena práctica en las mediciones de análisis químico:

- a) Las mediciones analíticas deben hacerse para satisfacer un objetivo definido.
- b) Las mediciones analíticas deben realizarse usando métodos y equipos evaluados (cualificados), y así asegurar que estos son adecuados para su propósito.
- c) Los analistas encargados de los ensayos deben estar calificados y ser competentes con las tareas asignadas, además deben demostrar que ellos pueden realizar el análisis de forma adecuada.



d) Debe de existir un aseguramiento independiente y periódico del desempeño de las técnicas del laboratorio.⁴

- **Razones que justifican la validación de métodos analíticos**

a) Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.

b) Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.

c) Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.

d) La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.⁷

- **Cuándo realizar una validación**

La validación se encuentra dentro de un proceso de mejoramiento de la calidad de los laboratorios, y hace parte de un ciclo que es renovado con cada modificación que se realiza a los métodos. El proceso de validación debe realizarse cuando:

- a) Se desarrolla un nuevo método para un problema en particular (primera validación).
- b) Se establece un método usado en otro laboratorio o con diferentes analistas.
- c) Cambio o actualización de equipos de análisis.
- d) Obsolescencia y correspondiente actualización del método.
- e) Se renueva el principio activo o se realizan correcciones al procedimiento debido a condiciones de logística o de diseño.
- f) Cuando existen alteraciones de fondo en la matriz de análisis.

Estos factores no son excluyentes y por lo tanto pueden efectuarse varios a la vez. Se recomienda, entonces, cuando sea necesaria una **re-validación**, realizar la mayor cantidad de cambios previstos a futuro, y de esta forma no será necesario ejecutar validaciones de manera seguida; es decir, si por algún motivo se realiza una corrección en el procedimiento y es necesaria la validación, se debe realizar una búsqueda bibliográfica de las técnicas actuales para el método en cuestión y evaluar si en ese momento existen mejores técnicas para dicho análisis y si es apropiada su aplicación.

El proceso de validación está limitado por el alcance que se requiere, es importante definir bien los objetivos iniciales y el alcance que tendrá para de esta forma optimizar



los ensayos. Es de anotar, que en una re-validación no es necesario realizar todo el proceso de validación, en ocasiones solo es necesario realizar el correspondiente análisis de robustez y precisión.^{4,10}

- **Para iniciar la validación es necesario previamente**

- a. Tener perfectamente caracterizado el analito.
- b. Trabajar con una formulación definitiva (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición incluso a nivel de excipientes afectarán probablemente al procedimiento analítico.
- c. Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestro conocimiento acerca de éste, nos ofrezca garantías de que la validación puede

ser satisfactoria. Sólo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello en el desarrollo previo del método, es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.^{7,9}

- **Métodos susceptibles de ser validados**

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- ❖ Ensayos de identificación.
- ❖ Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- ❖ Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (Ej. test de disolución).
- ❖ Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- ❖ Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- ❖ Ensayos microbiológicos.⁴

- **Clasificación de métodos analíticos**

1. **Según la normalización y estado de desarrollo del método:**

- **Métodos estándar o normalizados**

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma.

Estos métodos incluyen aquellos publicados por:



- ✓ United States Pharmacopeia (USP)
- ✓ National Formulary (NF)
- ✓ Homeopathic Pharmacopeia of the United States
- ✓ Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
- ✓ International conference of harmonization (ICH)
- ✓ Pharmacopeia Britannica (BP)
- ✓ Farmacopea internacional (FI)

Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales es usado. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para asegurar una aplicación consistente.

→ Métodos desarrollados por el laboratorio

En ocasiones cada laboratorio elabora sus propios métodos, esto puede deberse a que el análisis es muy específico y se evalúa, por ejemplo, cierta matriz especial que solo interesa al laboratorio; o que debido a restricciones de tipo comercial no se puede disponer de métodos análogos usados en otras empresas o compañías. El laboratorio, por consiguiente, debe evaluar la capacidad de los analistas, equipos y otros recursos relacionados con el método en cuestión. Los métodos deben estar debidamente validados, documentados y autorizados para su uso.

Para la evaluación de la capacidad del método se sugiere realizar comparaciones con otros métodos normalizados. En lo posible se debe usar materiales de referencia, estándares o muestras fortificadas.

→ Métodos no normalizados

Los métodos no normalizados son aquellos que no han sido publicados por fuentes autorizadas y/o validadas. Es muy probable que los métodos sin normalización no dispongan de datos de validación o estudios colaborativos fiables o suficientes, por esto se recomienda realizar una validación cuanto sea posible. Si el método sufre cambios se requerirá una re-validación del método.

2. Según categoría de método (ver tabla 1)

Los métodos también pueden clasificarse según el ámbito en el cual es usado, estos pueden agruparse en cuatro categorías generales:

- **Categoría I:**
Para la cuantificación de materia prima o principio activo en producto terminado.



- **Categoría II:**
Para determinar impurezas en materia prima o compuestos de degradación en producto terminado; o para análisis de residuos en material biológico o alimentos.
- **Categoría III:**
Para determinar las características de funcionamiento como disolución o liberación de droga en el organismo.
- **Categoría IV:**
Pruebas de identificación

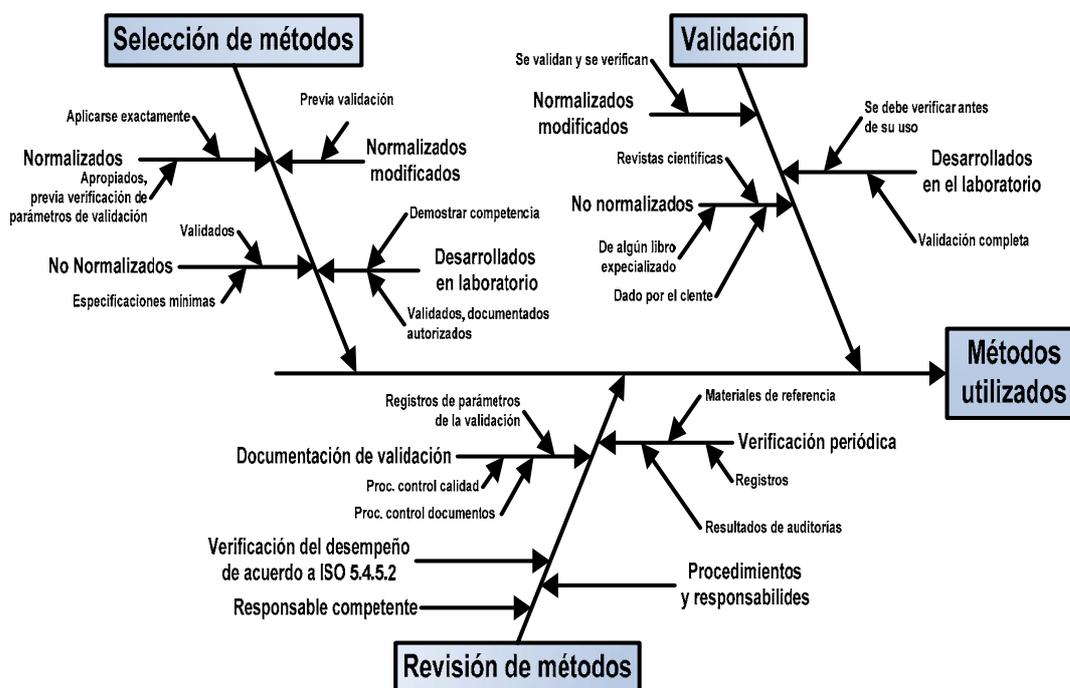
La validación de metodologías analíticas se fundamenta en la determinación de estos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Según la USP XXXII las metodologías se clasifican en cuatro categorías para su validación y ésta nos indicará qué parámetros deberán evaluarse, en la siguiente tabla se representa lo antes dicho:

Parámetros de desempeño requeridos para la validación de los métodos analíticos

Parámetro de desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativa	Cualitativa		
Selectividad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud	SI	SI	NO	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO

*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba

- **Selección y validación de métodos. ISO/IEC 17025**



• Pasos para la validación

- ✓ Desarrollar un protocolo de validación o procedimiento operacional para la validación.
- ✓ Definir la aplicación, propósitos y alcance del método.
- ✓ Definir los parámetros de idoneidad y los criterios de aceptación.
- ✓ Definir los experimentos de validación.
- ✓ Verificar las características relevantes de desempeño de los instrumentos.
- ✓ Calificar los materiales, es decir, estándares y reactivos.
- ✓ Llevar a cabo los pre-experimentos de validación.
- ✓ Ajustar los parámetros del método y/o los criterios de aceptación si es necesario.
- ✓ Realizar los diferentes experimentos de validación (internos y externos).
- ✓ Desarrollar los PNT para el empleo del método en análisis de rutina.
- ✓ Documentar los experimentos de validación y los resultados en un experimento de validación.

• Validación frente a los Métodos oficiales y/o de Farmacopeas

Se puede diferenciar entre validación de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas.^{9,10}

☆ Principios activos de síntesis



Los métodos oficiales o de Farmacopea se considerarán validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquéllos para los que fuera redactada la monografía.²²

☆ Especialidades

No es recomendable considerar ningún método oficial o de Farmacopea totalmente validado para una especialidad, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción.

No obstante pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades tipo, como pueden ser los de la Farmacopea Europea (EP), Farmacopea Americana (USP) o Farmacopea Británica (BP), que permitirán obviar una gran parte del desarrollo analítico.^{1,2}

• Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación

No existe una guía oficial que indique la óptima secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.²³

• Características del desempeño del método

Han de evaluarse los parámetros del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad. etc.²⁰

• Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez.

La estabilidad de las disoluciones de la muestra, después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización. Muchos laboratorios utilizan equipos automáticos que procesan muestras durante largos periodos de tiempo, con lo que la muestra puede permanecer horas preparada antes de ser analizada. De la misma forma debe demostrarse la estabilidad de las muestras y patrones preparados si se utilizan durante varios días.

La forma de evaluación de este parámetro en los métodos cromatográficos en columna (HPLC), consistirá en realizar inyecciones replicadas de una misma muestra a lo largo del tiempo que se considere necesario. En caso de que la estabilidad de la muestra pueda afectar al resultado en el periodo de tiempo evaluado, se ha de hacer constar en el método de análisis.¹⁷

• Puesta a punto. Características de idoneidad



La puesta a punto del método analítico, incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

El estudio de robustez se utiliza para optimizar y ver la criticidad del valor de los parámetros del método antes de validar. A partir de este estudio se definirán las características de idoneidad o conjunto de parámetros que garanticen que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados. Dichas características se reúnen en un ensayo conocido como ensayo de idoneidad.

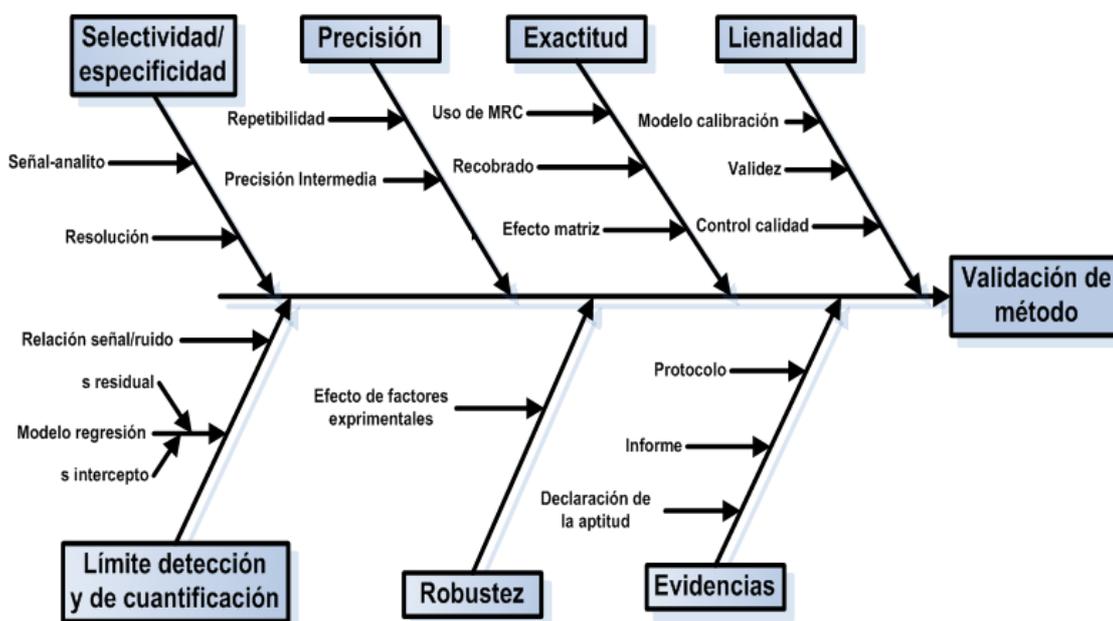
La comprobación de la idoneidad forma parte integral del método, y debe realizarse cada día al inicio del análisis (dependiendo de la duración de éste, será conveniente realizarlo a intervalos de tiempo), para comprobar el correcto funcionamiento del sistema. Los requerimientos y parámetros a evaluar en un ensayo de idoneidad dependerán del tipo de método.^{13,14,19}

• Características de fiabilidad

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Las características de fiabilidad comprenden los cinco criterios fundamentales de validación, (no necesariamente aplicables en todos los casos) y de los que derivan en la práctica todos los parámetros de validación:

Los parámetros de desempeño correspondientes a la Categoría I que fueron incluidos en la siguiente tesis monográfica para la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Acetaminofén por HPLC se definen a continuación.²¹





- **Análisis cuantitativo**

En general todo análisis cuantitativo puede dividirse en varias etapas:

1. Muestreo.
2. Detección.
3. Integración de las señales.
4. Cálculo de la composición.
5. Interpretación estadística.

- **Muestreo**

Para obtener una muestra representativa generalmente se necesita tomar una porción considerable mayor que la requerida para el análisis que va a emplear. El analista selecciona luego una porción pequeña (alícuota), la muestra analítica de la muestra que se le presenta.

- **Detección**

La sensibilidad, linealidad y la selectividad del detector es muy importante. El tamaño de la muestra debe de estar dentro del intervalo lineal del detector. Los cambios de flujo de temperatura y las fallas electrónicas pueden afectar las características de la respuesta del detector, por otra parte el detector puede ser completamente ciego a un determinado tipo de muestra o bien su sensibilidad varía para compuestos de diferentes estructuras. Por esta razón se recomienda tener cuidado al interpretar los resultados (ver instrumentación para HPLC).

- **Integración de señales:**

El propósito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de las señales emitidas por el detector en medidas que puedan relacionarse con la concentración de la muestra. Las señales obtenidas en la mayoría del detector, aparecen en el registrador como picos de forma aproximadamente "Gaussianas" cuya altura o área se utiliza como una medida cuantitativa.



- **Cálculo de la composición**

Se cromatografía en idénticas condiciones una serie de muestras que contiene cantidades conocidas o variables de la sustancia en cuestión. Una representación de la altura del pico o área en función del tamaño de muestra dará una representación de calibración lineal. Entonces puede analizarse una muestra desconocida cromatografiándola en iguales condiciones y leyendo de cada componente en la representación de calibración.

- **Interpretación estadística**

Los aspectos cuantitativos del HPLC; han mejorado notablemente con la introducción de los inyectores automáticos y los integradores electrónicos, esto unido a los avances en calidad de las columnas y la estabilidad de los detectores ha permitido de obtener de forma rutinaria resultados cuantitativos de gran precisión, cuya desviación, estándar relativa es muchas veces menor del 1%.

- **Métodos de farmacopea**

Algunas farmacopeas como la USP o la BP, publican monografías para el análisis de especialidades farmacéuticas. Estas pueden tener composiciones diferentes, a escala cualitativa (excipientes) y/o cuantitativo. Es evidente que para estos productos de matrices variables, la monografía puede tomarse como un punto de partida, con el consiguiente ahorro de costes en el desarrollo del método.

En los métodos cromatográficos hay un gran número de variables que entran en juego, por ejemplo, no todos los instrumentos tienen el mismo volumen muerto o longitud de celda del detector.

Puede haber diferencia entre el mismo tipo de fase estacionaria adquirida diferentes fabricantes de columnas. Es frecuente por lo tanto, que siguiendo el método descrito por la farmacopea no sea posible cumplir el ensayo de idoneidad del sistema. Para

solucionar estos problemas la farmacopea europea permite a partir del primero de enero de 2001, realizar ajustes en los parámetros cromatográficos, hasta unos valores máximos fijados sin necesidad de revalidar el método.^{1,13,14,19,24}

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE VALIDACIÓN

- ☆ **Linealidad rango y sensibilidad**



☆ Definición

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.

☆ Función respuesta

La función de respuesta (curva de calibración) de un método analítico es, dentro de un intervalo de concentraciones, la relación existente entre la respuesta o señal y la concentración o cantidad del analito en la muestra. La función respuesta monótona más simple es la curva de calibración.

☆ Calibración

La calibración es el proceso que comprende:

- ✓ Preparar y analizar una serie de estándares.
- ✓ Determinar los valores de respuesta (datos primarios).
- ✓ Encontrar el modelo estadístico para ajustar los datos y predecir la concentración de un analito en una muestra.

☆ Ámbito de aplicación

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo:

- ✓ Valoración del contenido de principio activo.
- ✓ Uniformidad de contenido.
- ✓ Velocidad de disolución.



- ✓ Cuantificación de impurezas.

☆ Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Parte de la inspección visual preliminar que se debe realizar a la regresión lineal, es importante verificar estadísticamente la linealidad y la aleatoriedad de los valores residuales.

☆ Sensibilidad

La sensibilidad es el gradiente de la curva de respuesta (respuesta vs concentración), es decir, el cambio en la respuesta de un instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito, en otras palabras, es la pendiente de la curva de calibración.

Cuando un método tenga una pendiente más alta que otro, se dice que el primero es más sensible. La IUPAC define la sensibilidad de forma más técnica como "El cambio en la respuesta de un instrumento dividido por el correspondiente cambio del estímulo (señal de entrada). Cuando se ha establecido linealidad en la curva de respuesta este parámetro es constante, sin embargo en métodos no lineales existen valores para distintos rangos de concentración. La sensibilidad en ocasiones es referida al límite de detección pero esto en general no es aceptado.

❖ Pasos para cálculo de sensibilidad:

- Preparar estándares a diferentes concentraciones, mínimo 3 puntos para respuestas lineales y mínimo 5 para polinómicas, preferiblemente usando alícuotas de una misma solución.
- Analizar las muestras y graficar la curva de calibración.
- Realizar una regresión lineal o polinómica según el caso.
- Registrar la pendiente para una regresión lineal, o las derivadas evaluadas para cada punto de la calibración.

• PRECISIÓN

☆ Definiciones

La precisión se relaciona con la dispersión de la medida alrededor de un valor medio central. Expresa el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo



método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

En la precisión pueden considerarse tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. En el siguiente esquema (figura 1) podemos observar de manera más clara la organización jerárquica de estos niveles.

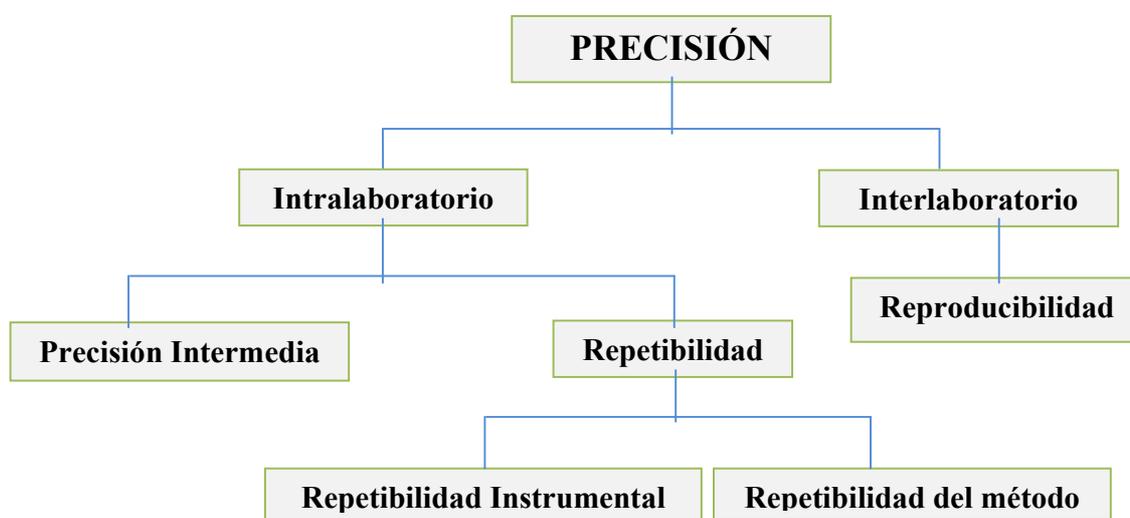


Figura 1. Jerarquía de los niveles de precisión

La precisión de un método analítico por lo general se expresa como la varianza, desviación estándar o como la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.

