UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE FARMACIA

"A la libertad por la Universidad"

Monografía para optar al título de Licenciado Químico-Farmacéutico.

VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO DE CUANTIFICACION DE IBUPROFENO EN TABLETAS DE 600 mg POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Autores:

- Br. Kalia Gabriela Rayo Toruño.
- Br. Tania Solanch Rivera López.

Tutor:

Lic**.** Tania Mercedes Díaz Pérez.

Asesor:

Lic**.** Yader Benito Salgado Mercado.

León, Nicaragua Octubre del 2014

2014:"Por la Pertinencia y la Excelencia Académica"

Agradecimiento

Damos gracias a Dios, nuestro Padre Celestial, por darnos la oportunidad de llegar hasta este momento de nuestras vidas y cumplir con uno de nuestros grandes sueños de culminar nuestros estudios profesionales.

Gracias a Él, por guiarnos en cada etapa de nuestros estudios, por darnos la sabiduría, la perseverancia, el ánimo, la provisión para cada una de nuestras necesidades y la fortaleza a lo largo de estos años para seguir adelante y permitirnos cumplir con éxito una meta más.

A nuestros profesores por ser una guía de aprendizaje, por brindarnos los conocimientos que nos forjaran como profesionales exitosos. Agradecemos de manera especial a nuestra **Lic. Tania Mercedes Díaz Pérez**, por todo su apoyo incondicional, por su amistad, su paciencia, cariño, consejos y conocimientos para con nosotros, gracias por ser parte de esta etapa educativa de nuestras vidas. Al **Lic. Yader Salgado**, por brindarnos su apoyo y compartir de sus conocimientos y ser partícipe de este estudio monográfico.

A nuestros padres, piezas fundamentales, que con mucho amor, sacrificio y esfuerzo culmina un logro más para nuestra vida.

A todos y a cada una de las personas que nos han apoyado y por su sincero aprecio mil gracias.

Dedicatoria.

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado, con toda la humildad que mi corazón puede emanar dedico primeramente mi trabajo a DIOS y a la Santísima Virgen María.

De igual manera dedico esta tesis a Mi Hijo **Anthony Kael Centeno**, que desde que llego a mi vida ha sido mi inspiración y el pilar que me sostuvo para la culminación de mi trabajo.

A mis padres, quienes me dieron la vida **Rodolfo Rayo Y Xiomara Toruño** quien me ha apoyado no solo en la carrera universitaria sino durante toda mi vida, quien supo formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores. TE AMO MAMA.

A mi amor **Elmer Centeno** por ser alguien especial en mi vida y por demostrarme que en todo momento cuento con él; dándome ánimos de fuerza y valor para seguir adelante.

A esa persona tan especial que tengo en el cielo y que nunca voy a olvidar, mi abuelita **Juana Lanuza.**

A la Familia **Munguía Ruiz** por todas sus consideraciones y por haberme ayudado hasta el final.

A mí compañera de trabajo **Tania Rivera López** por compartir conmigo meses de trabajo y que con sus conocimientos hicieron de esta experiencia una de las mas especiales.

A mí Amiga **Darling Munguía** por brindarme su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A la **Lic. Tania Mercedes Díaz Pérez** por su tiempo y dedicación; ya que sin su ayuda nunca hubiera podido realizar este trabajo.

Y por último deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable; a mí misma por no dejarme vencer, ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno mismo.

Kalia Gabriela Rayo.

Dedicatoria.

Dedico este trabajo monográfico en primer lugar, a Dios por ser el creador y motor de mi vida, por haberme permitido tener salud y haberme dado la gracia de estar viva, por protegerme, ser mi fortaleza, mi guía en toda mi vida, y por bendecirme con el don de la sabiduría e inteligencia necesaria para cumplir con éxito el presente trabajo monográfico. Gracias por estar conmigo en todos los momentos de mi vida, por ser mi todo y lo más importante sin Él no sería nada.

A mi madre, **Leydia María López**, la cual Dios puso como mi madre y que ha sido de mucha bendición para mi vida. Gracias a su enorme esfuerzo, amor y dedicación he logrado concluir con esta etapa y cumplir su sueño de convertirme en profesional, quien ha dado todo por mí en esta vida y ha sido mi mayor apoyo, mi pilar, la persona que me motiva cuando no puedo más, mi modelo a seguir, nunca estaré lo suficientemente agradecida por todo su sacrificio e inmenso amor y por convertirme en la persona que ahora soy, por esto e incontables cosas más Gracias MAMA eres una mujer extraordinaria, TE AMO.

A mi papá, **Rolando Rivera Mendoza**, por brindarme su apoyo aunque no comparte su vida física conmigo, gracias por estar presente en todos estos años de mi carrera y ayudarme económicamente para poder culminar con mis estudios universitarios.

A mi familia, mis hermanas: **Raquel Rivera López** e **Ingris López**. Mi tía, **Ingring López**, que son personas especiales e importantes en mi vida, son una bendición para mí. Gracias por estar conmigo en todo momento apoyándome, dándome de su amor y alegría.

A mí compañera de trabajo **Kalia Rayo** por compartir conmigo todos estos meses de trabajo, y poder estar a su lado en todo este proceso educativo.
Y a todas y cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta meta e hicieron de esta experiencia algo especial gracias.

Tania Rivera López.

ÍNDICE

1. Introducción…… 1
2. Planteamiento de Problema……... 3
3. Objetivo General y Específicos…… 4
4. Marco Teórico……... 5

4.1 Validación……. 5

4.1.1 Generalidades de la Validación…….……... 5

4.1.2 Razones que justifican la validación de métodos analíticos……. 6

4.1.3 Para iniciar la validación es necesario previamente…….…..... 6

4.1.4 Métodos susceptibles de ser validados……..…..... 7

4.1.5 Clasificación de los métodos Analíticos……..…….... 7

4.1.5.1 Métodos no Normalizados……..…….…….. 7

4.1.5.2 Métodos Normalizados……..... 8

4.1.6 Clasificación según la USP……... 8

4.1.7 Requisitos para la selección y validación de métodos…….. 10

4.2 Parámetro de validación……...……. 11

4.2.1 Exactitud……..……. 11

4.2.2 Precisión…….……. 13

4.2.2.1 Repetibilidad…….……...……..... 15

4.2.2.2 Precisión Intermedia……. 16

4.2.3 Especificidad…… 16

4.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación……. 18

4.2.5 Linealidad y Rango……...…… 20

4.2.6 Robustez……... 22

4.2.7 Idoneidad del sistema……... 24

4.2.8 Cromatografía Liquida de alta Resolución…….……. 27

4.3 Ibuprofeno……...……...……... 31

4.3.1 Propiedades físico-químicas del Ibuprofeno……....……... 31

4.3.2 Propiedades Fármaco-terapéuticas del Ibuprofeno…… 32

4.4 Incertidumbre……. 34

5. Hipótesis……..... 42

6. Diseño Metodológico..……..... 43

7. Análisis de Resultados……...…….. 54

8. Conclusiones…….…… 82

9. Recomendaciones…….…… 83

10. Bibliografía……. 84

11. Anexos…… 86

1. INTRODUCCION

En la industria farmacéutica las normas que rigen la elaboración de los medicamentos tienen el propósito de regular todas las etapas de la vida útil de los mismo, es decir, desde su desarrollo, fabricación y como producto terminado, con el objetivo de obtener medicamentos con altos estándares de calidad**.**

Por tal razón, los laboratorios de ensayos, ya sea de primera, segunda o de tercera parte, deben demostrar que los métodos analíticos utilizados en la verificación de la calidad de los medicamentos, 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, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados precisos, exactos y con un nivel de confianza.

Las autoridades de nuestro país, que regulan la calidad de los medicamentos, han establecido como una exigencia legal realizar la validación de los métodos analíticos de cada medicamento que va a ser comercializado, con el propósito de garantizar la seguridad, calidad y eficacia del producto. Ante esta situación, y con el fin de cumplir con dichas exigencias legales, se realizó la validación del método de análisis de cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600 mg por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con el objetivo de dar respuesta a la solicitud de análisis de este analito y de esta manera brindar un servicio confiable.

El método utilizado para la cuantificación de este analito, es el establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos USP 33/NF28, pero realizándole algunas modificaciones con el fin de adaptarlo a nuestras condiciones. La metodología analítica descrita se validó aplicando el RTCA 11.03.39:06 *Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la calidad de los Medicamentos,* el cual establece los siguientes parámetros de desempeño analítico: Exactitud, Precisión, Selectividad, Linealidad, además, se estudiaron otros parámetros incluidos en el procedimiento de validación del laboratorio, como Límite de Cuantificación, Límite de Detección y Robustez.

Los datos obtenidos permitieron demostrar la capacidad de desempeño del método para cumplir con los requisitos establecidos por el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León (LCCM), lo que permitirá su implementación como ensayo de rutina para la cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600 mg.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es apta la metodología analítica para la cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución?

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Validar el método analítico de cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600 mg por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Objetivos Específicos:

- Demostrar que el método analítico es adecuado para el análisis de cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600mg.

- Establecer la metodología a seguir en la validación del método analítico para la cuantificación de Ibuprofeno tabletas por HPLC.

- Determinar los parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión, selectividad, robustez, límite de cuantificación y límite de detección.

- Estimar la Incertidumbre del mensurando, asociada a los resultados obtenidos de las mediciones del método.

4. MARCO TEORICO

4.1 Validación

4.1.1 Generalidades:

- **Definición**

El termino 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: [1]

- Especificar e implementar.
- Aprobar.
- Documentar.

Veamos dos de las posibles definiciones de validación: [1]

- 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 calidad previamente establecidos.

Otros términos relacionados con la validación

- **Cualificación**

El termino 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.[1]

- **Calibración**

Conjunto de operaciones que determinan, bajo sus condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.[1]

En resumen, los términos "validación, cualificación y calibración", son conceptos que suelen emplearse de forma indistinta, sin embargo conceptualmente son diferentes. Validar es verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. Cualificar es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (maquina, equipo, instrumento, etc.). Calibración es una parte de la cualificación. Por consiguiente los métodos deben de ser validados y los aparatos ser cualificados.[1]

4.1.2 Razones que justifican la validación de los métodos analíticos

- 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.[1]
- 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.
- Trabajar con métodos validados permite no solo conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.[1]

4.1.3 Para iniciar la validación es necesario previamente: [1]

- Tener perfectamente caracterizado el analito.

- 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.
- 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. Solo 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.

4.1.4 Métodos susceptibles de ser validados

Son validables los métodos analíticos clasificados de la siguiente forma: [1]

- 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 límites de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos.

4.1.5 Clasificación de los métodos analíticos: [11]

4.1.5.1 Métodos no normalizados:

Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o método nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.

4.1.5.2 Métodos normalizados.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no este normalizado, se puede realizar una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la son aceptable.[11]

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una Validación Prospectiva, generando a través de análisis de datos experimentales.[11]

4.1.6 Clasificación de las metodologías para su validación según la USP:

Según la USP 33/NF 27 y el RTCA, las metodologías se clasifican en cuatro categorías para su validación y dependiendo de la categoría los parámetros a evaluarse. [5, 10]

- **Categoría I**:

Los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

- **Categoría II**:

Los procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

- **Categoría III**:

Los procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño.

- **Categoría IV**:

Pruebas de identificación.

La validación de metodologías analíticas se fundamenta a determinación de los siguientes parámetros, que se aplican de acuerdo a la categoría que pertenezcan. En la siguiente tabla se presenta lo antes dicho*:* [5, 10]

Parámetros de desempeño requeridos para la validación de 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

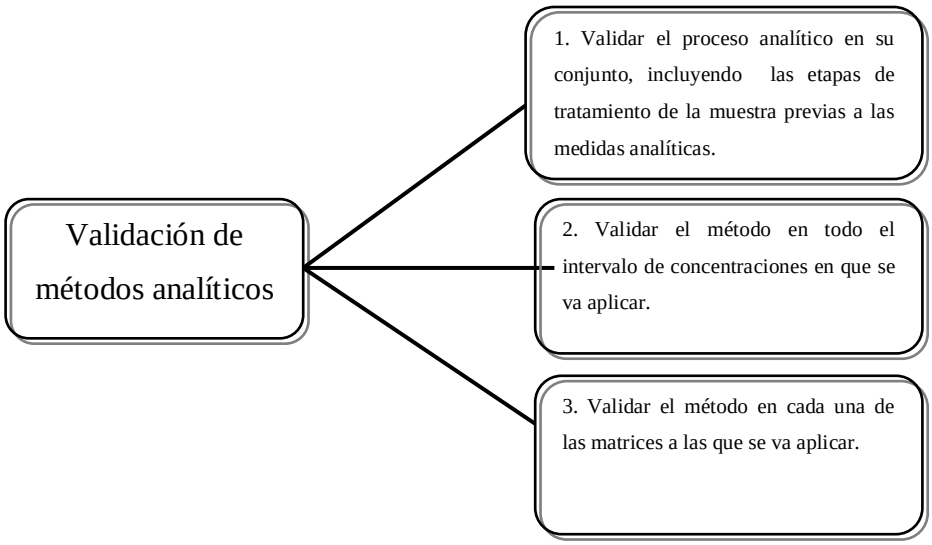
***Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba.**

Según la metodología de análisis que se realice, las validaciones pueden ser:

Prospectivas ⇒ para metodologías nuevas.