❖ **Repetibilidad:**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. La repetibilidad también se conoce como precisión intra-ensayo.

❖ **Precisión intermedia:**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.



❖ **Reproducibilidad:**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de una serie de medidas.

La precisión y exactitud a menudo son conceptos que pueden confundirse, para una mejor apreciación de lo que significa cada una podemos analizar la figura 6.

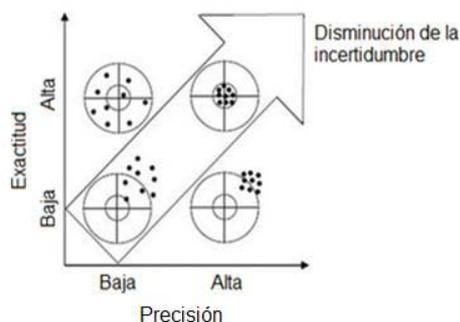


Figura 6. Diferencia entre exactitud y precisión

En la siguiente tabla se exponen los factores que inciden en el estudio de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad:

Factores que inciden en la precisión

Factor	Repetibilidad	Precisión intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente



Tiempo entre análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Laboratorio	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores (reactivos, condiciones ambientales, columnas cromatográficas etc.)	Igual	Igual	Diferente

Otros factores que influyen son los siguientes:

- ✦ Humedad y temperatura ambiental.
- ✦ Instrumentos de características diferentes o diferentes tecnologías.
- ✦ Variación de detalles experimentales no especificados en el método.
- ✦ Equipos de diferente antigüedad.
- ✦ Electrodo o columnas de cromatografía de diferentes lotes y/o proveedores.
- ✦ Disolventes y reactivos de diferente calidad.

☆ **Ámbito de aplicación**

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas. Por lo tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni en el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.

☆ **Repetibilidad**

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas. Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Así por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas (por ejemplo impurezas). Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis.

☆ **Repetibilidad del sistema instrumental**

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6



a 10 veces. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas.

☆ **Repetibilidad del método**

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de seis muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

☆ **Precisión intermedia**

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

☆ **Como mejorar la precisión**

- ✓ Empleando un método de medida fisicoquímico más preciso.
- ✓ Empleando estándares de calibración cuyo valor medido sea igual a la concentración de la muestra.
- ✓ Realizando más replicas de medida de la muestra.



- ✓ Incrementando el número de estándares de medida.

• EXACTITUD

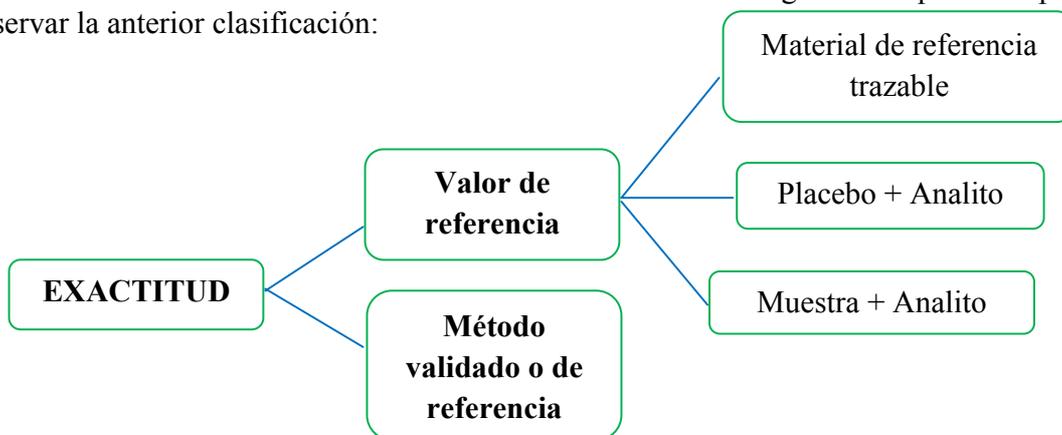
☆ Definición y generalidades

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. También es llamada en algunos casos fidelidad. En el método de validación se busca con el cálculo de la exactitud valorar conjuntamente los efectos sistemáticos y aleatorios, y está muy ligado con la precisión, incluso algunos autores dividen la exactitud en dos componentes: fidelidad y precisión. Para no crear confusiones, en este estudio se tomará la exactitud como fidelidad o *trueness* y la precisión será un factor independiente, aunque no aislado.

Se recomienda que la exactitud se calcule después de que la precisión, linealidad y la selectividad hayan sido establecidas.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión esta relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

Existen dos procedimientos en general para determinar la exactitud de un método. El primero y más común; es realizar la comparación contra un material de referencia, que puede ser un estándar trazable, un placebo o una muestra con una cantidad de analito conocida. El segundo método es comparar los resultados con otra técnica aún más exacta o que por consenso común es referencia (métodos oficiales), este caso se usa cuando no existen materiales de referencia certificados o trazables. En el siguiente esquema se puede observar la anterior clasificación:





El uso de materiales de referencia o estándares está dado según los siguientes criterios:

- Material de referencia o patrones certificados: se usan para validación de métodos a largo plazo. Su uso no es extensivo.
- Estándares: utilizados en los cálculos de exactitud a corto plazo, verificaciones y estudios no críticos.

☆ **Ámbito de aplicación**

Según la guía (ICH, Q2A) debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.

☆ **Procedimientos de determinación de la exactitud**

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo tres determinaciones por tres niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

La exactitud se expresara como porcentaje de recuperación (ver ecuación) en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

$$\%R = \frac{X_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Diferencia (Sesgo)} = X_m - \mu$$

Expresión matemática de la exactitud

Donde X_m es el valor medio encontrado y μ es el valor aceptado como verdadero.

☆ **Riqueza de un principio activo**

➤ **Aplicación del método analítico a una muestra de riqueza conocida**

Para evaluar la riqueza de un principio activo o de una materia prima es habitual la utilización de un método absoluto, por ejemplo una valoración ácido-base. En este caso para demostrar la exactitud del método puede valorarse un patrón de referencia de concentración conocida y se compara el valor hallado con el valor verdadero conocido. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, en muchos casos no existen patrones de referencia certificados por un organismo



oficial, como los patrones del NIST (National Institute of Standards and Technology) o los suministrados por las diferentes Farmacopeas (EP, USP Standards, BP Standards). Entonces la evaluación de la exactitud puede llevarse a cabo por comparación con un método de referencia validado como se describe más adelante.

➤ **Comparación con un método de referencia validado**

Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia, cuya exactitud este bien determinada o definida. Ambos métodos deben ser independientes.

➤ **Determinación cuantitativa de un analito en un producto acabado**

El enfoque es similar al que se plantea para evaluar la exactitud de un método para la riqueza de un principio activo pero en este caso se trabaja sobre el producto acabado.

➤ **Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida**

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición estándar sobre el problema.

❖ **Método del placebo cargado**

Se prepara un placebo que contiene todos los ingredientes menos el analito, es decir, que sea la misma matriz. A este se agregan cantidades conocidas de analito, mínimo tres niveles y tres repeticiones a cada uno. Se calcula la recuperación. Este método puede presentar cierto grado de incertidumbre y constituye solo una aproximación a la muestra en casos reales.

❖ **Método de adición estándar**

Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga el analito. Se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo tres replicados para cada nivel y se analizan las muestras adicionadas y no adicionadas según el método analítico calculando finalmente la recuperación. Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere la preparación especial de un placebo cargado. No obstante, también debe hacerse la misma reflexión que para el método del placebo cargado, ya que la adición de un patrón sobre una muestra no es exactamente lo mismo que el producto acabado real.

Debido a que donde se desarrolla la validación del método analítico (LCCM), es un laboratorio meramente analítico; se procederá a calcular la exactitud de la



metodología analítica mediante la determinación cuantitativa de un analito en un producto acabado.

☆ **Recobrado y evaluación de interferencias (EFECTO DE MATRIZ)**

El efecto matriz es el cambio en la pendiente de la curva de calibrado, o alteración de la sensibilidad, producida por la matriz (medio que conforma todos los componentes de la muestra que contiene el analito). El efecto es producido debido a la particular forma química en que se encuentra el analito en la muestra, y también a su entorno fisicoquímico, esto es, a la presencia de los componentes de la muestra que interaccionan con el analito de interés.

Los componentes de la matriz pueden provocar un efecto depresor o intensificador de la señal analítica o efecto de matriz. Para minimizar este efecto se utiliza el método de adición patrón en la curva de calibración.

Para determinar si existe o no efecto matriz se estima el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de calibración de la muestra versus la curva de calibración del estándar.

☆ **Estimación del recobrado y su incertidumbre asociada**

Para evaluar el tipo de efecto que ejerce la matriz, se estima el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de calibración por adición patrón con la normal.

• **SELECTIVIDAD**

☆ **Definición**

Capacidad de un método analítico para medir e identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida sólo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta solo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.



La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

☆ **Ámbito de aplicación**

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos. De hecho es muy difícil declarar que no existe interferencia en la determinación de un analito porque siempre existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, hasta el momento desconocida, que interfiera. También se puede dar el caso contrario, de hallar alguna posible interferencia que en la práctica diaria sea improbable que se produzca.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como sobre posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico. Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta qué punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles.

Los criterios de selectividad que debe satisfacer un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique. El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar la estabilidad del principio activo o de la forma farmacéutica. El método ha de permitir distinguir entre todas las posibles especies químicas existentes o que puedan generarse. Sin embargo, para un método de control de calidad de rutina la existencia de alguna interferencia se podría aceptar si ésta es conocida y de magnitud aceptable. En estos casos la selectividad puede entrar en conflicto con el coste y el tiempo necesarios para la determinación del analito.

Las conclusiones de los estudios de selectividad están vinculadas al origen de la muestra, la optimización de la preparación, la especificidad de la medida y las condiciones instrumentales. Por tanto, cualquier cambio en las mismas supone una reconsideración del estudio realizado. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto el estudio de la selectividad es el parámetro que en más ocasiones debe revisarse. A grandes rasgos el estudio de la selectividad variará su planteamiento según el objetivo y la técnica analítica aplicada.



☆ **Según objetivo del ensayo**

✓ **Identificación**

Se debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra.

Durante el desarrollo de una molécula la identificación requerirá la comprobación de la estructura de la molécula mientras que en un método para el control de calidad rutinario no será necesaria la confirmación completa de la estructura química o composición del producto y bastará con la comparación con una sustancia de referencia. En estos casos el objetivo es confirmar, con un grado de seguridad aceptable, que el producto se corresponde con lo esperado.

✓ **Ensayos de impurezas**

Se debe garantizar que el método permite una evaluación de las impurezas y los productos de degradación definidos en estudios previos, sin interferencia de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

Para estos ensayos se presupone que se han realizado estudios previos y se han definido las impurezas y productos de degradación susceptibles de aparecer. Si el método es selectivo para determinados productos de degradación puede utilizarse para controlar la estabilidad del producto.

✓ **Determinación cuantitativa de la riqueza de un principio activo**

El método debe evitar la interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

☆ **Según la técnica analítica aplicada**

✓ **Ensayos específicos**

Como se ha indicado anteriormente se considera apropiado reservar este término para aquellos métodos analíticos que proporcionen un 100% de selectividad. Este tipo de métodos representaría la situación ideal aunque en el análisis farmacéutico actual su utilización no es muy común.

✓ **Ensayos absolutos**

El uso de métodos de valoración no específicos se debe combinar con la utilización de otros procedimientos analíticos para demostrar la idoneidad del análisis, como por ejemplo una valoración potenciométrica combinada con un test de impurezas.



✓ Ensayos separativos

Son los ensayos de más amplia aplicación en la industria farmacéutica actual aunque hay que recordar que no están libres de interferencias. Por ejemplo, en cromatografía líquida no es suficiente para asegurar la selectividad del ensayo con determinar el tiempo de retención.

Sería necesaria la comprobación de la ausencia de interferencias con la aplicación de una técnica complementaria adecuada. Este tipo de análisis proporciona una segunda vía de información que confirma la primera. Entre las combinaciones posibles se puede citar las siguientes:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector con arreglo de diodos (DAD).
- HPLC con detector de masas (MS).
- HPLC con confirmación por columnas de diferente polaridad.
- Cromatografía de gases (GC), con detector de masas (MS).
- GC / Espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR).

De los anteriormente citados el detector de diodos en HPLC es el de más amplia difusión.

Este tipo de detectores permite evaluar la coelución de analitos en un mismo pico cromatográfico aplicando un algoritmo matemático que compara el espectro adquirido a lo largo del pico con el fin de determinar si consta de uno o más compuestos con espectros diferentes. Las diferencias observadas entre los espectros adquiridos han de ser explicables por la variabilidad debida al efecto del ruido y del disolvente. Por lo tanto, la comprobación espectral de la pureza de pico es un indicativo de su homogeneidad no pudiendo descartar la coelución de otras sustancias con espectros similares presentes en la muestra. En condiciones ideales, se pueden detectar impurezas en un pico del orden del 0,05 al 0.1%.

Una vez demostrada la selectividad del método se puede prescindir de la técnica complementaria. El método seguirá siendo válido mientras se aplique a muestras obtenidas a través de la misma ruta de síntesis y con igual perfil de impurezas. En la aplicación rutinaria del método los parámetros del test de idoneidad del sistema permiten comprobar el mantenimiento de la selectividad del método.

☆ Procedimientos de determinación de la selectividad

En el estudio de la selectividad, como norma general, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipientes.

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método como se muestra a continuación:



✓ **Por adición de las interferencias**

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos para los que se tienen identificadas las posibles interferencias y éstas se encuentran disponibles de forma aislada.

En estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de dichas interferencias. Se evaluará a qué nivel se producen y si es preciso modificar el método o añadir alguna técnica complementaria.

Para una forma farmacéutica y una materia prima los grupos de muestras que se preparan normalmente serían los siguientes:

Determinaciones para la forma farmacéutica	Determinaciones para la materia prima
Matriz	Blanco
Analito	Analito
Matriz + Analito	Otras sustancias similares
Matriz + Analito + Impurezas + Productos de degradación.	Analito + productos de degradación + impurezas.

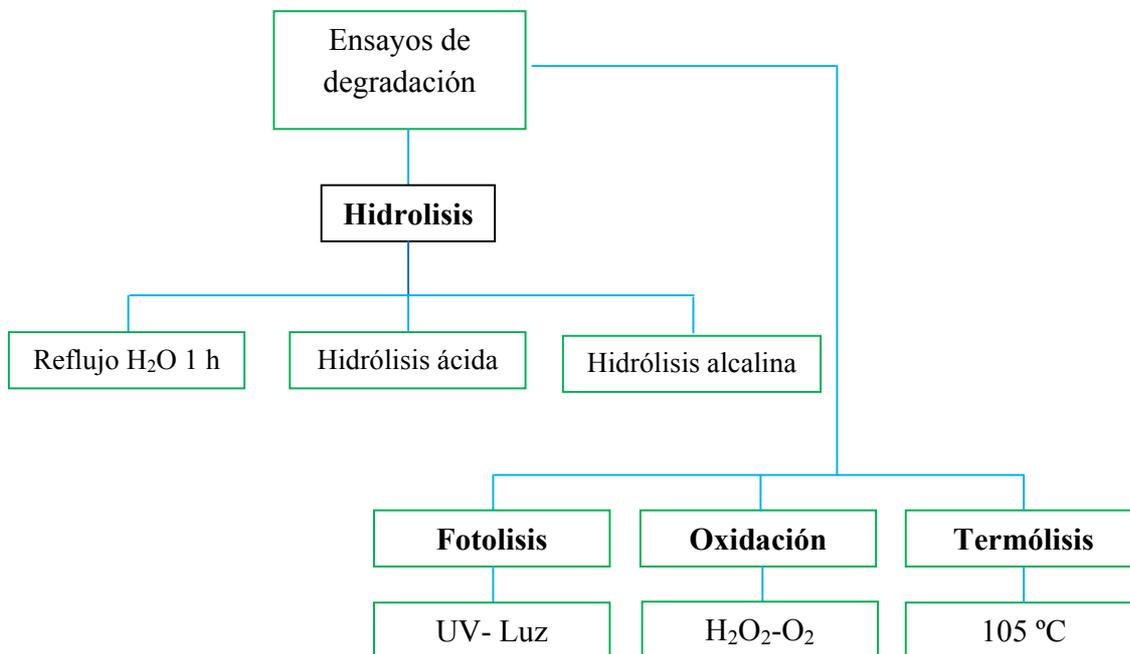
La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés (ej. Agente estabilizante) y las interferencias a su límite máximo establecido.

✓ **Aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés**

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas a estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes; en el siguiente esquema se muestra los diferentes tipos de degradación que puede ser sometida el analito de interés:



Selectividad. Degradación Artificial



Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene sólo de él. Las condiciones de estrés para lograr una degradación del orden del 10-20% en la mayoría de principios activos son:

Condiciones para la forma farmacéutica	Condiciones para la materia prima
Calor (40-70 °C)	Calor (40-100 °C)
Luz	Luz
Humedad relativa (85%)	Ácido (HCl 0.1 N)
	Base (NaOH 0.1 N)
	Oxidante (H ₂ O ₂ 3%)

La evaluación de la degradación se puede determinar comparando los perfiles obtenidos del producto estresado y no estresado. Con esta finalidad puede ser de interés la superposición, de los distintos cromatogramas obtenidos. Dichos cromatogramas se adjuntarán en el informe a una escala razonable que permita la perfecta visualización del perfil obtenido.

☆ Procedimientos que ayudan a la determinación de la selectividad en métodos cromatográficos (HPLC)

1. Equipo instrumental con detector espectrofotométrico con arreglo de diodos.
2. Determinación de los tiempos de retención del analito y productos de degradación.
3. Empleo de detectores de mayor selectividad.



4. Empleo de técnicas complementarias (espectrofotometría), y de sistemas de acople (cromatografía líquida con detector infrarrojo, CL con detector de masas).
5. Superposición de espectros.

☆ **Calculo de la selectividad**

Klaus Danzer propone una novedosa forma cuantitativa de medir la selectividad para métodos multicomponentes y monocomponentes, a partir de varios ensayos usando distintas concentraciones del compuesto de interés y de las interferencias. La desventaja de este método, es que solo es aplicable cuando se tiene conocimiento de la composición cuantitativa de las interferencias y dichas interferencias se tienen de forma pura y aislada.

• **ROBUSTEZ**

☆ **Definición**

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

La robustez (Robustness) no debe confundirse con el término Ruggedness. Este último no se menciona en las guías ICH, pero si en la Farmacopea USP. Ésta define el término Ruggedness como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, diferentes temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones habituales de laboratorio a laboratorio. Da una idea de la influencia que tienen las variables ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que podría asimilarse al término reproducibilidad.