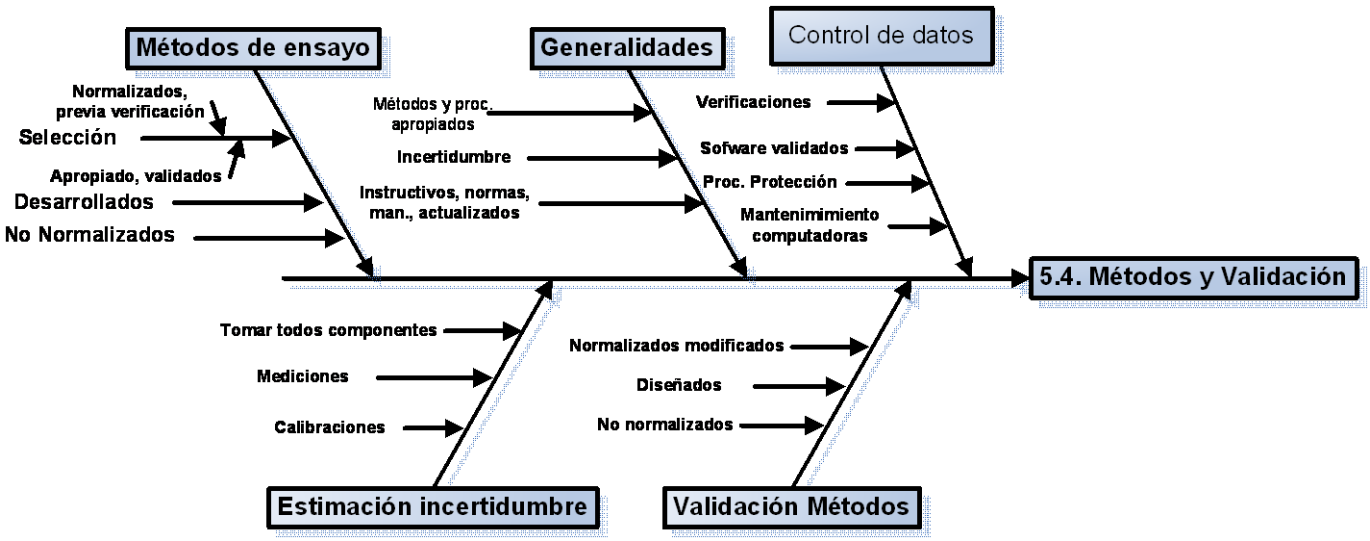
Retrospectivas ⇒ para metodologías muy utilizadas que no han sido validadas y de las cuales se posee suficiente información para ser validadas.

Para llevar a cabo la validación de un método analítico, es preciso tener en cuenta tres aspectos básicos que, por su importancia, Massart (1997) denomina las reglas de oro de la validación. [17]



4.1.7 Requisitos para la selección y validación de métodos según ISO/IEC 17025:2005

Para garantizar la calidad de los resultados a los clientes, la norma ISO/IEC 17025:2005 establece que el laboratorio debe utilizar métodos normalizados. Es decir validados y verificados. En el diagrama de Ishikawa se presenta de manera resumida los componentes: [11]

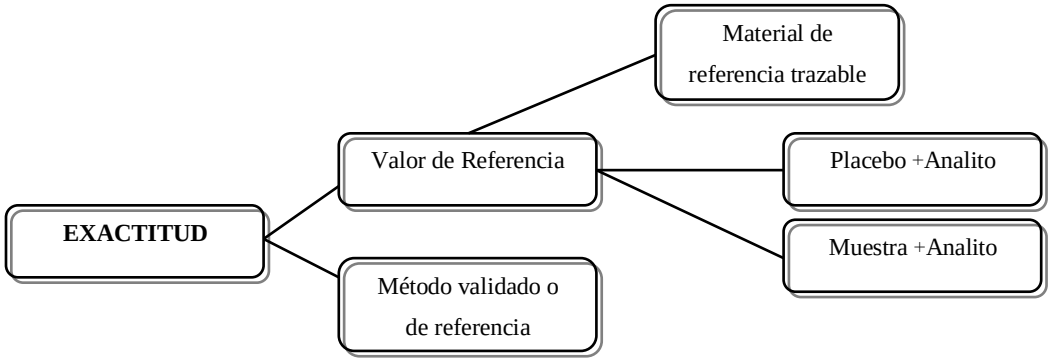


4.2 Parámetros de desempeño analítico:

4.2.1 EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.[5]

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.[5]



4.2.1.1. Determinación de exactitud:

Existen diferentes maneras para determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis.[1]

- **Comparación con un estándar o material de referencia certificado**

El material de referencia puede ser obtenido en el mercado o preparado internamente en el laboratorio. Se analiza por replicado el material, por el método a validar y se compara el resultado obtenido con el valor verdadero declarado, este método se encuentra limitado por la disponibilidad y la estabilidad del material de referencia, así como por el grado de certidumbre que se tenga del valor verdadero de la concentración del material de referencia.[1]

- **Comparación con un método oficial, validado o estandarizado.**

Verificación

La muestra debe ser analizada, utilizando el método a validar y un segundo método bien caracterizado, el cual debe tener una exactitud bien definida y establecida. Se analizan 6 muestras por replicado a la concentración normal de trabajo por ambos métodos.[1]

Criterio de aceptación

Se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA), del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados.[1]

- **Adición de patrón:**

Verificación

Se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: [1]

- **Con placebo:** Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, luego el placebo se enriquece con estándar.
- **Con muestra:** Cuando no es posible contar con un placebo, se determinan por replicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

En ambos casos se preparan soluciones de placebo o de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método. ICH (International Conference Harmonization), recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. En el caso en que se trabaje con muestra enriquecida, para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de contenido del principio activo en la muestra antes de la adición estándar.[1]

Los documentos ICH recomiendan que se evalué la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración). [5]

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales.[5]

Recobro 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 la matriz. Para minimizar este efecto se utiliza el método de adición patrón en la curva de calibración.

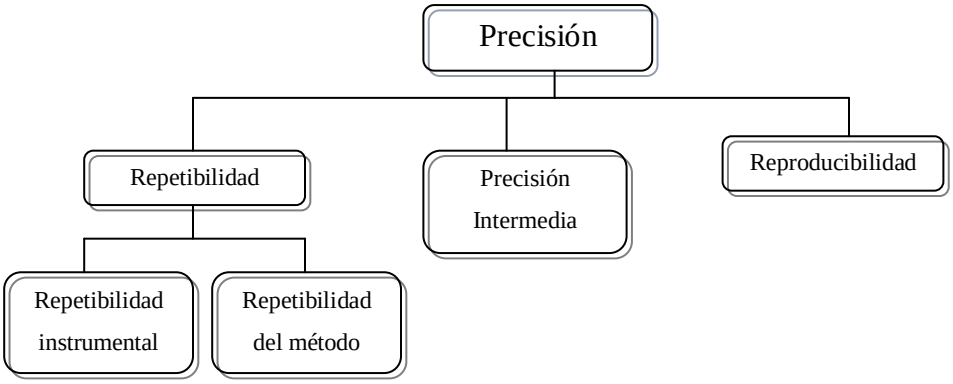
Para determinar si existe o no efecto matriz se estima el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de calibración de la muestra versus la curva de calibración del estándar.

4.2.2. PRECISION

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. [5]

La precisión engloba diferentes tipos de estudio: [1]



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.

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

Reproducibilidad: estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

En la siguiente tabla se resumen los factores que pueden o no pueden variar en el estudio de la Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. [1]

Factor	Repetibilidad	Precisión Intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores (columnas cromatográficas, reactivos, condiciones ambientales, etc.)	Igual	Diferente	Diferente

Laboratorio	Igual	Igual	Diferente

Variación de factores en el estudio de la precisión.

4.2.2.1 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.

4.2.2.1.1 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, y en el caso de analizar impurezas a la concentración del límite especificado.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

4.2.2.1.2 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 la muestra) hasta el final (lectura de los resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se propone dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 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 repuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado. [1]

4.2.2.2 Precisión intermedia

El objetivo de 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 loes 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 esta dentro de los límites establecidos. [1]

4.2.3 ESPECIFICIDAD

Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. [5]

La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios: [5]

Pruebas de Identificación: garantizan la identidad del analito.

Pruebas de Pureza: garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, impurezas orgánicas volátiles).

Valoraciones: proporcionan un resultado exacto, que permita una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. [5]

Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños. [5]

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo, luz, calor, humedad, hidrolisis ácida y alcalina, oxidación).

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos de cromatografía, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente. [5]

4.2.4. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

4.2.4.1 Definición.

Se entiende por **límite de cuantificación** de un método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se pude cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada exactitud y precisión; y por **límite de detección** la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.[1]

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es 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.[1]

4.2.4.2 Ámbito de aplicación.

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. Por el contrario se considera necesario establecer únicamente el límite de cuantificación en métodos destinados a la determinación numérica de impurezas.[1]

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 sólo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.[1]

4.2.4.3. Procedimientos de determinación del LD y LC

Método 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. [1]

Este método es el más indicado en el caso de métodos de análisis no instrumentales en los que no se tiene una señal numérica.[1]

Método basado en la relación señal/ ruido

Requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental, se establece la señal ruido que proporciona un blanco o placebo a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos).

En el caso de métodos espectrofotométricos el analista puede obtener fácilmente la lectura de absorbancia de soluciones placebo usando las condiciones instrumentales descritas, 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 mayor (en ocasiones se admite hasta un valor de 20) 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.[1]

Es posible que no sea necesario alcanzar el verdadero límite del método siempre y cuando el LC encontrado sea inferior al 50% del valor límite de las especificaciones de impurezas.[1]

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

De acuerdo con la IUPAC, puede calcularse el LD y el 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.[1]

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

Utilizados típicamente en métodos cromatográficos GC o HPLC. En éstos se ha de tener en cuenta también la señal media obtenida del análisis correspondiente al placebo, es decir, el ruido de fondo del sistema (Y_{bl}) con lo que la expresión final sería: [4]

$$C_l = Y_{bl} + (K^* S_{bl}$$

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, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Para ello el método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los limites 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 del analito. De la misma manera se sustituye en la formula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco.[1]

Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta Respuesta frente a concentración, y aplicar las mismas fórmulas que las expuestas en el apartado anterior.[1]

Método experimental de cálculo para el LC (Método EURACHEM).

Cuando no existe la posibilidad de tener una muestra placebo o cuando se especifica un criterio concreto de precisión y exactitud, un método experimental, sencillo y eficaz, para el cálculo de LC es el método EURACHEM.[1]

Consiste en preparar una serie de muestras con cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando CV (%) de la precisión frente a la concentración de cada muestra.[1]

Normalmente se fija un criterio de precisión de un CV igual a 10% en el límite de cuantificación, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20 %, en función de las características del método.[1]

4.2.5 LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. [5]

El rango de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.[5]

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados. Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales. [5]

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.
La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación: [5]

Valoración de un Fármaco (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.

Determinación de una Impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.

Para Uniformidad del Contenido: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica.

Para Pruebas de Disolución: +20% por encima del intervalo especificado

4.2.6 ROBUSTEZ

4.2.6.1 Definición.

La robustez de un método analítico se define 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 válida en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización. [1]

4.2.6.2 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 laboratorio. En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provoca 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 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.[1]

4.2.6.3 Procedimientos de determinación de la robustez. [1]

1. Identificar los factores que se verificarán.
2. Definir los diferentes niveles para los factores.
3. Seleccionar el diseño experimental.
4. Definir el diseño experimental.
5. Definir las respuestas a ser determinadas.
6. Realizar el experimento y determinar las respuestas del método.
7. Calcular el o los efectos.

8. Análisis gráfico o estadístico de los efectos.
9. Obtener las conclusiones de acuerdo al análisis estadístico y si es necesario, tomar las medidas necesarias para mejorar el desempeño del método.

- **Factores y niveles de influencia**.[1]

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, que 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.[1]

Pero en el caso de la cromatografía, por ejemplo si hay presente más de un analito interesará estudiar la influencia de cada factor sobre los parámetros que después definirán el test de idoneidad del método. 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. [1]

En cualquier método los factores a evaluar pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos: [1]

- **Cuantitativos:** valor del pH, valor de la temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil, etc.
- **Cualitativos:** fabricante de la columna cromatográfica, fabricante de un determinado reactivo, etc.

Una vez determinado los factores se han de fijar los márgenes de variación que se quieren evaluar, por ejemplo para el pH sería un margen de ±0.1 u. referente al valor nominal descrito.[1]

Tras establecer los factores a estudiar, la forma más sencilla de comprobar la influencia de cada uno de ellos sobre el método seria comprobar los resultados obtenidos modificando dicho factor pero manteniendo constante los demás.

No obstante esto conlleva a dos problemas:[1]

- 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.

- **Diseños factoriales fraccionadas:** Esta es la forma más eficaz de estudiar la robustez. Normalmente se utilizan dos tipos de diseños factoriales:[1]
  - Diseños factoriales completos y fraccionados.
  - Diseños de Plackett y Youden-Steiner.