☆ **Ámbito de aplicación**

Aunque tanto las guías ICH como la USP definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, no es considerado, todavía, un requisito necesario para registro de especialidades, sino que se trata de un estudio que surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provocaba serias dificultades



en la equivalencia entre los resultados de ambos centros de análisis, de modo que con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de análisis. Por esta misma razón, las guías ICH recomiendan incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero. Incluso después de realizar el estudio de robustez podría concluirse que se debe modificar algún parámetro del método, obligando a la consiguiente revalidación de los puntos necesarios. Se considera por tanto que antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar, es recomendable hacer un estudio de robustez de forma que una vez fijados los márgenes en los que el método es robusto, se pudieran incluir éstos como parte del método final, dotándolo así de una cierta flexibilidad. Es decir se tendría una justificación válida que apoyaría la modificación de ciertos parámetros en el caso de que fuera necesario, por ejemplo a la hora de cumplir una idoneidad del sistema en cromatografía. Por el contrario, en el caso de los factores más críticos, debe hacerse mención especial de la importancia que tiene ajustar el valor o seguir el procedimiento al pie de la letra.

De hecho la consecuencia directa de los resultados del estudio de robustez ha de ser la definición razonada del test de idoneidad del método, que en muchas ocasiones es fijado de una forma arbitraria y sin saber a ciencia cierta si los requisitos que impone son realmente necesarios o limitan la realización del método a unas condiciones escasamente reproducibles.

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. Algunos pueden tener muchos parámetros sobre los que actuar y otros menos. Además éstos no tienen por qué ser sólo factores relacionados con la medida final, sino que pueden ser de cualquier etapa del procedimiento analítico, como por ejemplo la preparación de la muestra. Por esto, la primera etapa del estudio es precisamente analizar todo el método y definir qué factores son los que se espera que influyan más en el resultado final.

☆ **Procedimiento de determinación de la robustez**

➤ **Factores y niveles de influencia**

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, qué parámetros se van a medir en cada ensayo. En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable sobre la concentración de analito calculada. El estudio de la influencia sobre varios parámetros nunca implica la realización de más ensayos, sino que se puede hacer a partir de los mismos.



Los factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tantos factores cuantitativos (ej. influencia del valor de pH, del valor de temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil HPLC, etc.) como cualitativos (ej. fabricante de la columna cromatográfica, fabricante de un determinado reactivo, etc.).

➤ **Factores que pueden variarse para la técnica analítica HPLC para determinar la robustez del método**

- 1) Composición de la fase móvil:
 - ✦ Porcentaje orgánico.
 - ✦ Concentración de sales en el tampón (fuerza iónica).
 - ✦ Concentración de aditivos (ej. aminos).
 - ✦ En gradientes: Composición inicial y final de la fase móvil y pendiente del gradiente.
- 2) Volumen de inyección
- 3) pH de la fase móvil
- 4) Temperatura de la columna
- 5) Flujo
- 6) Tipo de columna:
 - ✦ Fabricante de la fase estacionaria
 - ✦ Lote de columna
 - ✦ Antigüedad de la columna
- 7) Detector: Variación de longitud de onda (UV).
- 8) Sensibilidad de integración.

Una vez definidos los factores que pueden influir en el análisis se ha de fijar entre qué márgenes de variación se quieren evaluar:

Normalmente los márgenes de fluctuación de cada factor cuantitativo se distribuyen simétricamente respecto al valor nominal descrito en el método de análisis, (ej. $Ph \pm 0.1$) aunque no siempre tenga que ser así, puesto que lo que interesa es fijar unos intervalos que se correspondan con lo que es esperable que el método fluctúe en el proceso de, por ejemplo, una transferencia interlaboratorio.

Tras establecer los factores a estudiar la forma aparentemente más sencilla de comprobar la influencia de cada uno de ellos sobre el método sería comparar los resultados obtenidos modificando dicho factor, pero manteniendo constantes los demás. No obstante esto conlleva dos problemas:

- ✦ El efecto de modificar más de un factor a la vez puede ser diferente de lo observado al modificarlos de uno en uno.
- ✦ Cuando hay bastantes factores esto representa mucho trabajo, tiempo y dinero.



La forma más eficaz de estudiar la robustez es pues efectuar un diseño factorial. De esta forma, a menudo, sin realizar todas las combinaciones posibles, se puede concluir con un número asequible y razonable de experimentos qué variables son las que más influyen en el resultado y en qué magnitud.

➤ **Resumen del procedimiento para cálculo de robustez**

- ✦ Identificar los factores de variación.
- ✦ Establecer los niveles de influencia.
- ✦ Selección del diseño experimental.
- ✦ Definición del protocolo de experimentos.
- ✦ Ejecución de los experimentos y determinaciones.
- ✦ Cálculo de efectos.

☆ **Determinación experimental de la robustez**

La robustez de un método está decidida a encontrar la influencia de las fluctuaciones leves de las condiciones de un determinado método analítico sobre el resultado de la determinación final. La robustez permite identificar las variables que tendrían un efecto significativo en el desempeño de un método de análisis dado. Cuanto mayor es la influencia de pequeños cambios en los parámetros en los procesos de medición en los resultados en la determinación final, mayor será las desviaciones del método. Es por eso que la robustez es un parámetro relativo en los cambios de las condiciones internas. Sin embargo, la resistencia (flexibilidad) es un parámetro que describe la utilidad de un determinado método de análisis en diferentes condiciones, y puede ser estimado a partir de la reproducibilidad.

• **LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

☆ **Definición y generalidades**

Se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH, QZA).

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.



No deben confundirse estos términos con otro al que normalmente se asocian, la sensibilidad, ya que, ésta es la capacidad de un método de análisis para discriminar pequeñas diferencias en concentración o masa del analito. Por lo tanto en términos prácticos, la sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración obtenida al representar la respuesta frente a la concentración. En este sentido una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de cuantificación y de detección, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre el ruido y la señal debida al analito; es decir, a este respecto siempre es preferible un sistema con bajo ruido de fondo a costa de una menor sensibilidad.

☆ **Ámbito de aplicación**

De esta definición general se derivan, no obstante una serie de cuestiones previas a resolver, tales como cuando es necesario establecer los límites de cuantificación y detección para un método de análisis y cuál es el interés en su determinación; es decir, qué aporta a la validación del método establecer dichos límites.

Como ya se ha apuntado con anterioridad, la guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Esto es, ensayos en los que simplemente se determina si la cantidad de impureza presente en la muestra es superior o no al límite establecido en especificaciones, sin dar un valor numérico. Se trata de demostrar de esta forma que el método es realmente capaz de detectar la concentración límite y superiores.

Por el contrario se considera necesario establecer únicamente el límite de cuantificación en métodos destinados a la determinación numérica de impurezas; y es aquí donde puede surgir la primera duda, puesto que hoy día la pureza de gran parte de los principios activos farmacéuticos se define a partir de una serie de test límites de impurezas conocidas y desconocidas junto, con la suma total de éstas, y parece obvio que si se ha de dar finalmente una suma porcentual del contenido en impurezas, previamente éstas se han de haber cuantificado con suficiente precisión y exactitud; dicho de otro modo, siempre que se deba dar un valor numérico al total de impurezas se reconoce implícitamente la necesidad de determinar el límite de cuantificación para cada una de ellas. De todo ello se deduce que siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de principio activo, sería muy recomendable de entrada establecer no solo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.

Por otra parte, cuando el método se define como un método de análisis de valoración de contenido en el cual siempre se trabajará en rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo, no sería necesario la determinación de éstos parámetros; no obstante, y como se ha insistido a lo largo de la monografía, la validación permite un mejor conocimiento del método analítico, y



desde este punto de vista, saber cuáles son las cantidades mínimas de analito que se podría cuantificar puede resultar muy interesante y en ocasiones útil.

Es importante recordar que una vez establecidos estos límites y como en cualquier otro parámetro de validación, será necesario recalcularlos siempre que se introduzcan variaciones en el método que puedan afectar a su valor, o se modifique el modelo de equipo empleado en el análisis (ej: transferencia de métodos analíticos interlaboratorio).

Una vez se ha visto la importancia de estos parámetros de validación, se tratará de desarrollar los diferentes métodos a través de los cuales pueden establecerse. No obstante, procedimientos de análisis y sistemas instrumentales hay de muy diversa índole y sus características definen en muchos casos cuál es el método óptimo a seguir de entre los posibles.

☆ Procedimientos de determinación del LD y LC

1. Métodos basado en el examen visual

En este caso, según ICH Q2B, tanto el LD como el LC podrían determinarse a partir del análisis de muestras con concentraciones conocidas y decrecientes de analito, estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable así como aquella concentración límite que permite cuantificar con razonable precisión y exactitud la señal obtenida.

Así definido, se debería puntualizar que este procedimiento es el más indicado en el caso de métodos de análisis no instrumentales, en los que no se tiene una señal numérica, y que en opinión de los autores no resulta apropiado para determinar la dificultad que puede entrañar establecer los criterios de precisión o exactitud en una determinación visual.

2. Método basado en la relación señal/ruido

Este método, uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito. Es el caso de métodos instrumentales tan empleados en el campo químico-farmacéutico como la espectrofotometría UV -visible o la cromatografía de gases o líquida (HPLC).

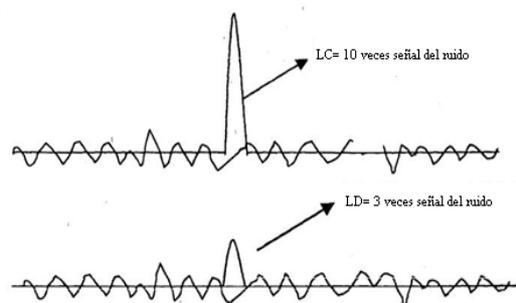
Cuando el método de análisis se basa en alguna de estas técnicas, puede establecerse el límite de detección y cuantificación de forma teórica mediante el siguiente procedimiento:

Se establece la señal ruido que proporciona un blanco o placebo (matriz de la muestra conteniendo todos los ingredientes a excepción del analito a estudiar) a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). Para métodos cromatográficos el cálculo de dicha señal-ruido es más



costoso, pero una vez establecido este valor puede concluirse de forma teórica y aproximada que el LC será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior a dicho ruido de fondo, y que el LD será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a éste (ver figura 1).

Resulta evidente que una vez establecida esta concentración no se puede escapar a la comprobación experimental de que el análisis de muestras conteniendo la concentración de analito correspondiente al LD y LC teóricos conducen a los resultados esperados, y para ello se prepararán un número adecuado de muestras (habitualmente un mínimo de 6) a dichas concentraciones y se analizarán de forma que puedan obtenerse los datos para calcular la precisión y la exactitud en el LC, tal y como recomienda la guía tripartita ICH, Q2B.



Relación señal ruido para de determinación del LD y LC

3. Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado

De acuerdo con la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), puede calcularse el LD y LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito.

La expresión a aplicar para este cálculo varía en función de si el método instrumental empleado corrige la señal frente a un blanco o no.

→ Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco

El caso en que no se realiza corrección frente a un blanco es típicamente el de métodos cromatográficos GC o HPLC. En estos se ha de tener en cuenta también la señal media obtenida del análisis correspondiente al placebo, es decir, el ruido de fondo o background del sistema.



Este procedimiento, al igual que el de la relación señal/ruido, plantea el problema de cómo calcular la señal media de un blanco así como su desviación estándar. Es decir como calcular el ruido de fondo o background y su correspondiente desviación estándar.

4. Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, como se ha podido observar, de la señal media del blanco y su desviación estándar.

Para ello el método utiliza igual que el expuesto con anterioridad la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje "Y" corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero de analito. De la misma manera se sustituye en la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco.

Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al LC y calcular la ecuación de la recta respuesta frente a concentración, y aplicar las mismas fórmulas que las expuestas en el apartado anterior.

Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se debe construir la recta calculada tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas. De esta forma se obtiene una recta de ecuación.

• IDONEIDAD DEL SISTEMA

☆ Definición

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema, (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. En la práctica, podría equipararse a una cualificación del proceso analítico (PQ) o una "revalidación en continuo", ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo, el conjunto del sistema, continúa siendo "válido" para el propósito para el que fue concebido.

☆ Ámbito de aplicación



El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. Por ejemplo, en procedimientos analíticos volumétricos se incluye la evaluación del blanco y una precisión de los resultados obtenidos. Sin embargo, es en las técnicas cromatográficas donde éste tipo de pruebas se emplean con mayor asiduidad.

★ **Procedimiento de determinación de la idoneidad**

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.

Los requisitos que debe cumplir el método analítico se establecen desde la primera fase de desarrollo, aunque en esos momentos no es posible concretar la prueba que permitirá comprobarlos. Durante este período será suficiente el registro de la evolución de los distintos parámetros analíticos a lo largo del tiempo y la comprobación de la precisión del sistema realizando medidas repetidas de una misma preparación de muestra.

Posteriormente, los resultados del estudio de robustez permitirán adquirir el conocimiento necesario para establecer los factores críticos y el impacto que éstos han tenido sobre el comportamiento del método. Este es el momento de diseñar las pruebas a realizar y establecer los criterios que permitan asegurar que los requisitos establecidos se cumplirán más allá del momento concreto en el que se lleva a cabo la validación propiamente dicha.

Los ensayos de idoneidad del sistema que se establezcan vendrán dados por el conocimiento adquirido del método y la viabilidad de su empleo en rutina debiendo corresponderse con los valores mínimos para los que los parámetros estudiados permanecen dentro de las especificaciones establecidas.

Estos ensayos no sólo demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también permiten establecer el criterio por el que modificar las condiciones analíticas descritas en el procedimiento con el fin de alcanzar la idoneidad. Estas modificaciones se encontrarán siempre dentro de unos límites establecidos durante el estudio de robustez.

El procedimiento de realización del test de idoneidad, así como sus criterios de aceptación deben encontrarse perfectamente establecidos dentro del método de análisis, indicando las acciones a realizar en caso de no cumplirse.

★ **Parámetros de evaluación**

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

- 1) Precisión.



- 2) Parámetros cromatográficos:
 - i) Factor de retención.
 - ii) Número de platos teóricos.
 - iii) Factor de coileo o asimetría.
 - iv) Factor de resolución.
- 3) Limite de detección o cuantificación.

Como se puede observar, las pruebas de idoneidad encuentran su mayor difusión dentro de las técnicas separativas, y por ello los parámetros de evaluación son principalmente de carácter cromatográfico. No obstante la filosofía del test es aplicable a cualquier tipo de técnica analítica.

Como norma general una prueba de idoneidad del sistema contendrá como mínimo parámetros pertenecientes a dos categorías, por ejemplo precisión y resolución o precisión y limite de detección.

☆ **Precisión del test de idoneidad del sistema**

Se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos tras el análisis de una serie de replicados de una muestra.

La precisión es el parámetro de más amplia aplicación para la evaluación de la idoneidad del sistema. Aunque habitualmente se estudia sobre el área del pico cromatográfico, también puede evaluarse sobre la altura o el tiempo de retención. Este último permite dar una idea de la estabilidad del sistema en un momento determinado aunque será difícil utilizarlo como un referente entre días, porque sus cambios no tienen por qué afectar al resultado obtenido.

☆ **Parámetros cromatográficos**

→ **Factor de retención:**

El factor de capacidad, también definido como relación de distribución de masa o factor de capacidad, se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_M). El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de solutos en columnas cromatográficas; este factor determina la retención de un soluto.

→ **Número de platos teóricos**

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas. El cálculo del número de platos teóricos



se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico.

Otros cálculos se basan en la asimetría del pico (Foley, 1983) o en la extrapolación de éste a una campana de Gauss.

Los parámetros sobre los que se puede incidir para modificar el número de platos teóricos son la columna o soporte (longitud, calidad, tamaño de partícula) y las diversas condiciones cromatográficas definidas en el método (temperatura, flujo, fase móvil, etc.).

Este parámetro tiene especial interés en las pruebas de idoneidad del sistema donde existe un solo pico de interés dentro del cromatograma y en el estudio de trazas como complemento a la comprobación del límite de detección. En otros casos es más recomendable el estudio de la resolución.

→ Factor de asimetría o de coleo

Es la razón de las mitades de un pico cromatográfico a un 5 % de la altura total del pico. Este indica el grado de deformación o perfección de los picos.

Las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permiten una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva.

→ Factor de resolución

La resolución es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias.

☆ Límites de detección o cuantificación

Una prueba de idoneidad del sistema también puede ser útil para confirmar la consecución de un determinado límite de cuantificación o de detección, con el fin de comprobar la capacidad de cumplimiento con la función para el cual se ha establecido, por ejemplo para analizar bajos niveles de impurezas.

Para determinadas aplicaciones puede ser interesante el control de otros parámetros similares como el ruido de fondo y la deriva de la línea de base, por ejemplo para controlar la estabilidad de la temperatura, la mezcla de fase móvil o la estabilidad de algunos detectores.

Por la naturaleza de este parámetro su aplicación será de elección en cualquier método (cromatográfico o no) utilizado para la determinación de impurezas.



- **INCERTIDUMBRE**

- ☆ **Definición de la Incertidumbre:**

La definición del término incertidumbre (de la medición) usada en este protocolo y tomada de la versión corriente, adoptada por el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales de Metrología es:

Un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al “mesurando”.

El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo dado de éste), o el ancho de un intervalo de seguridad.

La incertidumbre de la medición comprende, en general, varios componentes. Algunos de estos componentes pueden ser evaluados según la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden ser caracterizados por las desviaciones estándares. Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por las desviaciones estándares, son evaluados por las distribuciones de probabilidad asumida basadas en la experiencia u otros datos. La Guía ISO se refiere a estos casos diferentes como las estimaciones Tipo A y Tipo B, respectivamente.

La definición de incertidumbre antes mencionada se enfoca en el rango de valores que el analizador cree que podría, razonablemente, ser atribuido al mesurando.

En el uso general, la palabra incertidumbre se relaciona al concepto general de duda. En esta guía, la palabra incertidumbre, sin adjetivos, se refiere o al parámetro asociado con la definición mencionada, o al conocimiento limitado acerca de un valor particular. La incertidumbre de la medición no implica una duda acerca de la validación de una medición; por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica confianza creciente en la validación del resultado de una medición.

- ☆ **Fuentes de la Incertidumbre:**

En la práctica la incertidumbre del resultado puede provenir de diferentes fuentes posibles, como por ejemplo: definición incompleta, muestreo, efectos de la matriz e interferencias, condiciones ambientales, incertidumbres de las masas y equipo volumétrico, valores de referencia, aproximaciones y suposiciones incorporadas en el método de medición y procedimiento, y variación al azar.

- ☆ **Componentes de la Incertidumbre:**

Para estimar la incertidumbre total, puede ser necesario tomar cada fuente de la incertidumbre y tratarla separadamente para obtener la contribución de dicha fuente. Cada una de las contribuciones separadas de la incertidumbre es conocida como un



componente de la incertidumbre. Cuando un componente es expresado como una desviación del patrón, este componente de la incertidumbre es conocido como una incertidumbre patrón. Si hay correlación entre algunos componentes, entonces esto tiene que ser tomado en cuenta para determinar la covarianza. Sin embargo, es posible evaluar, a menudo, el efecto combinado de varios componentes. Esto puede reducir el esfuerzo general implicado y, donde los componentes cuya contribución es evaluada en conjunto están correlacionados, posiblemente no haya una necesidad adicional para tomar en cuenta la correlación.

Para un resultado de la medición y de la incertidumbre total, calificada de incertidumbre estándar combinada y denotada $u_c(y)$, es una desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la variación total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre, de cualquier modo evaluados, usando la ley de propagación de la incertidumbre.

Para la mayor parte de los propósitos en química analítica una incertidumbre expandida U , debería ser usada. La incertidumbre expandida provee un intervalo dentro del cual el valor del mesurando permanece con un nivel más alto de seguridad. La U es obtenida al multiplicar $u_c(y)$, la incertidumbre estándar combinada, por un factor de cobertura k . La escogencia del factor k está basada en el nivel de seguridad deseado. Para un nivel aproximado de seguridad de 95%, k es 2.

EL factor de cobertura k debería ser expresado siempre por lo que la incertidumbre estándar combinada de la cantidad medida puede ser recuperada para el uso al calcular la incertidumbre estándar combinada de otros resultados de medición que tal vez pueden dependan de esta cantidad.

★ **Error e Incertidumbre:** El error es definido como la diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero de la medición. Como tal, el error es un valor único.

El error es un concepto idealizado y los errores no pueden ser conocidos exactamente. La incertidumbre, por otro lado, toma la forma de un rango y, si es estimada para un procedimiento analítico y un tipo de muestra definida puede aplicarse a todas las determinaciones así descritas. En general, el valor de la incertidumbre no puede ser usado para corregir un resultado de la medición.

Un error es considerado que tiene dos componentes, a saber, un componente casual y un componente sistemático.

El error casual típicamente aparece de variaciones impredecibles de cantidades de influencias. Estos efectos casuales causan variaciones en las observaciones repetidas del mesurando. El error casual de un resultado analítico no puede ser compensado, pero éste puede ser reducido usualmente al incrementar el número de observaciones.



La desviación estándar experimental de la media aritmética o el promedio de una serie de observaciones no es el error casual de la media, aunque así se diga en algunas publicaciones sobre incertidumbre. Esto es, por el contrario, una medición de la incertidumbre de la media debido a algunos efectos casuales. El valor exacto del error casual en la media que se deriva de estos efectos no puede ser conocido.

El error sistemático es definido como un componente del error el cual, en el curso de varios análisis de lo mismo mesurando, permanece constante o varía de una forma predecible. Este es independiente del número de mediciones hechas y no puede, por consiguiente, ser reducido al incrementar el número de análisis bajo condiciones constantes de medición.

Otro tipo de error es un error falso o equivocación. Los errores de este tipo invalidan una medición y típicamente aparecen por fallas humanas o por mal funcionamiento del instrumento.

☆ **Medición analítica e incertidumbre**

* **Método de Validación**

En la práctica, la conveniencia del propósito de los métodos analíticos aplicados a la prueba de rutina es más comúnmente evaluada a través de estudios de validación del método

Los estudios de validación del método dependen de la determinación de los parámetros del rendimiento total del método.

Los estudios de validación de los métodos analíticos cuantitativos, típicamente determinan algunos o todos los parámetros siguientes:

- * **Precisión:** Las mediciones de precisión principal incluyen la repetición de la desviación estándar SR, la reproducibilidad de la desviación estándar SR, (ISO 3534 -1), y la precisión intermedia algunas veces denotada Szi, con i denotando el número de factores variados (ISO 5725-3:1994). La repetición de Sr indica la variabilidad observada dentro de un laboratorio, en período de tiempo corto, usando un solo operador, una parte del equipo, etc.
- * **Sesgo:** El sesgo de un método analítico es usualmente determinado por el estudio de los materiales de referencia pertinentes o por los estudios frustrados. La determinación del sesgo total general con respecto a los valores de referencia apropiados es importante para establecer la trazabilidad a patrones conocidos. El sesgo puede ser expresado como una recuperación analítica (valor observado dividido por el valor supuesto).



* **Linealidad:** La linealidad es una propiedad importante de los métodos usada para hacer mediciones del rango de las concentraciones. La linealidad de la respuesta a patrones puros y a muestras realistas puede ser determinada. La linealidad no es generalmente cuantificable, pero es chequeada por inspección o uso de pruebas importantes para la no-linealidad. La importancia de la no-linealidad es usualmente corregida por el uso de las funciones de la calibración no-lineal o eliminada por escogencia de un rango de operación más restringido. Algunas de las desviaciones que quedaron de la linealidad son consideradas normalmente suficientes para los estimados de precisión total que cubren diferentes concentraciones, o dentro de cualquiera de las incertidumbres asociadas con la calibración.

* **Límite de detección:** Durante la validación del método, el límite de detección es normalmente determinado sólo para establecer el final más bajo del rango de operación práctico de un método. Aunque las incertidumbres cerca del límite de detección pueden requerir de una consideración cuidadosa y un tratamiento especial

(Apéndice F), el límite de detección, no obstante determinado, no es de una relevancia directa para la estimación de la incertidumbre.

* **Selectividad / especificidad:** Los estudios típicos de selectividad investigan los efectos de interferencias probables, usualmente al agregar el interferente potencial tanto para las muestras en blanco como para las muestras reforzadas y observando las respuesta. Los resultados son usados normalmente para demostrar que los efectos prácticos no son importantes. Sin embargo, ya que los estudios miden los cambios en las respuestas directamente, es posible usar los datos para estimar la incertidumbre asociada con interferencias potenciales, previo conocimiento del rango de las concentraciones del interferente.

• TRAZABILIDAD

La trazabilidad es formalmente definida como: “La propiedad de los resultados de una medición o el valor de un patrón por medio del cual, la trazabilidad puede ser relacionada a referencias establecidas, usualmente a patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena inrrompible de comparaciones con incertidumbres expresadas”.

La trazabilidad del resultado del procedimiento analítico completo debería ser establecida por una combinación de los siguientes procedimientos:



- 1) Uso de patrones trazables para calibrar el equipo de medición;
- 2) Uso o comparación de los resultados a un método principal;
- 3) Uso de un RM de una sustancia pura;
- 4) Uso apropiado de un Material de Referencia Certificado (CRM) de la matriz apropiada;
- 5) Uso de un procedimiento fielmente definido y aceptado.

Cada procedimiento es discutido, por separado, a continuación:

- **Calibración del equipo de medición:**

La etapa de cuantificación del proceso analítico es algunas veces calibrada usando un material de referencia de una sustancia pura, cuyo valor es trazable al SI. Esta práctica provee la trazabilidad de los resultados al SI para esta parte del procedimiento. No obstante, es también necesario establecer la trazabilidad a los resultados de operaciones anteriores a la etapa de la cuantificación, como por ejemplo, extracción, y limpieza de muestra, usando procedimientos adicionales.

- **Mediciones Usando Métodos Principales**

Un método principal de medición es un método que tiene la más altas cualidades metrológicas, cuya operación está completamente descrita y entendida en términos de unidades del SI y cuyos resultados son aceptados sin referencia a un patrón de la misma cantidad”.

La trazabilidad a los resultados de un método principal es factible por comparación directa de los resultados de la medición: el método principal y la prueba o el método principal y el método de calibración.

- **Mediciones usando un Material de Referencia (RM) de una sustancia pura**

La trazabilidad puede ser demostrada con la medición de una muestra compuesta o de una muestra que contenga una cantidad conocida de una sustancia pura del RM. Esto puede ser alcanzado, por eliminación o por sumas de patrones. No obstante, siempre es necesario evaluar la diferencia en respuesta al sistema de medición del patrón utilizado y de la muestra a prueba.

- **Medición de un Material de Referencia Certificado (CRM)**

La trazabilidad puede ser demostrada a través de la comparación de los resultados de la medición de un CRM de la matriz certificada con los valores certificados. Este procedimiento puede reducir la incertidumbre comparada con el uso de una sustancia pura del RM donde hay un CRM disponible de la matriz apropiada. Si el valor del CRM es trazable al SI, entonces estas mediciones proporcionan trazabilidad a las unidades del SI y la evaluación de la incertidumbre al utilizar materiales de referencia es discutida en el punto 7.5. Sin embargo, igualmente en este caso, la incertidumbre en el resultado puede ser



inaceptable grande o igualmente incuantificable, particularmente si no hay una buena combinación entre la composición de la muestra y el material de referencia.

- **Medición usando un procedimiento aceptado**

Este procedimiento será normalmente definido en términos de parámetros de entrada; por ejemplo, una serie específica de tiempos de extracción, tamaños de las partículas, etc. Los resultados de aplicar tal procedimiento son considerados trazables cuando los valores de estos parámetros de entrada son trazables a las referencias expresadas de la manera usual.

- **El proceso de estimación de la medición de la incertidumbre**

La estimación de la incertidumbre es simple al principio, particularmente lo relacionado con el uso de los datos de los estudios de validación del método y el uso de los principios formales de la propagación de la incertidumbre. Los pasos comprendidos son:

Paso 1. Especificar el mesurando

Escriba una declaración clara de qué es lo que está siendo medido, incluyendo la relación entre el mesurando y las cantidades utilizadas, (por ejemplo, cantidades medidas, constantes, valores del patrón de calibración, etc) de las que depende el mesurando.

Paso 2. Identificar las fuentes de la incertidumbre

Haga una lista de las posibles fuentes de la incertidumbre. Esta incluirá las fuentes que contribuyen con la incertidumbre de los parámetros en la relación especificada en el Paso 1.

Paso 3. Cuantificar los componentes de la incertidumbre

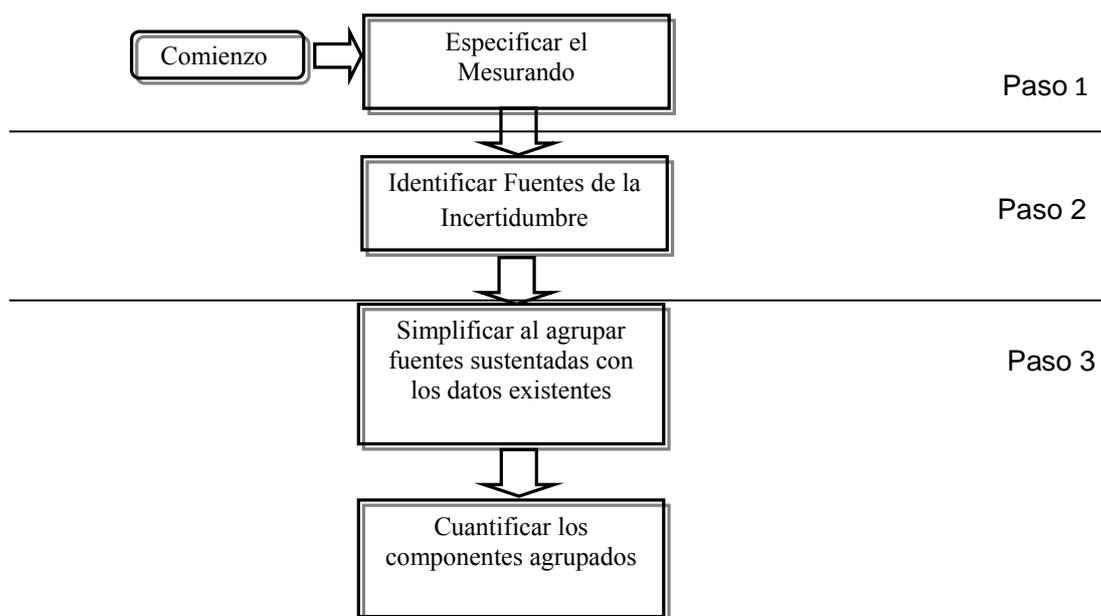
Es medir o estimar el tamaño de los componentes de la incertidumbre asociados con cada fuente potencial de la incertidumbre identificada. Es a menudo posible estimar o determinar una sola contribución de la incertidumbre asociada con un número de fuentes separadas. Es también importante considerar si los datos disponible abarca suficientemente a todas las fuentes de la incertidumbre, y planear experimentos adicionales y estudios cuidadosamente para asegurar que todas las fuentes de la incertidumbre son adecuadamente tomadas en cuenta.

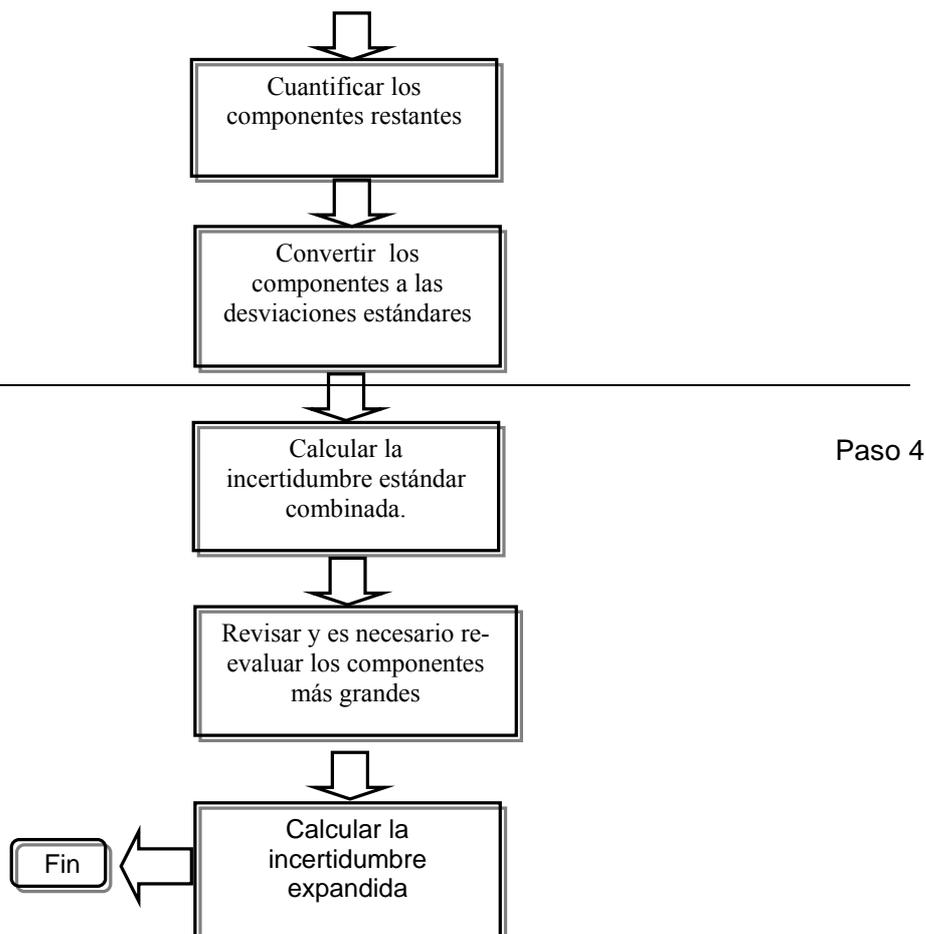
Paso 4. Calcular la incertidumbre combinada.



Los datos obtenidos en el Paso 3 consistirá en un número de contribuciones cuantificadas de la incertidumbre total, sea asociada con fuentes individuales o con efectos combinados de diferentes fuentes. Las contribuciones tienen que ser expresadas como desviaciones estándares y combinadas de acuerdo a las reglas apropiadas para dar una incertidumbre estándar combinada. El factor de cobertura apropiado debería ser aplicado para dar una incertidumbre expandida.^{4,5,6,7,9,10,21}

La siguiente figura muestra el proceso esquemáticamente:





DISEÑO METODOLÓGICO

- **Población**

La población en estudio fueron 50 frascos de jarabe de **Acetaminofén** cuya concentración es de 100 mg/5 mL, el número de lote de dichos frascos es 4040108.

- **Muestra**

Se tomó 8 frascos al azar correspondiente al 16% de nuestra población total en estudio.

- **Alcance**

Cuantificación de acetaminofén en las distintas presentaciones de soluciones orales de 100 mg/5 mL a 120-160 mg/5 mL por Cromatografía Líquida de Alta Precisión

- **Materiales**



Los materiales siguientes se utilizan para la validación de la metodología analítica en la cuantificación de Acetaminofén en solución oral:

Nombre	Descripción
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC o CLAR)	Cromatógrafo líquido: VARIAN HPLC. Con bomba cuaternaria y cuatro recipientes para solventes; automuestreador (inyección automática); Bandeja de viales, horno para la columna, lámpara de deuterio y detector espectrofotométrico con series de diodos.
Columna cromatográfica	VARIAN 5 μm de 3.9-mm \times 30 cm empacada con un material L1 C18 (octaldecilo siloxano).
Balanza Analítica	Marca A&D; modelo GH-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 5 a 40°C y %Humedad Relativa: \leq 85%.
Balanza Analítica	Marca: A&D; Modelo: HM-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 5 a 40°C y Humedad Relativa: \leq 85%.
Ultrasonic cleaner	Marca: Brasonic; Modelo: B3-R. Baño ultrasónico



	para clarificar soluciones.
Bomba de succión	Para filtrar y desgasificar solventes o la fase móvil.
Pipetas automáticas	Rango de Medición: 100 a 5000 µL; Marca: Eppendox; División Escala: ±0.015mL.
Pipetas volumétricas	Pipetas volumétricas clase A de 1 y 10 ml marca Pyrex.
Filtros	Filtro de papel marca VARIAM 0.45µm y tamaño de poro 47 mm para filtrar las soluciones muestras.
Espátulas	Espátula para pesar los estándares y los reactivos a usar.
Balones	Balones Pyrex clase A de 1000, 500, 250, 200, 100, 50 y 25 ml.
Papel Filtro	Marca: Thomas Scientific; 12.5cm
Vasos de Precipitación	Beaker Pyrex de 250, 100, 25 y 10 ml.
Probetas	Probetas de 1000, 500 y 25 ml.
Jeringa de plástico	Para la toma de muestra
Viales	Marca VARIAM Para cargar la muestra a ser cromatografiada.
Espátulas	Espátula para pesar los estándares y los reactivos a usar.
Destilador de Agua	Destilador de Agua potable Marca Eppendox

- **Reactivos y patrones**

Los reactivos siguientes se utilizaran durante la ejecución de esta validación:

Nombre	Grado	Descripción	Formula química
Metanol	Grado HPLC 100% puro	Marca: MERCK; densidad: 0.8 g/ml	CH ₄ O
Agua	Destilada	Agua destilada densidad 1 g/ml	H ₂ O
Hidróxido de Sodio	Reactivo 98.2%	Solido hidroscopio	NaOH
Acido Clorhídrico	Reactivo 37 % de pureza	Liquido viscoso muy corrosivo	HCl
Peróxido de hidrogeno	Reactivo 30%	Marca MERCK	H ₂ O ₂
Acido acético glacial	100 % grado HPLC	Marca MERCK	C ₂ O ₂ H ₄
Acetaminofén	Estándar primario USP potencia 100%	Patrón primario 100% puro	C ₈ H ₉ NO ₂



Acetaminofén	Estándar secundario	Estándar secundario que será cuantificado con un patrón primario	$C_8H_9NO_2$
--------------	---------------------	--	--------------

☆ **Procedimiento analítico para la cuantificación de Acetaminofén en solución oral**

• **Condiciones Cromatográficas:**

Columna cromatográfica	VARIAN 5 μ m de 3.9-mm \times 30 cm empacada con un material L1 C18 (octaldecilo siloxano).
Pre-columna	Si aplica, se utiliza el mismo material correspondiente a la columna.
Fase móvil	Ácido acético glacial $5.6 \cdot 10^{-3}$ M: Metanol en una proporción 70:30.
Detector	Espectrofotométrico en la región ultravioleta a una longitud de onda de $\lambda=254$ nm.
Velocidad de flujo	1.5 ml/min.
Temperatura de la columna	30 ± 1 °C.
Volumen de inyección	20 μ L.
Tiempo de inyección	6 minutos
Tiempo de retención	3 ± 0.2 minutos.
Concentración del estándar	30 μ g/mL

• **Preparación de la fase móvil:**

Se prepara una mezcla filtrada y desgasificada de ácido acético glacial $5.6 \cdot 10^{-3}$ M y metanol en una proporción de 70:30 en 1000 ml; donde se miden 700 ml de ácido acético glacial filtrado y desgasificado en balones de 500 y 200 ml; por otra parte se miden 300 ml de metanol en volumétricos de 200 y 100 ml, los dos solventes se mezclan y se protegen del contacto del oxígeno atmosférico.

La fase móvil preparada anteriormente se utiliza para la preparación del estándar y la muestra de Acetaminofén. La fase móvil que servirá como eluyente de los solutos de interés (Acetaminofén muestra y estándar), se bombearán de manera binaria en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución del LCCM; en el cual en el vaso A estará el ácido acético glacial acuoso filtrado y desgasificado de forma pura y en el vaso B se encontrará el metanol filtrado y desgasificado.