Ejemplos del diseño factorial:[1]

- Diseño factorial completa de ocho experimentos para evaluar la influencia de tres factores.
- Diseño factorial fraccionado de ocho experimentos para evaluar la influencia de cuatro factores.
- Diseños factoriales de Plackett-Burman.
- Diseños factoriales de Youden-Steiner.

4.2.7 IDONEIDAD DEL SISTEMA

4.2.7.1 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 instrumento) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. [1]

4.2.7.2 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.

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. [1]

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 estos han tenido sobre el comportamiento del método.

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. Estos ensayos no solo 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. [1]

4.2.7.3 Parámetros de evaluación:

Los parámetros de evaluación de idoneidad se pueden agrupar en tres categorías: [1]

- Precisión
- Parámetros Cromatográficos:
    - Factor de capacidad (k')
    - Numero de platos teóricos (N)
    - Factor de asimetría o de cola
    - Resolución

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 USP 24 establece como criterio un coeficiente de variación igual o inferior al 2% en la inyección de 5 replicados.[1]

La FDA (Nov. 1994) recomienda un coeficiente de variación inferior al 1% para un mínimo de 5 inyecciones en el caso de principio activo, aceptando valores de 5-15% cuando se trata de impurezas o productos de degradación.[1]

Según la EP (Addendum 2001) el número de inyecciones de una solución de referencia depende del coeficiente de variación máximo permitido por el error analítico de método (B). Se entiende por error analítico máximo del método la diferencia entre el límite superior del intervalo de especificación y el 100. [1]

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 y tiempo de retención. [1]

Parámetros Cromatográficos: [1]

- **Factor de capacidad (k'):** Se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eludir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_o). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como: [1]
- **Número de platos teóricos (N):** 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. [1]

El cálculo del número de platos teóricos se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico. 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.). [1]

- **Factor de asimetría o de cola**

Es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito. Existen varias fórmulas de cálculo que toman la anchura de ambos lados de pico a distintas alturas. [1]

Un pico perfectamente simétrico tendrá un factor de cola de 1.0. Un pico que presente un ensanchamiento por el inicio del pico tendrá valores inferiores a la unidad, mientras que si presenta cola el factor de asimetría será superior a la unidad.

Como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0. [1]

La presencia de picos asimétricos también puede incrementar el límite de detección, dificultar la resolución entre los picos y la reproducibilidad a largo plazo debido a la variabilidad entre los lotes de columnas con distintos efectos de retención secundaria.

Otras posibles causas de asimetría en los picos se pueden atribuir a:

- Muestra sobrecargada, disolvente inapropiado o mal inyectado.
- Suciedad en los filtros (fritados)
- Volumen vacío o suciedad en cabeza de columna
- Envejecimiento de la columna
- Calidad de la columna (contenido de metales pesados, silanoles libres)
- pH de la fase móvil (tampón).

➢ **Resolución**

La resolución es la medida de separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. [1]

4.2.8 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

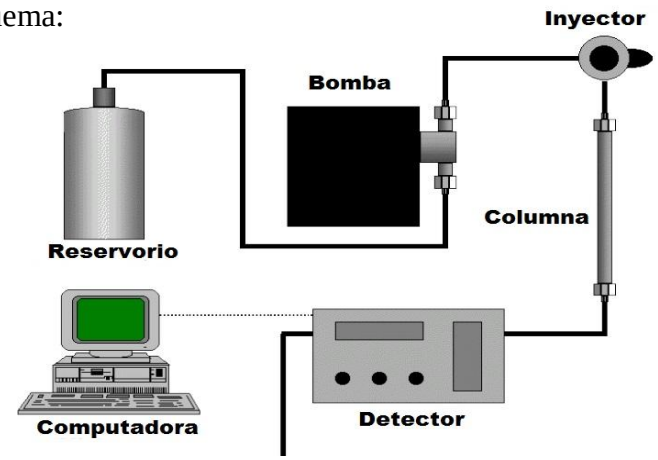
La cromatografía HPLC es una metodología ampliamente utilizada que está avalada por los organismos de control gubernamental. Se caracteriza por permitir la identificación y la cuantificación del producto analizado y de las impurezas que lo acompañan. Sin embargo el equipo es costoso, requiere de personal técnico experimentado, y el pre-tratamiento de la muestra puede ser largo. Adicionalmente se conoce que en el caso de análisis de comprimidos, los excipientes de los mismos pueden dificultar la aplicación de esta técnica cromatográfica.[5]

La cromatografía moderna es un método utilizado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los mismos se distribuyen entre una fase estacionaria, mientras que la otra fase se mueve mediante el empleo de altas presiones a través de una columna, teoría conocida como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleada para realizar diferentes ensayos tales como identificación, purificación y cuantificación.

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede clasificarse en:

- **Cromatografía de adsorción:** La fase estacionaria es un sólido y se utiliza casi exclusivamente sílice (sílice) y en casos discretos alúmina.
- **Cromatografía de reparto o partición**: Actualmente se utiliza como fase estacionaria compuestos ligados químicamente a un soporte sólido de sílice. Se puede subdividir en cromatografía en fase normal y en fase inversa (usualmente mal llamada reversa por traducción de "reversed"). En la cromatografía en fase normal la fase estacionaria es polar (como por ejemplo sílice) y la fase móvil es poco polar (hexano, diclorometano, cloroformo). En esta modalidad los compuestos más polares quedan más retenidos mientras que los menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar (octaldecilsiloxano) y la fase móvil de polaridad moderada (como agua, alcohol metílico, acetonitrilo).En este caso, las sustancias más polares eluyen primero y las hidrofóbicas quedan más retenidas.
- **Cromatografía de iónes.:** Se utilizan columnas rellenas con fases estacionarias con una determinada carga que retienen iones de carga opuesta. Las fases estacionarias para la modalidad clásica de esta cromatografía son las resinas de intercambio iónico.
- **Cromatografía de exclusión por tamaño:** La fase estacionaria está formada por partículas de porosidad definida y uniforme. Las moléculas de mayor tamaño tienen menor capacidad para acceder a los poros y por mantenerse "excluidas" eluyen más rápido, mientras que las de menor tamaño que pueden penetrar en los poros y permanecer allí más tiempo eluyen en último lugar.[5]

Un equipo para cromatografía líquida de alta resolución puede representarse por el siguiente esquema:



La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado.

Cuando en toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo es normal realizar gradientes de composición de solvente para aumentar el rango de polaridades de sustancias a separar acortando el tiempo total de análisis. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas. La bomba envía al solvente hacia la válvula inyectora a través de tuberías de diámetro pequeño, de acero inoxidable o de plásticos especiales.

El objeto de utilizar este tipo de válvulas es de no interrumpir el flujo de fase móvil a través de la columna e introducir en el flujo de la misma un volumen de muestra que estará contenida en un tramo de tubería de volumen fijo (loop). Luego de que se produce la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector que genera una señal eléctrica ante el pasaje de los analitos proporcional a la cantidad de sustancia. Esa señal es enviada al registrador o a la PC en donde queda registrado el cromatograma. En el caso ideal los picos cromatográficos son gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador puede calcular además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del loop de inyección y de la columna, y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas.

Parámetros Relevantes

Los parámetros teóricos que caracterizan las separaciones cromatográficas por HPLC son idénticos a los descriptos en cromatografía gaseosa. En HPLC, en lugar de variar la temperatura de la columna para mejorar la resolución del cromatograma, se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de la separación utilizando mezclas de entre dos y cuatro solventes.[5]

Etapas del Análisis de una Muestra

Son idénticas a las puntualizadas para cromatografía gaseosa. En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales, en este caso es posible realizar ensayos preliminares orientativos utilizando cromatografía en capa delgada con la misma fase estacionaria que contiene la columna.

Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir las tuberías y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y producir inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 μm. Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de solvente por vacío o por burbujeo con Helio y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil.

Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Existen tres métodos para la filtración previa de los Solventes en HPLC:

- Filtro a la Entrada del Solvente
- Filtración al Vacío
- Filtración en Línea [16]

Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC

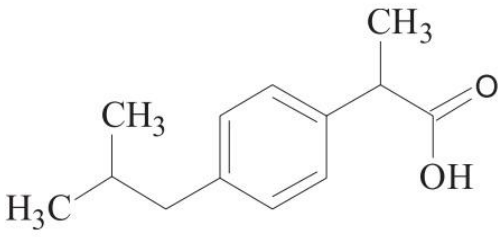
Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- Sonificación
- Burbujear Helio
- Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo
- Desgasificación al Vacío en Línea [15]

4.3 IBUPROFENO

4.3.1 Propiedades físico-químicas del ibuprofeno:[7]

Estructura química del Ibuprofeno



Formula Molecular: $C_{13}H_{18}O_2$

Peso Molecular: 206.28

Nombre Químico:- Acido Benceno acético, a-metil-4-(2-metil propil), (+)-.
(+)-p-Acido isobutilhidratropico.
-Acido (+)-2-(p-isobutilfenil) propionico.

Descripción: Un polvo cristalino blanco a blancuzco que tiene un ligero olor característico.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua; muy soluble en alcohol, en acetona, en cloroformo, y en alcohol metílico; ligeramente soluble en acetato de etilo.

Punto de Fusión: 75 ° a 78 °

Constante de disociación pKa: 4.4, 5.2.

Pureza: contienen no menos de 90,0 % y no más de 110,0 % de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$.

Conservación: Almacenar en contenedores herméticos.

4.3.2 Propiedades fármaco-terapéuticas del Ibuprofeno:

El Ibuprofeno es el primer miembro derivado del ácido propiónico, es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), con características analgésicas, antitérmica, antiinflamatoria y antiagregante plaquetario. El ibuprofeno es considerado como uno de los compuestos más seguros de su clase. [3]

El Ibuprofeno se formula en comprimidos, cápsulas, cápsulas oblongadas y cápsulas de gelatina que contienen 50 a 800 mg; como gotas orales y en una suspensión oral. Las formas de dosis que contienen < 200mg se comercializan sin necesidad de prescripción.

El Ibuprofeno está autorizado para comercializarse en combinaciones de dosis fijas con antihistamínicos, descongestivos, oxicodona e hidrocodona.

4.3.3 Mecanismo de acción.

El Ibuprofeno es un inhibidor no selectivo de la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas (PG) y tromboxanos. Alguno de estos estos eicosanoides participan, en grado diverso, en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINE sería responsable de su actividad terapéutica, aunque, dada su participación en determinados procesos fisiológicos, dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas características de estos fármacos. [3]

4.3.4 Farmacocinética y Metabolismo

El Ibuprofeno se absorbe con rapidez, y en término de una a dos horas se advierten sus concentraciones máximas en plasma. La vida media en plasma es de unas dos horas, con los supositorios, la absorción también es eficaz, aunque más lenta.

El Ibuprofeno se liga ampliamente a proteínas plasmáticas (99%), pero ocupa solo una fracción de los sitios totales de unión de ellas, al fármaco en las cifras habituales, pasa lentamente al interior de los espacios sinoviales y en ellos pueden permanecer a concentraciones mayores en tanto disminuyen las del plasma. En animales de experimentación, el Ibuprofeno y sus metabolitos pasan fácilmente la placenta.

La excreción del ibuprofeno es rápida y completa, más del 90% de la dosis ingerida se excreta por la orina en forma de metabolitos y sus conjugados. Los principales metabolitos son un compuesto hidroxilado y otro carboxilado. [6]

4.3.5. Aplicaciones Terapéuticas:

- Tratamiento del dolor agudo, leve/ moderado. Dosis 200-400 mg/ 4-6 horas.
- Fiebre y dismenorrea. Dosis 200-400mg/ 4-6 horas.
- Antitérmico en niños mayores de 6 meses. Dosis unitaria: 5-10mg/Kg, cada 4-6 horas.
- Antirreumático en adultos. Dosis oral: 1.200-3.200mg/ día, dividida en 3-4 tomas. En niños: 20-40mg/Kg/día, en 3-4 tomas.
- Tratamiento sintomático de artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis gotosa aguda.
- En el tratamiento de la artritis reumatoide y la artrosis se puede utilizar dosis menores o iguales a 800mg cuatro veces al día. [3,6]

4.3.6. Reacciones Adversas: [3,6]

- Irritación gástrica.
- Problemas hemorrágicos.
- Erupciones cutáneas.
- Edemas periféricos.
- Tinnitus.
- Mareos.
- Pirosis.
- Dolor epigástrico.
- Cefalea.
- Somnolencia
- Dispepsia
- Ansiedad.
- Visión borrosa.

- Agranulocitosis.
- Anemia plástica.
- Insuficiencia renal.

4.3.7. Efectos colaterales menos frecuentes incluyen:[36]

- Trombocitopenia.
- Lesiones cutáneas.
- Ambliopía toxica.
- Retención de líquido.
- Edema.

4.3.8. Interacciones Farmacológicas:

Se ha demostrado que el Ibuprofeno interfiere en los efectos antiplaquetarios del ácido acetilsalicílico. No se ha demostrado que los derivados del ácido propiónico como la Ibuprofeno modifiquen la farmacocinética de los hipoglucemiantes orales o de la warfarina.