• **Preparación del estándar de Acetaminofén:**



Pesar exactamente 25 mg de estándar interno de Acetaminofén y transferir a un matraz volumétrico clase A de 100 mL, disolver con 25 mL de fase móvil. Tapar y sonicar durante 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y aforar con fase móvil. Tomar de esta solución madre 3 ml con ayuda de una pipeta automática de 5 ml y llevar a un matraz volumétrico clase A de 25 ml, mezclar con 15 ml de fase móvil y enrasar con fase móvil. Luego filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m, descartar los primeros mL. Tomar una cantidad suficiente de filtrado y llenar viales (Concentración estándar: 30 mcg/mL).

- **Preparación del estándar USP de Acetaminofén:**

Se prosigue de la misma manera tal como se realiza la preparación del estándar interno de acetaminofén.

- **Preparación de la Muestra:**

Agitar la solución oral de acetaminofén antes de la toma de la alícuota. Tomar 5 ml de la misma solución con ayuda de una pipeta volumétrica clase A de 5 ml y transvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico clase A de 200 ml; agregar 100 ml de fase móvil y mezclar durante un minuto, aforar con fase móvil. Tomar de la solución anterior 1.5 ml con ayuda de una pipeta automática de 5 ml y llevar a un matraz volumétrico clase A de 25 ml y agregar 10 ml de fase móvil mezclar y enrasar con fase móvil. Luego filtrar con un filtro de membrana 0,45 μ m. Descartar los primeros mL. Tomar una cantidad suficiente y llenar viales (Concentración muestra: 30 mcg/mL).

Antes de empezar con la estandarización de la metodología de acetaminofén solución oral y con el trabajo de validación, se valoró un estándar secundario (working estándar), pues se necesita mucha cantidad de fármaco para estas actividades, y el estándar primario USP tiene un valor muy alto. La valoración del estándar secundario se realizó según la metodología propuesta en esta monografía.

- **Estandarización del patrón interno de acetaminofén contra estándar primario USP de acetaminofén:**

El método de estandarización del estándar secundario de acetaminofén se cuantificó de acuerdo a la metodología propuesta en esta monografía, en el cual el porcentaje de recuperado de materia prima patrón secundario de acetaminofén fue de 99.175%.

- **Procedimiento experimental para determinar los parámetros de la validación**

- **Linealidad**



→ **Determinación experimental de la linealidad**

Para la determinación experimental de la linealidad se prepararon 11 soluciones estándares de Acetaminofén (ER) a niveles de concentración de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% y 150% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo. Cada solución, estándar, se inyecta al Cromatógrafo tres veces, analizándose de acuerdo a las condiciones establecidas en el método de análisis. Inyectando desde la concentración más baja hasta la más alta. Se grafica la concentración para cada solución estándar versus la respuesta obtenida (Áreas promedio de cada serie).

Para la determinación de la linealidad del método; se sigue el mismo procedimiento, pero ahora trabajando con la matriz de Acetaminofén (jarabe).

→ **Datos a reportar:**

- Realizar el análisis de la curva de regresión.
- Realizar la grafica de residuales.
- Verificar la validez del modelo a través del Análisis de Varianza (ANOVA).

→ **Criterio de aceptación:**

- Se determinara la homoscedasticidad para determinar el tipo de regresión a utilizar.
- El porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de respuesta deben de ser menor al 2 % para el sistema instrumental y del 3 % para la linealidad del método.
- El coeficiente de regresión tanto para el sistema instrumental como para el método debe de ser mayor igual a 0.999.
- El coeficiente de determinación tanto para el sistema instrumental como para el método (r^2) debe ser mayor o igual de 0.998.
- Existencia de un intercepto igual a cero $t_{cal} < t_{crit}$.
- Existencia de una pendiente distinta de cero $t_{cal} > t_{crit}$.
- Debe existir homoscedasticidad en los residuales.



- El F_1 calculado para la regresión debe ser mayor al de F_1 crítico.

- **Exactitud**

- ➔ **Determinación experimental de la exactitud (recuperación) para el método de ensayo propuesto.**

La exactitud de método analítico se evaluará por medio de la comparación de la curva normal estándar y la curva de calibración normal de la muestra, que abarque el porcentaje del rango especificado (50, 70, 100, 130 y 150 % respectivamente).

Cada muestra se inyecta al Cromatógrafo tres veces, analizándose de acuerdo a la condiciones establecidas en el método de análisis. Inyectando la muestras desde la concentración más baja hasta la más alta.

Se grafica la concentración de la curva normal en función de las áreas obtenidas tanto para la muestra y estándar de Acetaminofén. Se confronta las varianzas de la curva normal estándar y muestra a través de la prueba Fisher. Se comparan las pendientes de la curva de regresión normal del estándar y muestra respectivamente, para establecer si existe efecto de matriz, a través de la t-Student. Se estima el porcentaje de recobro.

- ➔ **Criterios de Aceptación:**

- El porcentaje de recobro debe estar entre $100 \pm 2.0\%$.
- El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.9998.
- El t_{cal} debe de ser menor al t_{crit} (No hay efecto matriz).
- Si el porcentaje de recobrado es menor del 99% existe un efecto depresor; pero si el porcentaje de recobro es mayor del 101% existe un efecto amplificador en la señal de la respuesta.



- **Precisión**

- 1. Repetibilidad del sistema instrumental:**

Se prepara una solución estándar, a la concentración nominal (30 µg/ml de Acetaminofén), por cuatro días, por un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Esta solución se analizara de acuerdo a lo establecido en el método de análisis y haciendo 5 inyecciones al Cromatógrafo. Se adquirirán las áreas de cada unos de los picos para cada cromatograma obtenido y tabular los resultados.

Valores a reportar y criterios de aceptación:

- El %RSD de la Repetibilidad del sistema instrumental no debe ser superior al 2.0%.

- 2. Repetibilidad del método:**

3. Se prepara una solución muestra, a la concentración nominal (30 µg/ml de Acetaminofén), por cuatro días, por un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Esta solución se analizara de acuerdo a lo establecido en el método de análisis y haciendo 5 inyecciones al Cromatógrafo. Se adquirirán las áreas de cada unos de los picos para cada cromatograma obtenido y tabular los resultados.

Valores a reportar y criterios de aceptación:

- El %RSD para la regresión no debe de ser mayor del 3%.

- 4. Precisión intermedia del sistema y método:**

Se prepara una solución estándar, a la concentración nominal (30 µg/ml de Acetaminofén (para la precisión intermedia del sistema)), y una solución muestra (precisión intermedia del método) por cuatro días, por un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Esta solución se analizara de acuerdo a lo establecido en el método de análisis y haciendo 5 inyecciones al Cromatógrafo. Se



adquirirán las áreas de cada uno de los picos para cada cromatograma obtenido y tabular los resultados.

→ **Valores a reportar y criterios de aceptación**

- Se comprobara si existe homogeneidad de las varianzas mediante el Test de Hartley.
- Se realizara un análisis de Varianza (ANOVA) para obtener la precisión intermedia del método.
- El %RSD generado durante los 4 días no debe ser mayor al 3.0%.

- **Selectividad**

Determinación experimental de la Selectividad

- **Para materia prima:**

Para estudiar la selectividad del método se analizaran muestras y estándares de Acetaminofén a diferentes condiciones de estrés:

1. Hidrólisis básica: 25mg+10ml de solución de NaOH 1N.
2. Hidrólisis acida: 25 mg+10ml de solución de HCl 1N.
3. Oxidación: 25mg+10ml de H₂O₂ 3%.

El tiempo de exposición de la muestra será de dos horas. Para cada muestra se registrara el cromatograma y se compara con el de la solución de referencia de Acetaminofén.

Criterios de aceptación:

- ✓ Se comprueba que no haya interferencia en la zona de elución del Acetaminofén (tiempo de retención).



- **Robustez**

Determinación experimental de la robustez

La robustez se verificara mediante la realización del análisis factorial 2^3 , los factores de variación son el longitud de onda, flujo de la fase móvil y la proporción de solvente orgánico usado para la elución del soluto.

El factor A de cambio es la longitud de onda en la región UV-Vis, que según el método analítico deberá ser de 254 nm. En la siguiente tabla se indica el cambio de este factor, que será de 252 nm y 256 nm. El factor de cambio B corresponde al porcentaje orgánico en la fase móvil (metanol) (70:30±2%) y el factor C es la velocidad de flujo de la fase móvil, que en condiciones normales es de 1.5 mL por minuto, los factores de cambio serán de 1.5 mL/min \pm 0.2 mL. De esta forma los experimentos a realizar para la determinación de la robustez se presentan en la siguiente tabla.

Experimentos	Caudal (ml/min) A	Proporción (H ₂ O en Ac:MeOH) B	Longitud de Onda
1	1.4	28	252
2	1.6	28	252
3	1.4	32	252
4	1.6	32	252
5	1.4	28	256
6	1.6	28	256
7	1.4	32	256
8	1.6	32	256

Tabla. Estudio de la robustez

Preparar una solución de estándar de Acetaminofén a la concentración nominal que establece el método de ensayo en fase móvil usando la proporción de metanol sugerido en la tabla anterior.

Inyectar estas soluciones tres veces al Cromatógrafo en la condiciones establecido en la tabla anterior. Obtener el área promedio y las desviaciones estándares de los efectos producidos al variar las condiciones de análisis para cada experimento.

Criterios

1. Ninguno de los factores debe de superar el intervalo de ($\pm 2S$), por lo que su variación no influye en la capacidad del método analítico.

- **Limite de detección**



✓ **Determinación experimental del límite de detección.**

Para estimar el límite de detección, del método de ensayo de Acetaminofén, se determinara a través de la desviación estándar residual (S_r) y la pendiente de la curva de calibración estándar.

• **Límite de cuantificación**

Determinación experimental del límite de cuantificación

Para estimar el límite de de cuantificación del método de ensayo de Acetaminofén se determinara a través de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración estándar.

• **Idoneidad del sistema cromatográfico**

Determinación experimental de la idoneidad del sistema

Para la determinación de la idoneidad del sistema cromatográfico se prepararan tres soluciones estándares de Acetaminofén a la concentración nominal (100%). Las muestras preparadas según el método de análisis se inyectan en el cromatógrafo por quintuplicado; se registran sus respectivas áreas y se calcula el promedio de los parámetros cromatográficos de interés, a si como también el %RSD de las 15 inyecciones.



Para determinar la idoneidad del sistema cromatográfico se establecerá, mediante el programa Galaxie, los valores, de el número de platos teóricos, asimetría de los picos, factor de retención y área, serán aportados por el sistema instrumental.

Criterio de aceptación

Los siguientes criterios mínimos se sugieren:

❖ **Parámetros cromatográficos:**

- ✓ Numero de platos teóricos: $N > 1000$.
- ✓ Asimetría de los picos: A no mayor de 2.
- ✓ Factor de retención: Entre 5 y 10.

❖ **Precisión instrumental:**

El porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), no es mayor del 2%.

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

1. Caracterización del estándar de referencia Interno Acetaminofén a partir del estándar USP de Acetaminofén.

En la tabla 1. Se muestran las áreas de los picos cromatograficos del estándar interno Acetaminofén y Estándar de referencia USP de Acetaminofén.

Tabla 1. Área de los Picos Cromatograficos de Estándar USP y Estándar Interno

Numero de Inyecciones	Conc en mcg/ml	Área Estándar USP	Área Estándar Interno	Conc en mcg/ml obtenida del ERI	% Obtenido del ERI
1	30	25.10	24.60	29.40	98.01
2	30	25.00	24.50	29.40	98.00



3	30	25.00	24.50	29.40	98.00
4	30	25.10	24.50	29.28	97.61
5	30	25.10	24.60	29.40	98.01
6	30	25.10	24.90	29.76	99.20
7	30	25.09	24.70	29.53	98.45
8	30	25.10	24.70	29.52	98.41
9	30	25.00	24.60	29.52	98.40
10	30	25.19	24.60	29.30	97.66

Comprobaremos si existen datos aberrantes en las áreas obtenidas del estándar de referencia USP y estándar interno de Acetaminofén a través de la prueba de Huber; posteriormente compararemos las medias de ambas soluciones mediante la prueba de medias apareadas.

Resultados

Al determinar, si existían datos anómalos mediante el test de Huber no se encontró datos anómalos en las áreas medidas del estándar de referencia interno, ya que el límite calculado según lo establecido por el test de Huber para el estándar de referencia interno es de 24.25-24.95, encontrándose todos los valores de las áreas medidas para el estándar de referencia interno dentro del límite establecido. Mientras que si se encontró un dato anómalo para el área del estándar de referencia USP de Acetaminofén en cual es de 25.19 ya que dicho dato se encuentra fuera del límite establecido que corresponde a 25.08-25.12. Se comprobó si el dato de 25.19 se rechaza o se acepta mediante el test estadístico de Grubbs, el cual resultado satisfactorio al evidenciar un $G_{\text{calculado}}$ de 1.84, el cual es menor al G_{critico} de 2.29 con un α de 0.05 el cual nos sugiere que el dato se retenga con un nivel de confianza del 97.5%.

Al aplicar el estadístico t, de las medias apareadas, para demostrar si existían diferencia significativa entre la media de ambos grupos de resultados se demostró que si existía diferencia entre ambas media ya que el t calculado fue mayor al t de tabla ($t_c = 12.41$, $t_{\text{tabla}} = 2.26$), siendo por lo tanto el contenido de Acetaminofén en el estándar de referencia interno diferente de la concentración en la solución de estándar de referencia USP de Acetaminofén por lo cual se rechaza la hipótesis nula planteada.



2. Estimación de la incertidumbre en el cálculo del Porcentaje de Acetaminofén en la muestra tomada del Jarabe.

2.1 Definición del mensurado.

El mensurado, es el porcentaje de principio activo encontrado en la muestra de Acetaminofén 100 mg/5 mL Jarabe.

2.2 Modelo Matemático.

El modelo matemático para el porcentaje de Acetaminofén en el Jarabe está dado por la expresión matemática presentada en la ecuación:

$$\%M = \frac{A_m * S * P * V_{tm} * V_{1m} * V_{3m} * V_{2s}}{A_s * D * V_t * V_{1s} * V_{3s} * V_{2m}} * 100$$

Donde:

$\%M$ = Es el Porcentaje de Acetaminofén presente en la muestra.

A_s y A_m = son las área de la muestra y el estándar respectivamente; a la longitud de onda especificada en el método.

W_s = Es la masa pesada en miligramos del estándar de acetaminofen.

P = Es la pureza del estándar de acetaminofen en porcentaje.

V_{tm} = Es la cantidad del volumen total de Acetaminofén declarado en el marbete del producto.

D = Es la dosificación total de Acetaminofén presente en la muestra en relación al volumen total declarado en el marbete.

V_t = Es el volumen tomado de la muestra de Acetaminofén equivalente a 100 mg de principio activo.

V_{2s} y V_{2m} = Son las alícuotas tomadas en la preparación de la solución estándar y muestra respectivamente.

V_{1s} y V_{1m} = Son los volúmenes correspondientes a la primera dilución del estándar y la muestra respectivamente.



V_{3m} y V_{2s} = Son los volúmenes correspondientes a la segunda dilución del estándar y la muestra respectivamente.

100 = Es una constante.

2.3 Identificación de los componentes de la incertidumbre

Los componentes que influyen en la incertidumbre para la estimación del porcentaje de Acetaminofén en la muestra tomada en el Jarabe se muestran en el diagrama causa efecto en la siguiente figura.

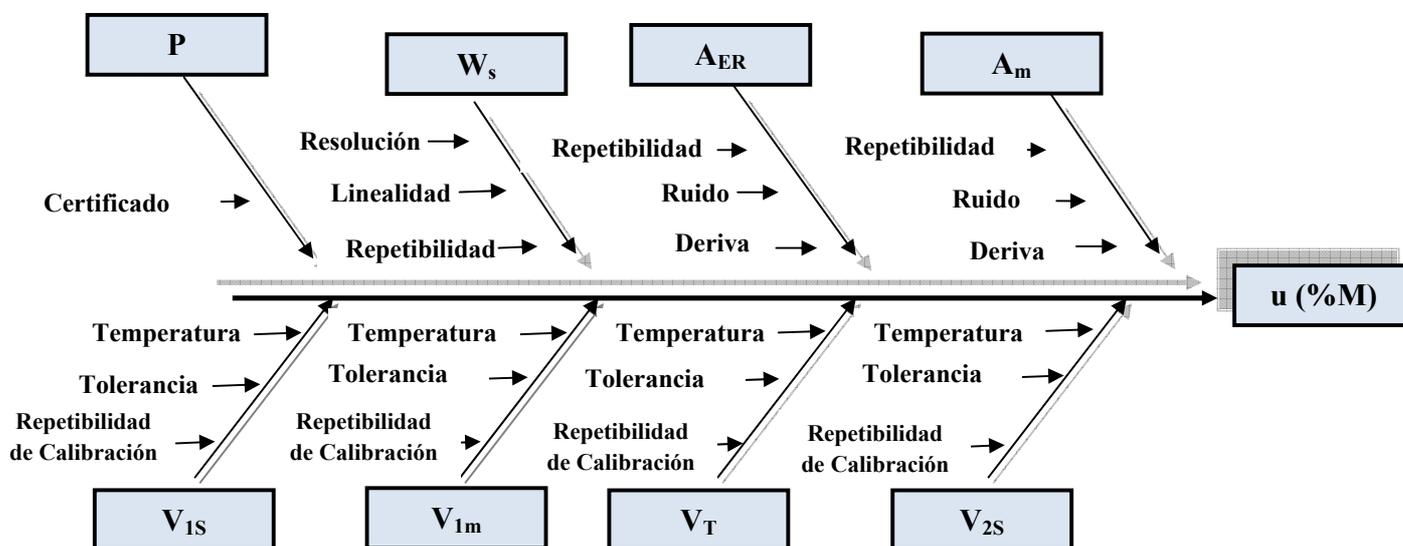


Diagrama causa-efecto. Componentes que influyen en la incertidumbre de la medición del porcentaje de Acetaminofén presente en la muestra tomada del Jarabe.

El diagrama de causa y efecto podemos deducir que los componentes a tomar en cuenta para estimar la incertidumbre en la determinación del Porcentaje de Pureza de Acetaminofén en la Muestra (Acetaminofén 100 mg/5 mL) son: la calibración de los materiales volumétricos en los cuales se prepararon las soluciones estándar y muestra, los instrumentos utilizados (calibración de la balanza, ruido y deriva del detector), de la masa de los estándares pesados, de la pureza del estándar de referencia USP, y de la Repetibilidad en las mediciones de las áreas de picos del material de referencia USP y muestra de Acetaminofén.



En la tabla 2 se muestra las ecuaciones para calcular los coeficientes de sensibilidad de los parámetros que influyen en el cálculo de la incertidumbre del Porcentaje de Pureza de Acetaminofén en la Muestra. Los coeficientes de sensibilidad se calcularon realizando la derivada parcial cada componente de la expresión matemática para el cálculo del Porcentaje de Pureza de Acetaminofén en la Muestra.

Tabla 2. Incertidumbre combinada para cada componente.

Ecuaciones Derivadas	Magnitud
$cA_m := \frac{100 W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	3,952612931798
<p>x</p> $cW := \frac{100 A_m P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	3,970636846767



$cP := \frac{100 A_m W_s V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	101,1112006
$cV_{tm} := \frac{100 A_m W_s P V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	0,82721601
$cV_m := \frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	0,496329606
$cV_{3m} := \frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	3,970636847
$cV_{2s} := \frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m}}{A_s D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	33,08864039

$cA_s := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s^2 D V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	-3,99653439
$cD := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D^2 V_t V_s V_{3s} V_{2m}}$	-0,0413608
$cV_t := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t^2 V_s V_{3s} V_{2m}}$	-19,85318423
	-0,992659212

Valid $cV_s := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s^2 V_{3s} V_{2m}}$

ción de Acetaminofén en Jarabe por HPLC



$cV_{3s} := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s}^2 V_{2m}}$	-3,970636847
$cV_{2m} := -\frac{100 A_m W_s P V_{tm} V_m V_{3m} V_{2s}}{A_s D V_t V_s V_{3s}^2 V_{2m}^2}$	-66,17728078

En la tabla 3, se resumen todos los parámetros que intervienen en la evaluación de la incertidumbre en el cálculo del porcentaje de pureza de Acetaminofén en la muestra. En esta tabla se muestran las variables (xi) del modelo matemático, el valor correspondiente, la incertidumbre (u_{xi}), los coeficientes de sensibilidad de cada variable (C_{xi}), calculados a partir de la derivada parcial del %M con respecto a x_i, el producto de C_{xi} y u_{xi}, y el índice de contribución a la incertidumbre (ind%).