4.4 Incertidumbre

4.4.1. Definición.

La definición del término incertidumbre (medición) usada en este protocolo y tomada de la versión corriente, adoptada por el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales de Metodología es: Un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.[13]

El mensurando**,** Es la concentración de un analito, no obstante, en análisis químico es usado para medir otras cantidades como por ejemplo: color, pH, etc., y por consiguiente el término general de mensurando será utilizado.[13]

El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo dado de éste), o el ancho de un intervalo de seguridad. [13]

4.4.2 Origen de la incertidumbre de la medida

Parece evidente que no es posible obtener valores exactos como resultados de las medidas, ya que existen correcciones residuales debido a la inestabilidad de las magnitudes de influencia o a valores inexactos de patrones y equipos de medidas. Por otro lado, el valor obtenido cuando se decide interrumpir la aplicación de las sucesivas correcciones suele denominarse valor convencionalmente verdadero, es decir, es el mejor valor que puede obtenerse con los mejores medios disponibles.[13]

Las causas principales de la incertidumbre, coinciden con los factores que influyen en los resultados de la medición que podían ser agrupados según las cinco M: [13]

- **Mé**todo de medición.
- **M**edios humanos (Operador)
- **M**edios y equipos (Instrumento de medida)
- **M**edio ambiente (Magnitudes de influencia)
- **M**ensurando (Magnitud física objeto de la medición)

4.4.3 Proceso de estimación de la incertidumbre de medida:[13]

- Modelización de la medición
- Evaluación de los componentes de la incertidumbre
- Evaluación de la varianza compuesta
- Estimación de la incertidumbre expandida

4.4.4 Fuentes de incertidumbre

En la práctica la incertidumbre del resultado puede provenir de diferentes fuentes posibles, como por ejemplo: [14]

- Definición incompleta
- Muestreo
- Efectos de la matriz e interferencias
- Condiciones ambientales
- Incertidumbre de las masas y equipo volumétrico
- Valores de referencia

- Aproximaciones y suposiciones incorporadas en el método de medición y procedimiento, y variación al azar.

Para expresar la incertidumbre se emplean tres símbolos:[12]

- La **incertidumbre estándar** (*u*) expresa el concepto como una desviación estándar.
- **Incertidumbre estándar combinada:** incertidumbre estándar de una medida cuando dicho resultado se obtiene a partir de los valores de otras magnitudes. Se calcula a partir de las incertidumbres estándar de dichas magnitudes, aplicando la propagación de la ley de errores aleatorios. Se expresa por u_c(y)
- La **incertidumbre expandida** (*U*) define un intervalo que abarca una fracción grande de valores dentro de los cuales caerá la cantidad que se está midiendo y se obtiene multiplicando u_c por un factor de cobertura, k, elegido según el grado de confianza exigido para el rango es decir, $U= u_c(y)* k$. Puesto que *u* es análoga a una deviación estándar, si k es 2 (este es el valor por defecto generalmente tomado si no se da otra información), entonces *U* proporciona aproximadamente una mitad del intervalo de confianza del 95%.

4.4.5. Error e incertidumbre [12]

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 asi 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 defectos casuales causan variaciones en las observaciones repetidas del mensurado. 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 medida 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 medida debido a algunos efectos casuales. El valor exacto del error casual en la medida 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 del mismo mensurado, 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.

4.4.6 Tipos de Incertidumbre

De acuerdo al documento Guide totheExpression of Uncertainty in Measurement, una guía general, avalada por los organismos BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, OIML, señala que existe dos tipos de incertidumbre, que designa con las letras A y B, dependiendo de la forma como se han obtenido sus valores para incorporarlos en los cálculos de la incertidumbre combinada o expandida.[12]

- **Incertidumbre tipo A:** representa componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de serie de resultados (por tanto, experimentalmente en un laboratorio y generalmente expresada por desviaciones estándar).[12]

- **Incertidumbre tipo B:** también pueden caracterizarse por desviaciones estándar, son aquellas que se evalúan a partir de distribuciones de probabilidad supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información. Son valores que generalmente no se han obtenido en el propio laboratorio; por ejemplo a través de certificados que acompañan al material volumétrico, a los materiales de referencia, etc.[12]

4.4.7 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 irrompible de comparaciones con incertidumbres expresadas".[14]

La trazabilidad del resultado del procedimiento analítico completo debería ser establecida por una combinación de los siguientes procedimientos:[14]

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

Cada procedimiento es discutido, por separado, a continuación:[14]

- Calibración del equipo de medición.
- Mediciones usando Métodos Principales.
- Mediciones usando un material de Referencia (RM) de una sustancia pura.
- Medición de un material de Referencia certificado (CRM)
- Medición usando un procedimiento aceptado
- El proceso de estimación de la medición de la incertidumbre

Trazabilidad externa: [14]

La función metrológica debe disponer de unos laboratorios externos que tengan capacidad para evidenciar su trazabilidad, por ejemplo, a través de su acreditación o, en caso contrario, mediante la demostración de su trazabilidad por otros métodos, siendo aconsejable que puedan demostrar que cumple con los requisitos de la ISO 17025. En este último caso, es necesario que puedan aportar evidencia de la trazabilidad de la calibración de los propios patrones que se han utilizado de la calibración en cuestión. También sería conveniente que se pudiese evidenciar la validación o el uso de métodos

normalizados a través del análisis de la hoja de datos de la calibración, que ya algunos laboratorios lo incorporan como anexo al certificado.

Trazabilidad interna: [14]

Mediante el cumplimiento del plan de calibración y el uso del diagrama de niveles que facilitará la identificación de los grupos de calibración interno y, por tanto, la trazabilidad interna.

En ambos casos debe garantizarse que el equipo de medición se utiliza en el rango de calibración, ya que no es posible extrapolar los resultados de la calibración. Es decir, la trazabilidad solo está garantizada en el rango de calibración.

Trazabilidad en magnitudes no pertenecientes al Sistema Internacional:[14]

Existen algunas áreas metrológicas en las que no es posible garantizar la trazabilidad a patrones internacionales, simplemente porque estos no existen. En estos casos, suele ser habitual utilizar, con el mismo enfoque que se utiliza un patrón en el SI, un material de referencia certificado.

En algunos casos, ni siquiera será posible contar con la existencia de un material de referencia certificado, por lo que es necesario recurrir a otros métodos para establecer la referencia común y determinar la veracidad de la medición. Entre estos métodos destaca un anillo de intercomparación entre varios laboratorios, donde el objetivo sea establecer una referencia común. En este caso, la trazabilidad queda garantizada únicamente a este anillo de laboratorio.