Tabla 3. Balance de la incertidumbre en la medición del Porcentaje de Pureza de Acetaminofén en la Muestra (Acetaminofén Jarabe 100 mg/5 mL).

Parámetro (x _i)	Valor (x _i)	u _{xi}	C _i	C _{xi} u _{xi}	(C _{iu}) ²	ind%
<i>A_m</i>	25.114	0,09553489	3,952612931798	0,377612	0,1425911	16,97228906
<i>W_s</i>	25	4,5642E-05	3,970636846767	0,000181	3,284E-08	3,90929E-06
<i>P</i>	0.98175	0,00057735	101,1112006	0,058377	0,0034078	0,405625033
<i>V_{tm}</i>	120	0,0062	0,82721601	0,005129	2,63E-05	0,003130899
<i>V_{lm}</i>	200	0,0592	0,496329606	0,029383	0,0008633	0,102761788



V3m	25	0,0178	3,970636847	0,070677	0,0049953	0,594577152
V2s	3	0,0100	33,08864039	0,330886	0,1094858	13,03183941
As	24.838	0,097833332	-3,99653439	-0,39099	0,1528765	18,19652992
D	2400	4,5642E-05	-0,0413608	-1,9E-06	3,564E-12	4,24185E-10
Vt	5	0,0062	-19,85318423	-0,12309	0,0151511	1,803398066
VI_s	100	0,0466	-0,992659212	-0,04626	0,0021398	0,254694791
V3s	25	0,0178	-3,970636847	-0,07068	0,0049953	0,594577152
V2m	1.5	0,0096	-66,17728078	-0,6353	0,4036085	48,04057282
					SUMA	100

La siguiente figura se muestra el diagrama de Pareto donde se puede observar que los parámetros V_{2m} y A_s son los que contribuyen más a la incertidumbre en la medición del %M.

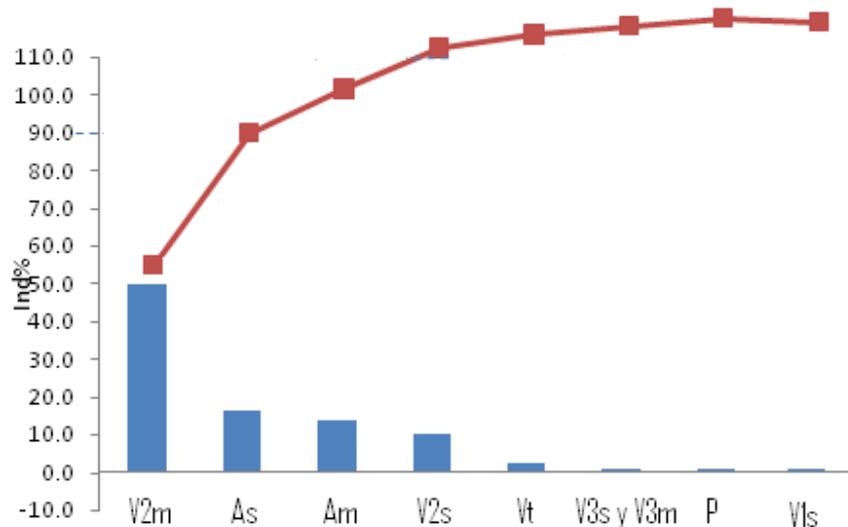


Diagrama de Pareto. Contribución de los componentes a la incertidumbre del %M.

Estimación de la incertidumbre combinada en el cálculo de %M se obtiene mediante la ecuación:

$$u_{\%M} = \sqrt{cA_m^2 uA_m^2 + cW_s^2 u_s^2 + cP^2 uP^2 + cV_{2m}^2 uV_{2m}^2 + cV_{1m}^2 uV_{1m}^2 + cV_{2m}^2 uV_{2m}^2 + cV_{2s}^2 uV_{2s}^2 + cA_s^2 uA_s^2 + cD^2 uD^2 + cV_t^2 uV_t^2 + cV_{3s}^2 uV_{3s}^2 - cV_{3s}^2 uV_{3s}^2 + cV_{3s}^2 uV_{3s}^2 + cV_{2m}^2 uV_{2m}^2}$$

Ecuación para estimar la incertidumbre combinada.

Si sustituimos los datos de la columna 6 y 3 de la tabla 5, en la ecuación para estimar la incertidumbre combinada se tiene:

$$u_{c\%M} = 0.916592$$

Selección del intervalo de confianza

El intervalo de confianza, para reportar la incertidumbre expandida, se selecciona el valor de 2 asumiendo que los resultados siguen una distribución normal al 95.45% de intervalo de confianza.



La incertidumbre expandida, considerando un factor de cobertura $k=2$ y al 95.45% de intervalo de confianza es de 0.6%.

$$u_{exp} = \pm 2 * u_{c\%M}$$

$$u_{exp} = \pm 1.833184$$

El Porcentaje de Pureza de Acetaminofén en el Preparado Farmacéutico es de $98.175 \pm 1.833184\%$.

3. Estudio de la estabilidad de la muestra de Acetaminofén a temperatura ambiente.

Se realizó el estudio de estabilidad de la muestra de Acetaminofén a temperatura ambiente durante doce horas con tiempos de muestreo de una hora, se realizaron seis inyecciones de la muestra de Acetaminofén obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 4. Área de los Picos Cromatográficos de muestra de Acetaminofén tras inyecciones sucesivas durante 12 horas

Numero de Inyecciones	Hora 0	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 5	Hora 6	Hora 7	Hora 8	Hora 10	Hora 11	Hora 12
1	25.10	24.70	24.70	24.90	24.90	25.22	25.13	24.70	24.70	24.60	25.70	25.60
2	25.00	25.00	25.10	24.90	24.70	25.33	25.13	24.90	24.70	24.40	25.80	25.80
3	25.00	25.00	25.11	24.90	24.70	25.02	25.00	24.60	24.60	24.30	25.60	25.90
4	25.10	25.00	25.11	24.89	24.90	25.40	25.00	24.60	24.60	24.50	25.50	25.80
5	25.10	25.00	25.12	24.91	24.95	25.10	25.10	24.40	24.40	24.60	25.60	25.60
6	25.10	25.10	25.13	24.88	24.93	25.30	25.01	24.30	24.30	24.60	25.66	25.91
t-Student	2.571	1.58	0.28	7.55	8.32	2.84	0.14	4.77	6.52	17.00	10.63	10.20
F Fisher	0.198	0.14	0.09	25.00	0.20	0.13	0.63	0.06	0.10	0.17	0.25	0.14
F ANOVA	5.318	1.60	4.66	42.96	13.39	4.95	0.10	22.32	48.60	84.10	108.20	148.64

La comparación estadística de la varianza y la media de las áreas la muestra en cada tiempo en comparación con la lectura inicial (Tiempo cero), no arrojo diferencia significativa para un nivel de confianza del 95% durante las primeras dos horas de muestreo debido a que a las tres horas los valores de t Student calculados son mayores que el t Student crítico (t_{crit} 2.571) por lo que los valores de las áreas a las tres horas son estadísticamente diferente a los



valores de las áreas obtenidas al tiempo cero de muestreo, esto se verifica con un análisis de homogeneidad de las varianzas el cual resulto que a las tres horas de muestreo las varianzas de las áreas medidas son diferentes ($F_{crit} 0.198 < F_{cal}$); por lo cual mediante un análisis de varianza (ANOVA) ($F_{crit} 5.318 > F_{cal}$), demostró que después de las tres horas los resultados de las áreas obtenidos son afectados por el tiempo de almacenamiento de la solución analítica.

Tabla 5. Determinación del Factor de Recuperación de Acetaminofén en la muestra.

Tiempo en Horas	Factor de Recuperación
1	99.60
2	99.91
3	99.32
4	99.12
5	100.65
6	99.98
7	98.07
8	97.94
9	98.14
10	97.74
11	102.30
12	102.80

Los resultados obtenidos en la Tabla N°5 demuestra que las soluciones analíticas de Acetaminofén son estables durante todo el periodo de prueba, debido a que el factor de recuperación desde el inicio hasta el final de la prueba se mantuvo dentro del criterio de aceptación establecido (97%-103%), aunque se obtienen valores estadísticamente diferentes



después de las dos horas de muestreo, pero los porcentajes de recuperación del analito se mantienen dentro del criterio de aceptación establecidos.

4. Repetibilidad y Precisión intermedia del sistema.

Para el estudio de la Repetibilidad y Precisión intermedia de las mediciones analíticas, se prepararon soluciones estándar de Acetaminofén, a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ y se midieron las áreas de los picos por 4 días, los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Áreas de Picos, en mUA, del estándar de Acetaminofén.

Concentración Estándar en $\mu\text{g/mL}$	Nº de Inyecciones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
	1	24.60	24.60	25.00	24.50
2	24.60	25.02	25.00	24.50	
3	24.70	25.03	25.10	24.50	
4	24.70	25.05	25.20	24.60	
5	24.90	25.06	25.50	24.60	

Se realizó un análisis de los datos obtenidos para verificar si existía o no datos anómalos, el cual no se encontraron debido a que el valor de Q_{cal} del test de Dixon (0.37), fue menor que el Q_{crit} (0.45), por lo cual se demuestra que no existen datos anómalos.

Para estudiar la Repetibilidad de las mediciones analíticas se demostró la homogeneidad en las varianzas y para identificar si existen diferencias significativas de los resultados entre los días se realizó ANOVA de un factor. El valor calculado del test de Hartley para el estudio de la homogeneidad de la varianza es de 14.33 siendo el de tabla al 95% de 20.6 por lo que las varianzas entre los días son homogéneas y por lo tanto hay Repetibilidad entre las mediciones.

La tabla 7 nos muestra los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que existe diferencia significativa entre los días de medición ya que el valor de $F_C > F_{\text{crit}}$.



Tabla 7 ANOVA para el estudio de la Repetibilidad y Precisión Intermedia de las Mediciones Analíticas

Orígenes de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	Fc	Valor de Crítico
Entre Días	1.04	3.00	0.35	21.03	3.49
Dentro de los Días	0.20	12.00	0.02		
Total	1.24	15.00			

La repetibilidad y la precisión intermedia del sistema en las mediciones analíticas calculados a partir de sus desviación estándar, expresada como %RSD es de 0.52% para la repetibilidad del sistema y 1.17% para la Precisión Intermedia del sistema; según los porcentaje de desviación estándar relativa el sistema es capaz de producir resultados precisos.

5. Repetibilidad y Precisión intermedia del método.

Para el estudio de la Repetibilidad y Precisión intermedia de las mediciones analíticas, se prepararon soluciones Muestras de Acetaminofén, a una concentración de 30 µg/mL y se midieron las áreas de los picos por 4 días, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Áreas de Picos, en mUA, para la muestra de Acetaminofén

Concentración Muestra en µg/mL	N° de Inyecciones	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
	1	25.07	25.00	25.27	25.01
2	25.09	25.00	25.28	25.01	
3	25.10	25.01	25.30	25.02	
4	25.10	25.04	25.30	25.03	
5	25.20	25.05	25.35	25.05	

Se realizó un análisis de los datos obtenidos para verificar si existía o no datos anómalos, el cual no se encontraron debido a que el valor de Q_{cal} del test de Dixon (0.27), fue menor que el Q_{crit} (0.45), por lo cual se demuestra que no existen datos anómalos.



Para estudiar la Repetibilidad de las mediciones analíticas se demostró la homogeneidad en las varianzas y para identificar si existen diferencias significativas de los resultados entre los días se realizó ANOVA de un factor. El valor calculado del test de Hartley para el estudio de la homogeneidad de la varianza es de 9.18 siendo el de tabla al 95% de 20.6 por lo que las varianzas entre los días son homogéneas y por lo tanto hay Repetibilidad entre las mediciones. La tabla 9 se muestran los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que existe diferencia significativa entre los días de medición ya que el valor de $F_C > F_{\text{crit}}$.

Tabla 9 ANOVA para el estudio de la Repetibilidad y Precisión Intermedia del Método.

Orígenes de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	Fc	Valor de Fcrítico
Entre Días	0.21096875	3.00	0.07032292	63.33	3.49
Dentro de los Días	0.013325	12.00	0.00111042		
Total	0.22429375	15.00			

La repetibilidad y la precisión intermedia del Método en las mediciones analíticas calculados a partir de sus desviación estándar, expresada como %RSD es de 0.13% para la repetibilidad del método y 0.49% para la Precisión Intermedia del método; según el porcentaje de desviación estándar relativa el método es capaz de producir resultados precisos.

6. Evaluación de la Exactitud del Método.

Para la evaluación de la exactitud del método; se preparó una curva de calibración estándar y una curva de calibración muestra a 5 niveles de concentración (50, 70, 100, 130 y 150% de la concentración nominal). El gráfico 1 muestra ambas curvas, los parámetros de regresión para las dos curvas se muestran en la tabla 10.



Grafico 1. Comparación de las Curvas de calibración estándar y curva de calibración muestra.

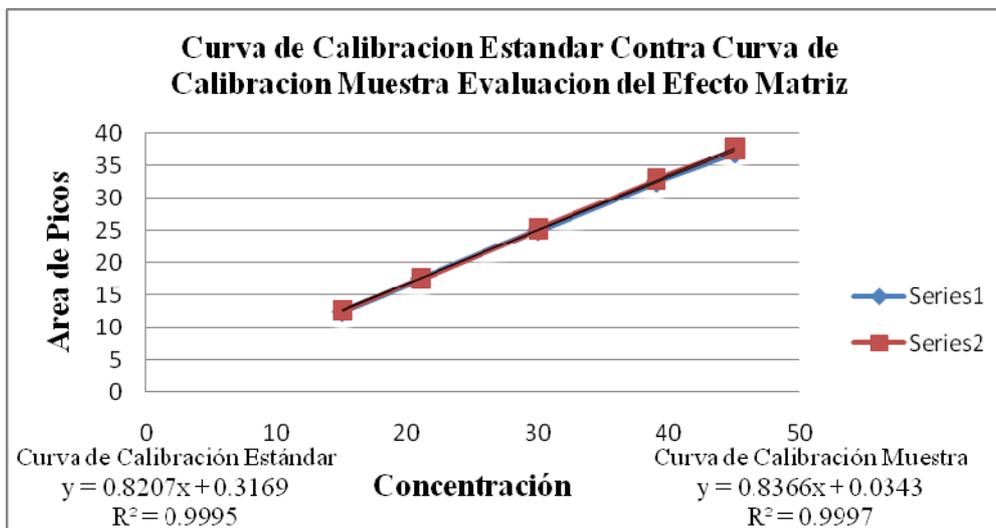


Tabla 10. Parámetros de la curva de calibración estándar y muestra respectivamente.

Parametro	Curva Estándar	Curva Muestra
Pendiente (b_1)	0.8207	0.8366
Desv. Est. (Sb_1)	0.2177	0.1833
Var. Residual	0.0474	0.0336

A partir del Test de Fisher, se demostró la homogeneidad de las varianzas, de ambas curvas ya que el F calculado (1.0029) es menor del F crítico (2.4837). Por medio de la t student se demostró que las pendientes de las curvas de calibración estándar y curva de calibración muestra son estadísticamente iguales ya que el t calculado (0.0234), es menor que el t crítico (2.04) por lo que no existe efecto matriz significativo en la respuesta del analito en el método de análisis.

6.1 Estimación del recobro.

Se estimó el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de calibración estándar y muestra mediante la siguiente ecuación:



$$R_c = \frac{b_{1CCE}}{b_{1CCM}} * 100$$

El porcentaje de recobro es de 101.9332%.

En la siguiente tabla 11 se muestra el porcentaje obtenidos por cada nivel de concentración y el porcentaje de desviación estándar relativa para los resultados obtenidos.

Tabla 11. Porcentajes obtenidos y %RSD obtenido en el ensayo de exactitud del método.

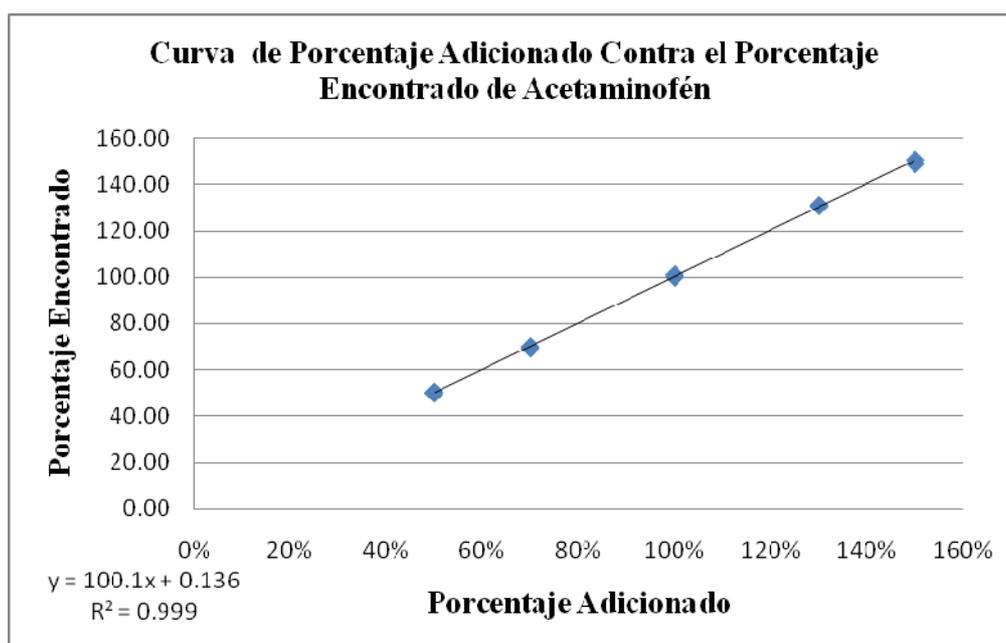
% de Concentraciones empleadas	Porcentaje obtenido por Nivel	Porcentaje recuperado	Promedio	Desv. Estándar	%RSD	Varianza
50	49.87	100.93	100.51	0.4394	0.44	0.1931
	49.83	100.53				
	49.91	100.05				
70	69.77	100.30	99.73	0.5699	0.57	0.3248
	69.81	99.73				
	70.21	99.16				
100	100.53	100.13	100.49	0.5542	0.55	0.3072
	100.53	100.21				
	99.73	101.13				
130	129.65	100.50	100.82	0.2785	0.28	0.0775
	129.97	100.93				
	130.05	101.02				
150	147.61	99.47	99.78	0.6560	0.66	0.4303
	147.61	99.34				
	147.21	100.53				
Promedio		100.27 %				
Desviación		0.6250				
%RSD		0.6233				



En la tabla anterior demuestra que los porcentajes de recuperado para la exactitud del método se encuentra entre 99.16 % y 101.13 %; el valor medio total de los porcentajes recuperados (100.27%) no difiere estadísticamente diferente de 100% debido a que el valor calculado de la t-Student es de 1.6504 y el valor crítico de t es de 1.771; a la vez se demuestra que el método preciso ya que el valor medido del %RSD es de 0.6233 el cual es menor que el especificado en el criterio de aceptación.

La recta de ajuste $Y = 100.1 X + 0.136$; se obtuvo producto de graficar los porcentajes de concentración teórico contra los porcentajes obtenidos en el método analítico, demostrando una correcta correlación entre estas dos variables debido a que el valor del coeficiente de determinación fue de 0.999, tal como se muestra en la siguiente grafica.

Grafico N°2. Curva de Calibración del Porcentaje de Acetaminofén Teórico Contra el Porcentaje de Acetaminofén Encontrado.



7. Resultados para la Linealidad

7.1 Linealidad del Sistema.



Para la evaluación de la linealidad del sistema se construyo una curva de calibración estándar a 11 niveles de concentración diferente; los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla N°12. Linealidad del sistema de cuantificación (Tres curvas Promediadas)

Nivel de Concentración	Concentración en $\mu\text{g/mL}$	Área de Idoneidad	Área	% Por Nivel	% Total	F
50%	15	12.53	12.49	14.94	99.63	0.8324
50%	15	12.53	12.45	14.90	99.36	0.8302
50%	15	12.53	12.41	14.86	99.04	0.8276
60%	18	15.04	15.08	18.04	100.24	0.8376
60%	18	15.04	15.02	17.98	99.87	0.8344
60%	18	15.04	15.08	18.05	100.27	0.8378
70%	21	17.55	17.40	20.83	99.18	0.8287
70%	21	17.55	17.41	20.84	99.22	0.8290
70%	21	17.55	17.56	21.01	100.06	0.8360
80%	24	20.05	19.93	23.85	99.38	0.8304
80%	24	20.05	19.88	23.80	99.15	0.8285
80%	24	20.05	19.90	23.82	99.24	0.8292
90%	27	22.56	22.50	26.93	99.73	0.8333
90%	27	22.56	22.60	27.05	100.18	0.8370
90%	27	22.56	22.62	27.07	100.25	0.8377
100%	30	25.07	25.00	26.92	99.72	0.8332
100%	30	25.07	24.92	29.83	99.43	0.8308
100%	30	25.07	24.92	29.82	99.41	0.8307
110%	33	27.57	27.30	29.70	99.01	0.8273
110%	33	27.57	27.43	32.83	99.49	0.8313
110%	33	27.57	27.29	32.66	98.98	0.8271



120%	36	30.08	29.97	32.88	99.62	0.8324
120%	36	30.08	29.85	35.72	99.22	0.8291
120%	36	30.08	29.79	35.65	99.04	0.8275
130%	39	32.59	32.33	35.72	99.21	0.8290
130%	39	32.59	32.32	38.68	99.18	0.8287
130%	39	32.59	32.31	38.67	99.15	0.8285
140%	42	35.09	34.67	41.49	98.78	0.8254
140%	42	35.09	34.89	41.76	99.43	0.8308
140%	42	35.09	34.76	41.61	99.06	0.8277
150%	45	37.60	37.21	44.53	98.96	0.8269
150%	45	37.60	37.38	44.74	99.42	0.8307
150%	45	37.60	37.28	44.62	99.16	0.8285

Para saber el tipo de regresión aplicar se hizo un estudio de homocedasticidad, mediante el Test de Hartley, de las áreas obtenidas al leer 10 veces una solución estándar de concentración menor (nivel 50% de la concentración nominal) y 10 veces una solución estándar de concentración más alta (150% de la concentración

nominal), los resultados de áreas de picos y del Test de Hartley se muestran en la tabla N°, siendo el Valor de r calculado menor al r de tabla, por lo que la regresión es simple.

Tabla N°13. Áreas de pico para el estándar de más baja concentración y más alta concentración.

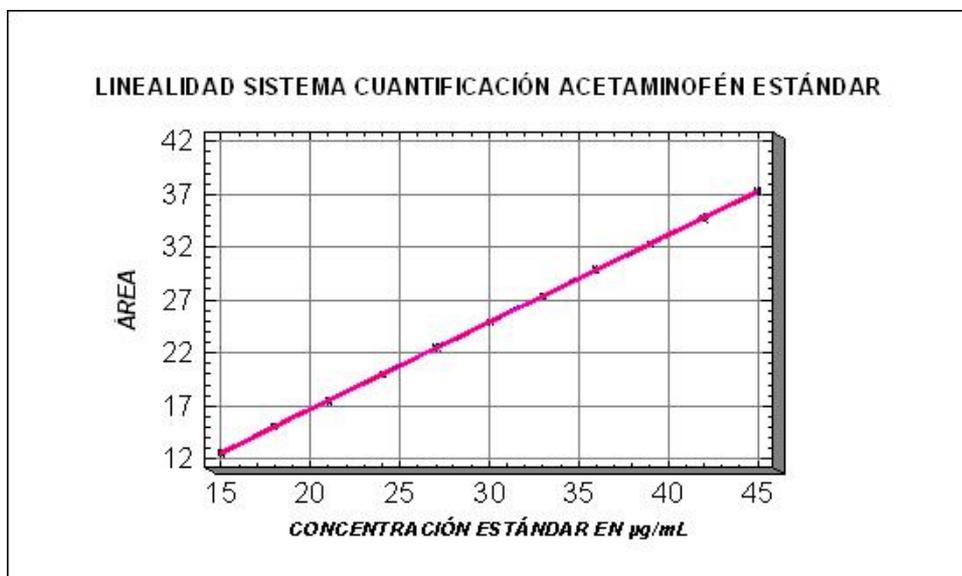
N° de Corridas	Área del Pico (50%) Estándar	Área del Pico (150%) Estándar
1	12.55	37.58
2	12.49	37.59
3	12.48	37.40
4	12.53	37.59
5	12.50	37.53
6	12.51	37.58
7	12.58	37.48
8	12.54	37.55
9	12.60	37.52
10	12.50	37.62
Varianza	0.0016	0.0042
Varianza MAX	0.0042	
Varianza MIN	0.0016	



R _{exp} =2.7006
r _{crit} (0,95,2,9)=4,03

Los coeficientes de correlación y determinación son 0.9999 y 0.9999 respectivamente; lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos en la recta de ajuste (Grafico N°) y los datos experimentalmente.

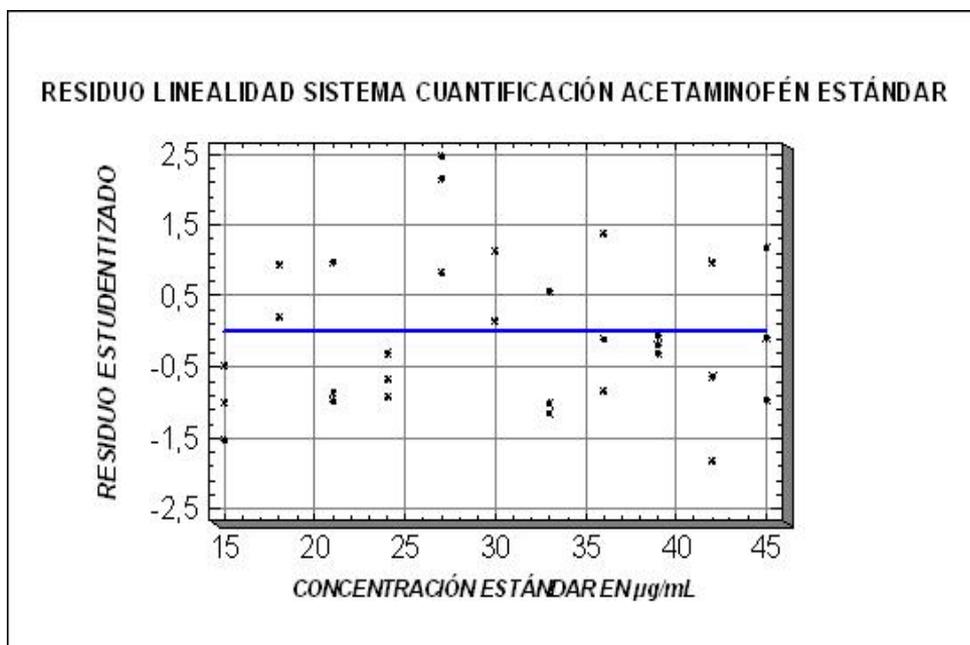
Grafico N°3. Curva de calibración de la Linealidad del Sistema de Cuantificación Estándar de Acetaminofén.



La normalidad de los residuales se muestran en la Grafica N°3, Donde se puede observar que los residuales se distribuyen aleatoriamente y no reflejan ninguna tendencia.



Grafico N°4. Grafico de las residuales del sistema de Cuantificación de Acetaminofén.



Al aplicar el test de significación estadística del intercepto, este resultó ser no significativo, ya que la t experimental (**0.2245**) es menor que la t tabulada (**2.262**) para un α igual a 0.05%, lo que indica que el intercepto no se diferencia significativamente de 0 por lo que no presenta sesgo. De igual forma, al aplicar el test de significación de la pendiente los resultados fueron satisfactorios al evidenciar una pendiente significativamente diferente de cero, pues la t experimental (**537.42**) fue mayor que la t tabulada (**2.262**) para un α igual a 0.05%; con cual queda demostrado la proporcionalidad del sistema.

El promedio de los factores de respuesta (Área de los picos Cromatográficos/Concentración) fue de **0.8308** y un %RSD de **0.41 %** el cual es menor del 2% por lo que el ajuste del modelo lineal es válido estadísticamente.

Para verificar la validez del modelo, se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, para verificar el ajuste del modelo se presenta en la Tabla N°17. Donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F_c es mayor al F de tabla.

Tabla N°14. Resultado de ANOVA para la verificar la validez del modelo.

Verificación	Grados de libertad	SC	VAR	F	Valor crítico de F
Regresión	1	22340.3063	22340.3063	2494778.74	4.16



Residuos	31	0.27759957	0.00895482		
Total	32	22340.5839			

7.2 Linealidad del Método

Para la evaluación de la linealidad del método se construyó una curva de calibración muestra a 11 niveles de concentración diferente; los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla N°15. Linealidad del Método de cuantificación (Tres curvas Promediadas)

Nivel de Concentración	Concentración en µg/mL	Área de Idoneidad	Área	% Por Nivel	% Total	F
50%	15	12.53	12.52	14.98	99.87	0.8344
50%	15	12.53	12.60	15.08	100.53	0.8400
50%	15	12.53	12.67	15.16	101.06	0.8444
60%	18	15.04	15.09	18.06	100.35	0.8385
60%	18	15.04	15.15	18.13	100.71	0.8415
60%	18	15.04	15.13	18.10	100.58	0.8404
70%	21	17.55	17.65	21.13	100.61	0.8406
70%	21	17.55	17.81	21.32	101.52	0.8483
70%	21	17.55	17.67	21.15	100.70	0.8414
80%	24	20.05	20.04	23.99	99.95	0.8351
80%	24	20.05	20.06	24.01	100.05	0.8360
80%	24	20.05	20.07	24.02	100.07	0.8361
90%	27	22.56	22.48	26.90	99.65	0.8326
90%	27	22.56	22.53	26.97	99.88	0.8346
90%	27	22.56	22.57	27.01	100.03	0.8358
100%	30	25.07	25.02	26.95	99.83	0.8341
100%	30	25.07	25.03	29.95	99.84	0.8342



100%	30	25.07	24.96	29.87	99.56	0.8319
110%	33	27.57	27.48	29.90	99.67	0.8328
110%	33	27.57	27.60	33.03	100.10	0.8364
110%	33	27.57	27.45	32.86	99.56	0.8319
120%	36	30.08	30.05	32.97	99.90	0.8347
120%	36	30.08	30.05	35.96	99.90	0.8347
120%	36	30.08	30.07	35.99	99.98	0.8354
130%	39	32.59	32.53	35.93	99.82	0.8340
130%	39	32.59	32.55	38.96	99.89	0.8346
130%	39	32.59	32.59	39.00	100.01	0.8356
140%	42	35.09	35.33	42.28	100.67	0.8412
140%	42	35.09	35.30	42.25	100.60	0.8406
140%	42	35.09	35.36	42.32	100.75	0.8418
150%	45	37.60	37.35	44.70	99.34	0.8300
150%	45	37.60	37.46	44.83	99.62	0.8324
150%	45	37.60	37.88	45.34	100.75	0.8419

Para saber el tipo de regresión aplicar se hizo un estudio de homocedasticidad, mediante el Test de Hartley, de las áreas obtenidas al leer 10 veces una solución estándar de concentración menor (nivel 50% de la concentración nominal) y 10 veces una solución estándar de concentración más alta (150% de la concentración nominal), los resultados de áreas de picos y del Test de Hartley se muestran en la tabla N°, siendo el Valor de r calculado menor al r de tabla, por lo que la regresión es simple.

Tabla N°16. Áreas de pico para el estándar de más baja concentración y más alta concentración.

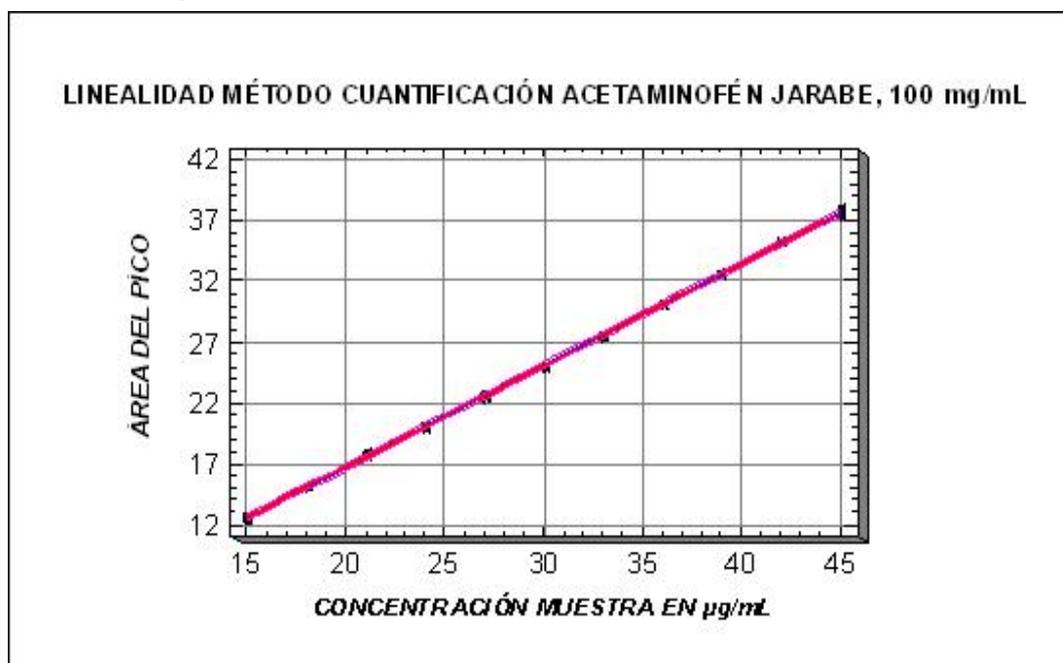
N° de Corridas	Área del Pico (50%) Muestra	Área del Pico (150%) Muestra
1	12.60	37.55
2	12.65	37.56
3	12.70	37.80
4	12.50	37.50
5	12.55	37.80
6	12.60	37.85
7	12.45	37.00
8	12.60	37.01



9	12.70	38.00
10	12.65	38.01
Varianza	0.0067	0.1325
Varianza MAX	0.1325	
Varianza MIN	0.0067	
Rexp=19.8693		
rcrit(0,95,2,9)=4,03		

Los coeficientes de correlación y determinación son 0.9999 y 0.9998 respectivamente; lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos en la recta de ajuste (Grafico N°4) y los datos experimentalmente.

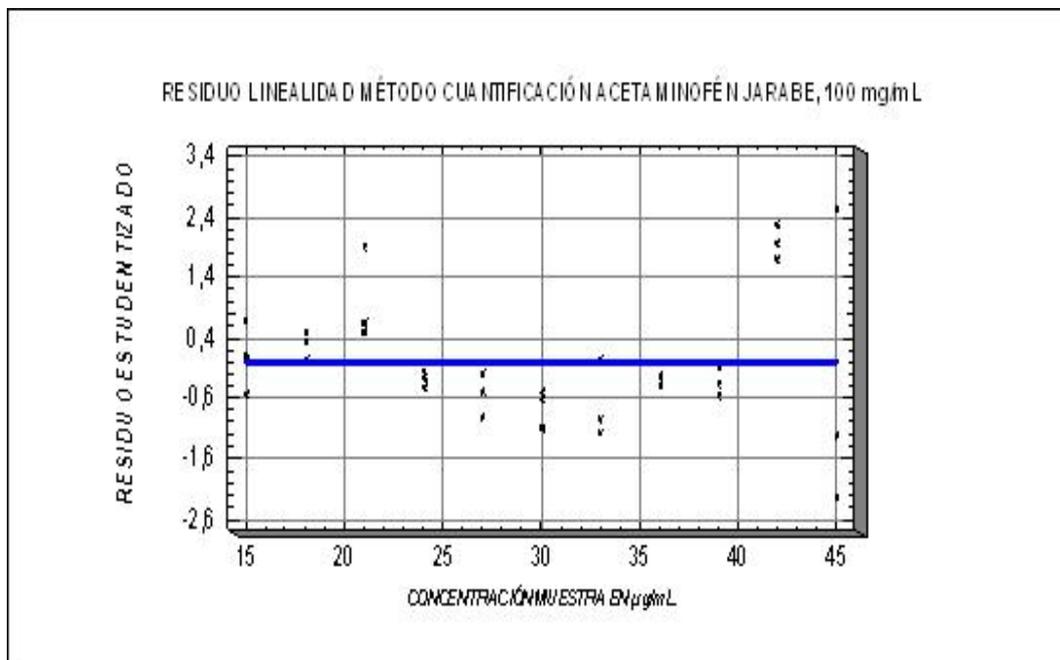
Grafico N°4. Curva de calibración de la Linealidad del Método de Cuantificación Acetaminofén 100 mg/5mL, Jarabe.



La normalidad de los residuales se muestran en la Grafica N°4, Donde se puede observar que los residuales se distribuyen aleatoriamente y no reflejan ninguna tendencia.



Grafico N°5. Grafico de las residuales del Método de Cuantificación de Acetaminofén.



Al aplicar el test de significación estadística del intercepto, este resultó ser no significativo, ya que la t experimental (**1.061**) es menor que la t tabulada (**2.262**) para un α igual a 0.05%, lo que indica que el intercepto no se diferencia significativamente de 0 por lo que no presenta sesgo. De igual forma, al aplicar el test de significación de la pendiente los resultados fueron satisfactorios al evidenciar una pendiente significativamente diferente de cero, pues la t experimental (**360.486**) fue mayor que la t tabulada (**2.262**) para un α igual a 0.05%; con cual queda demostrado la proporcionalidad del método.

El promedio de los factores de respuesta (Área de los picos Cromatográficos/Concentración) fue de **0.8369** y un %RSD de **0.50%** el cual es menor del 3% por lo que el ajuste del modelo lineal es válido estadísticamente.

Para verificar la validez del modelo, se aplicó un Análisis de varianza de un factor (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, para verificar el ajuste del modelo se presenta en la Tabla N°. Donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F_c es mayor al F de tabla.

Tabla N°17. Resultado de ANOVA para la verificar la validez del modelo.

Verificación	Grados de	SC	VAR	F	Valor crítico
--------------	-----------	----	-----	---	---------------

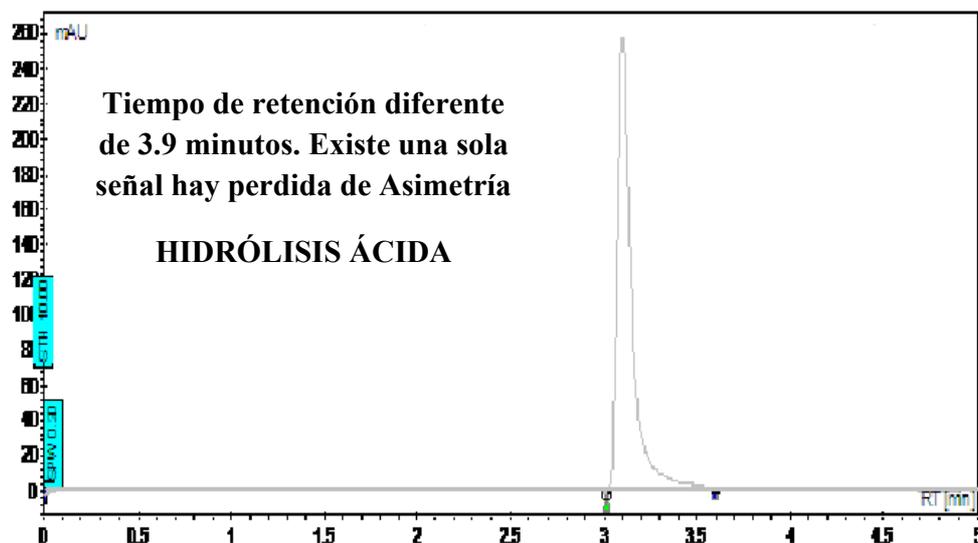


	libertad				de F
Regresión	1	22689.1423	22689.1423	1373773.28	4.16
Residuos	31	0.51199381	0.01651593		
Total	32	22689.6543			

8. Selectividad.

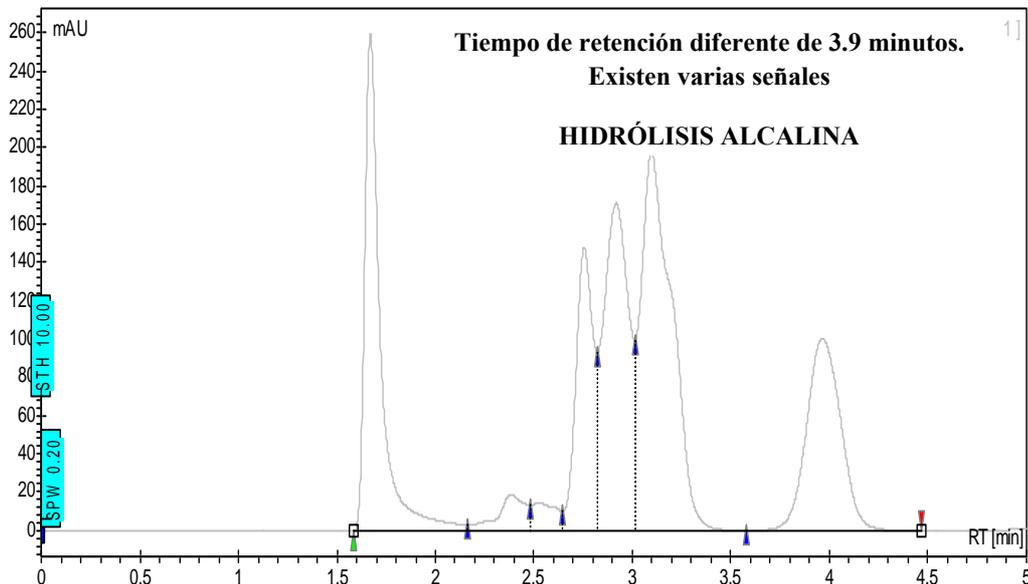
Los cromatogramas de la degradación acelerada de la Acetaminofén en medio básico, ácido y por oxidación con peróxido se muestra a continuación en los cromatogramas 1, 2 y 3 y el cromatograma obtenido tras eluir la muestra y estandar de Acetaminofén se muestran en los cromatogramas 4 y 5. En los cromatogramas de estas soluciones se revela que los productos de degradación de la Acetaminofén no figuran ninguna señal de tiempo a los 3.9 minutos, tiempo de retención característico para la Acetaminofén; por lo que el método es selectivo para identificar y cuantificar de forma selectiva el Acetaminofén bajo las condiciones de análisis descritas.

Cromatograma N° 1. Cromatograma obtenido de muestra de Acetaminofén tras eluir la muestra con Ácido Clorhídrico 1N (Hidrólisis Ácida).

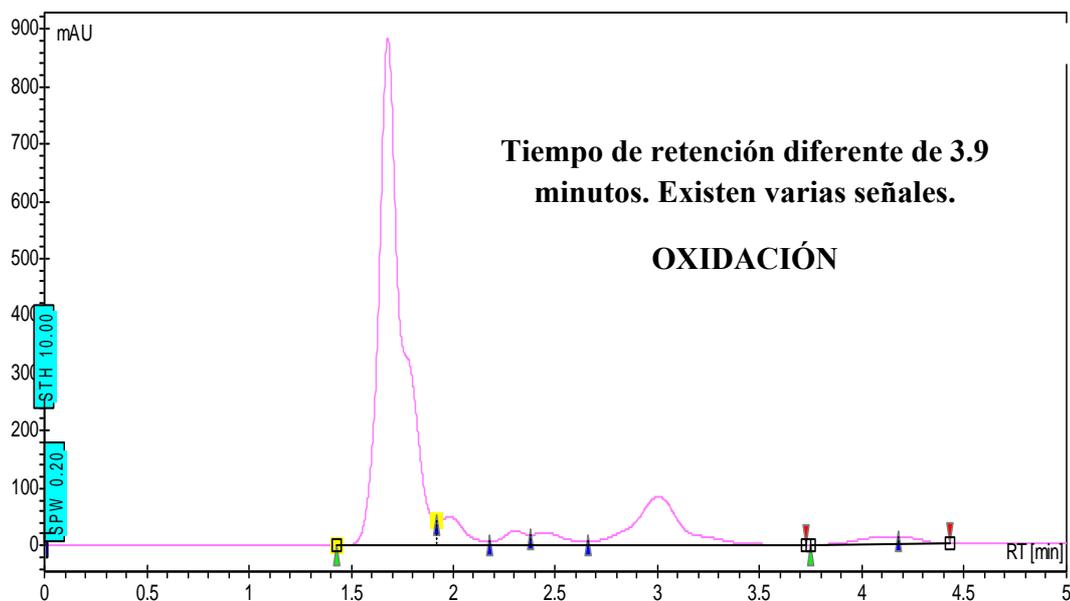




Cromatograma N° 2. Cromatograma obtenido de muestra de Acetaminofén tras eluir la muestra con Hidróxido de Sodio 1N (Hidrólisis Básica).



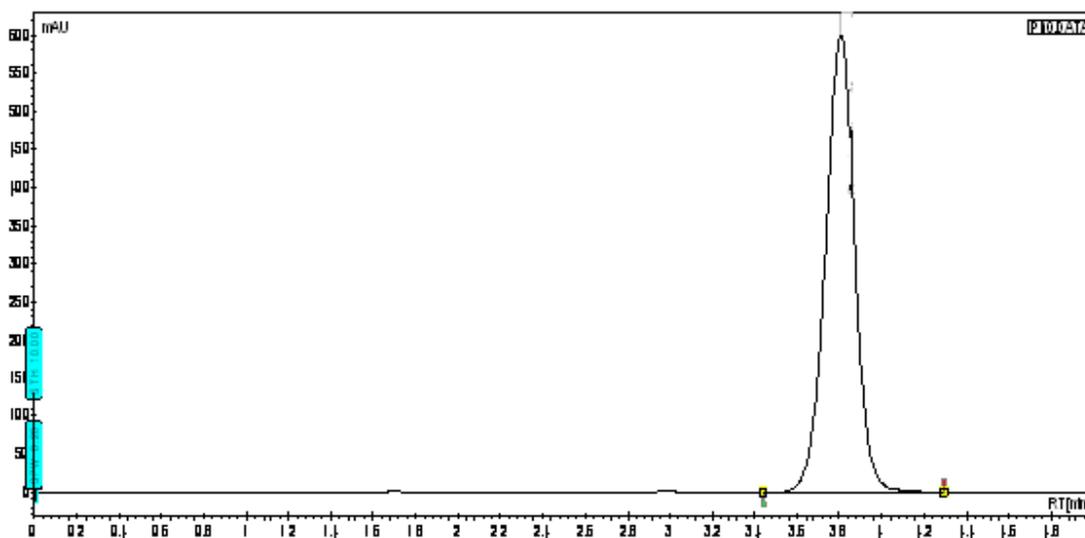
Cromatograma N° 3. Cromatograma obtenido de muestra de Acetaminofén tras eluir la muestra con Peróxido de Hidrogeno (Oxidación).



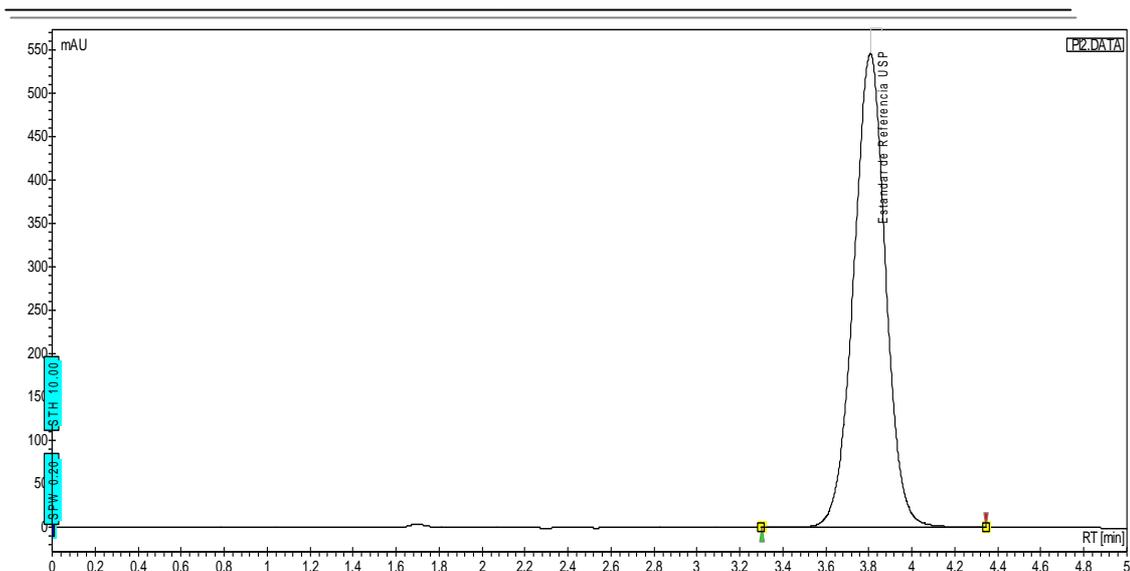


Los resultados obtenidos nos revelan que la banda de elución principal de la muestra de Acetaminofén y estándar (Cromatogramas 4 y 5), no es afectada significativamente tras eluir la muestra bajo estrés químico utilizando hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y peróxido de hidrogeno como agentes degradadores; el cual se reflejan en los Cromatogramas anteriormente descritos; ya que tanto para la hidrólisis básica como para la oxidación con peróxido de hidrogeno los productos de degradación química del analito no interfieren con la banda de elución principal y el pico Cromatográfico obtenido tras eluir la muestra con ácido clorhídrico, se deforma el pico y disminuye el tiempo de elución con la consiguiente pérdida de resolución y asimetría del pico Cromatográfico.

Cromatograma N° 4. Cromatograma obtenido de muestra de Acetaminofén en condiciones Normales.



Cromatograma N° 5. Cromatograma obtenido de Estándar de Acetaminofén en Condiciones Normales.



9. Robustez

En la tabla N° se presenta los resultado para el estudio de la robustez del método cuando se modifica la longitud de onda del máximo de absorción del analito, la velocidad de flujo de la Fase Movil (Q caudal) y la proporción de solvente organico (SO). Ninguno de los efectos de los factor supera el intervalo de $\pm 2S$ promedio (0.54667) por lo que su

variación no influye en la capacidad el método analítico, siendo este robusto; Exceptuando la condición de cambio de 1.4 mL por minuto de flujo, el cambio de la longitud de onda a 252 nm y el cambio en la proporción de la fase móvil en un 28:72 en componente orgánico.

Tabla N°18. Tabla de Robustez del Método Analítico.

Experimentos	λ	Caudal	Solv. Org.	Área (λ)	Área (Q)	Área (SO)	Promedio	S
1	252	1.4	28	24.6	25.6	24.6	24.9	0.577350269
2	252	1.6	28	24.9	24.9	24.4	24.7	0.288675135
3	252	1.4	32	24.7	25.1	24.5	24.8	0.305505046
4	252	1.6	32	24.7	24.9	24.7	24.8	0.115470054
5	256	1.4	28	24.6	24.3	24.4	24.4	0.152752523
6	256	1.6	28	24.6	24.1	24.6	24.4	0.288675135
7	256	1.4	32	24.4	24.3	24.6	24.4	0.152752523
8	256	1.6	32	24.3	24.9	24.5	24.6	0.305505046

10. Idoneidad del Sistema



10.1 Parámetros Cromatográficos

Los resultados obtenidos en el método de análisis de Acetaminofén demuestran que la columna cromatográfica separa de forma eficiente el analito de interés (Acetaminofén), debido a que se obtuvieron 2024 platos teóricos promedios, un factor de retención de 5.6 y un factor de asimetría de 1.78, por lo cual el sistema Cromatográfico demuestra ser apto para la determinación cuantitativa del principio activo de interés.

10.2 Precisión

El método demuestra ser preciso ya para la determinación de la precisión instrumental se prepararon tres soluciones estándares de Acetaminofén a la concentración nominal, las cuales se inyectaron por quintuplicado cada solución obteniéndose los siguientes resultados en la siguiente tabla.

Tabla N°19. Tabla de la Idoneidad del sistema para la precisión instrumental

N° de Soluciones	N° de lecturas	Concentración Empleada en $\mu\text{g/mL}$	Valores de Absorbancias
Solución N°1	1	30	25.00
	2	30	25.01
	3	30	24.85
	4	30	25.00
	5	30	25.01
Solución N°2	1	30	25.03



	2	30	25.00
	3	30	24.92
	4	30	24.92
	5	30	25.07
Solución N°3	1	30	25.06
	2	30	24.99
	3	30	24.90
	4	30	24.60
	5	30	24.80
Promedio			24.94
Desviación Estándar			0.1217
%RSD			0.49

11. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación calculados a partir de la desviación estándar de la residual y pendiente de la curva estándar se muestran en la siguiente tabla.

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual	0.0829137
Pendiente	0.8253164
LD (µg/ml)	0.33052298
LC (µg/ml)	1.0046291



CONCLUSIÓN

Se estableció la metodología analítica para la cuantificación de Acetaminofén 100 mg/5 mL Jarabe el cual resultó ser lineal en el intervalo de concentración estudiada del (15 $\mu\text{g/mL}$ al 45 $\mu\text{g/mL}$) debido al valor obtenido para el coeficiente de correlación; también se comprobó la linealidad con el coeficiente de variación de los factores de respuesta y se corroboró que el valor de la pendiente es significativamente distinto de cero y que los datos se ajustan a una línea recta mediante un ANOVA.

La metodología aprobó los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia del sistema y del método al ser el %RSD menor al 2% para el sistema y menor del 3 % para el método.

Para la exactitud, el porcentaje de recuperación media estuvo dentro de los límites (97,0 – 103,0%) y se comprobó que no difiere estadísticamente del 100%. También se verificó la linealidad de la curva de recuperación y que es independiente de la concentración, por lo tanto la metodología es exacta.



En la evaluación de la sensibilidad se determinó que el límite de detección y el de cuantificación están alejados de la concentración de trabajo y fuera del rango de trabajo.

La metodología analítica es selectiva debido a que los productos de degradación del acetaminofén producidos no interfieren en la banda de elución principal del analito.

La metodología resultó ser robusta frente al cambio en la proporción de los Componentes de la fase móvil, la longitud de onda y al cambiar la velocidad de flujo de la fase móvil. Por lo tanto, la metodología es robusta al cambio de estos factores.

Se demostró que la metodología cumple con los parámetros mínimos Descritos en la USP 32 para la Categoría I: Linealidad, Precisión, Exactitud, Selectividad, por lo tanto la técnica se encuentra validada.

RECOMENDACIONES

- Para estudios futuros prever que los equipos del laboratorio se encuentren en buen estado, para no atrasar el proceso de validación.
- Tener en cuenta los parámetros de validación calculados en el experimento como una referencia.



-
- Ayudarse de los estudios de robustez para determinar las condiciones que puedan o no afectar el método de análisis.

 - Realizar validaciones en varios métodos, con características similares al estudio realizado.

 - Evaluar los diseños de experimentos, cálculos efectuados en el presente trabajo, junto con el marco teórico, los cuales servirán de base para realizar futuros estudios de carácter investigativo de validación.

BIBLIOGRAFÍA

1. The United States Pharmacopeial USP XXXII-NF27. Archivo electrónico. Acetaminofén capsulas; Acetaminofén material prima; Acetaminofén solución oral.

2. The United States Pharmacopeial USP XXX-NF25. Archivo electrónico. Acetaminofén capsulas; Acetaminofén material prima; Acetaminofén solución oral.



3. The United States Pharmacopeia Convention. 2006. The United States Pharmacopeia XXIX. 29º Edición. USA. Acetaminofén capsulas; Acetaminofén material prima; Acetaminofén solución oral.
4. Validación de métodos analíticos de la A.E.F.I. (Asociación española de farmacéuticos de la industria); monografía, Barcelona marzo del 2001.
5. SLR Ellison (LGC, UK), M. Rösslein (EMPA, Suiza) y A. Williams (UK). Guía EURACHEM / CITAC. Cuantificación de la Incertidumbre en la Medición Analítica Segunda Edición.
6. Matamoros Sánchez Alicia, Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis Doctoral Tarragona 2002. Universidad de Rovira I Virgili, Facultad de Química.
7. Delgado Gustavo, Documentación del Curso de Validación de métodos Analíticos, julio del 2008.
8. Segundo Congreso Farmacéutico 2008. Facultad de Ciencias Químicas; Escuela de Farmacia; Estimación de la incertidumbre en HPLC en la cuantificación de Aflatoxinas en cereal, Dr. Gustavo Delgado.
9. Bedoya Lora Franky Esteban. Informe de práctica profesional. Homologación de métodos de análisis fisicoquímico empleado en POSTOBÓN S.A. para materias primas y producto terminado, y validación del método para la determinación de grados BRIX. Universidad de Antioquia. Facultad de ingeniería. Departamento de ingeniería química. Medellín. Agosto 2009.
10. Oleksiuk Hernández Ángela Denise. Universidad de Chile. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Laboratorio MED CELL S.A. Validación de la metodología analítica por HPLC para la cuantificación de Losartán potásico en comprimidos recubiertos. Santiago de Chile 2006.



11. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. (2001). Principios de análisis instrumental. Quinta edición. España. McGraw-Hill.
12. Rubinson K.A. y Rubinson J.F. (2001). Análisis instrumental. España. Pearson Prentice Hall.
13. López Crio Sergio José. Universidad nacional autónoma de Nicaragua. UNAN-LEÓN. Facultad de ciencias puras. Departamento de química. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR); curso introductorio. Febrero del 2008.
14. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. Química analítica. Séptima edición. McGraw-Hill.
15. Flores Jesús. Farmacología humana. Cuarta edición. Capítulo 22. Fármacos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos AINE. MASSON España.
16. Fármacos y dolor. Jesús Flórez. Catedrático de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria Santander. Fármacos analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos.
17. Connors Kenneth A. Curso de análisis farmacéutico (Ensayo del medicamento); capítulo 17, editorial REVERTÉ S.A.
18. Ramis Ramos Guillermo y García Alvares Coque María Celia. Quimiometría. Editorial SINTESIS.
19. HPLC method development for pharmaceuticals. Edited by Satinder Ahuja Ahuja Consulting, Inc., Calabash, North Carolina Henrik Rasmussen Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development, LLC Raritan, New Jersey. ELSEVIER ACADEMIC PRESS.



20. Harris Daniel C. Análisis químico cuantitativo. Tercera edición (sexta edición original). Michelson Laboratory.
21. Miller James N. y Miller Jane C. Estadística y Quimiometría para química analítica cuarta edición. Pearson Prentice Hall.
22. David Harvey. (2000). Química analítica moderna. McGraw-Hill.
23. Maturana, Y. 2004. Desarrollo y Validación de una Metodología por HPLC para Vitaminas en una Fórmula de Uso Tópico. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico y al Grado Académico de Licenciado en Química y Farmacia. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile.
24. Quattrocchi, O. Andrizzi, S. Laba, R. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Argentina. Artes Gráficas Ferro S.A. 301-327p.
25. Goodman y Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica. Onceava edición.