Procedimiento para evaluar y expresar incertidumbres

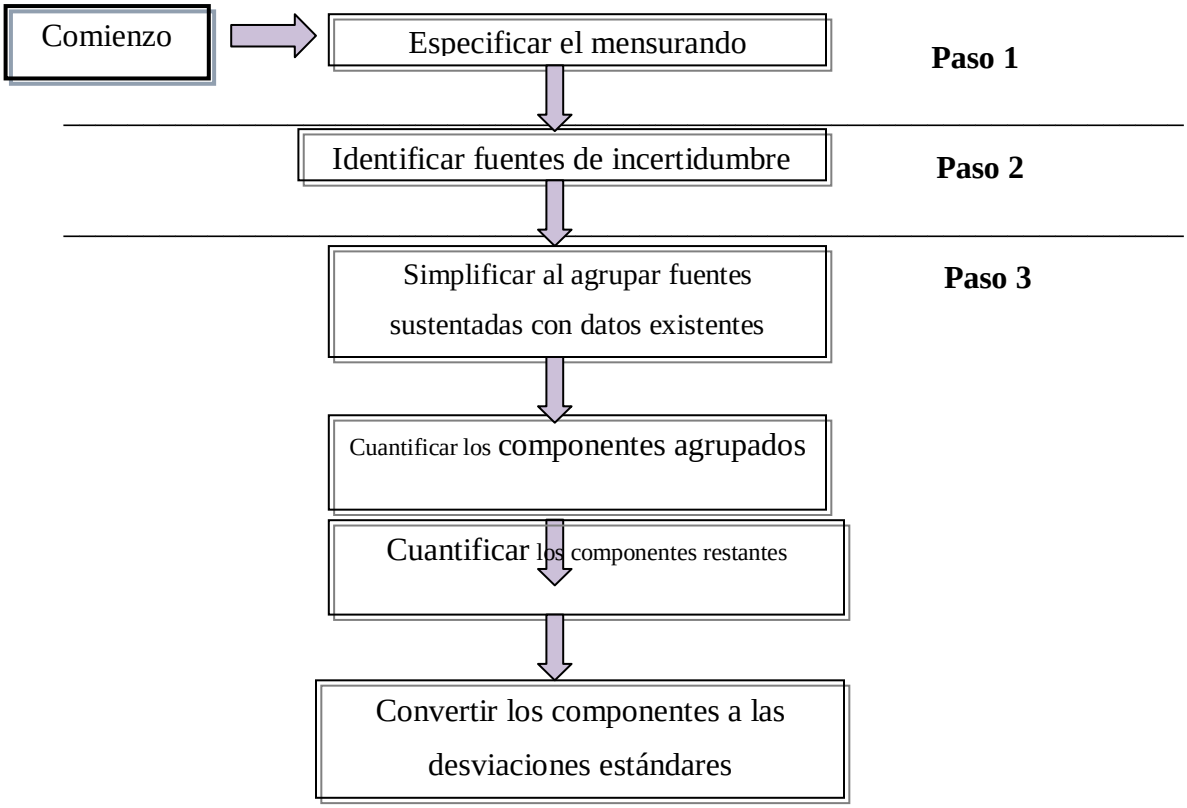
En el año de 1995, EURACHEM, publicó un documento sobre el cálculo de incertidumbres en las medidas analíticas (Quantifyinguncertainty in analyticalmeasurement). En dicho documento se matizan las etapas a seguir para estimar incertidumbres en los laboratorios analíticos: [12]

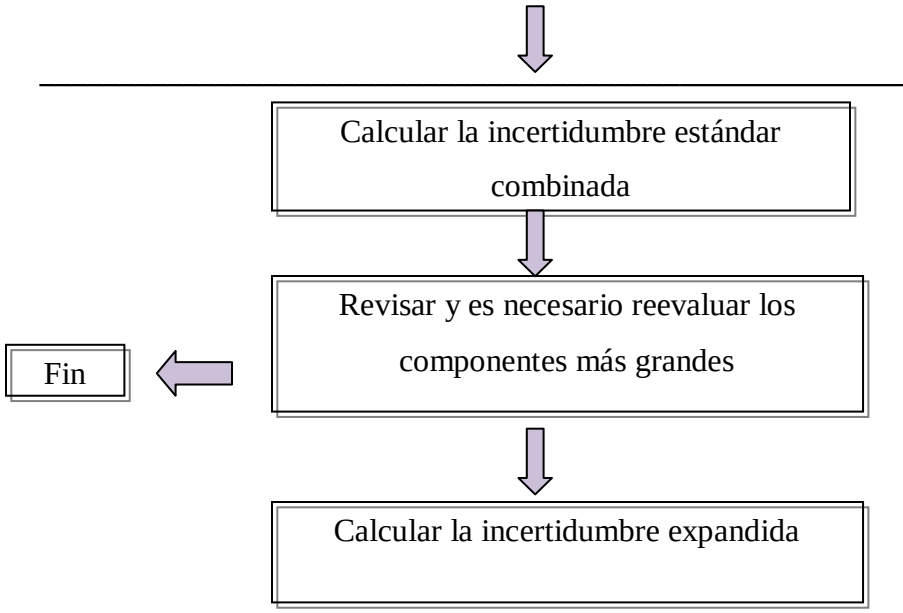
- Etapa. *Especificación* (identificación clara), tanto del mesurado como del procedimiento experimental de medida.
- Etapa. *Identificación de las fuentes de incertidumbre*. Se trata de enumerar las fuentes potenciales de incertidumbre de un proceso analítico concreto (por ejemplo, el muestreo, la extracción, los equipos de medida, la pureza de los reactivo, etc.). Algunas

de estas fuentes de incertidumbre pueden no ser totalmente independientes y sería necesario establecer covarianza.

- Etapa. *Cuantificación de la incertidumbre*. Se trata de simplificar al máximo el problema. Para ello se hace primero una estimación preliminar del orden de magnitud de cada componente de la lista para eliminar aquellos no significativos y agrupar otros componentes que puedan estimarse globalmente. Se señalan cuatro formas básicas para estimar los componentes individuales :
    - Cuantificación experimental.
    - Empleo de materiales de referencia.
    - Estimaciones basadas en resultados o datos previos.
    - Estimaciones basadas en el criterio del analista.
- Etapa. *Calculo de la incertidumbre combinada*, a través de las leyes de propagación de incertidumbres.
- Etapa. *Calculo de la incertidumbre expandida* para un cierto nivel de confianza (generalmente, el 95%, en cuyo caso el factor de cobertura es *k*= 2).

La siguiente figura muestra el proceso esquemáticamente: [14]




Calcular la incertidumbre estándar combinada
Revisar y es necesario reevaluar los componentes más grandes
Fin
Calcular la incertidumbre expandida

Paso 4

5. HIPOTESIS

La metodología analítica de cuantificación del Ibuprofeno en tabletas de 600 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es un método idóneo para la cuantificación de este analito.

6. DISEÑO METODOLOGICO

6.1 Tipo de estudio

Experimental. Validación tipo prospectiva.

6.2 Área de estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de control de calidad de medicamentos, de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-LEON.

6.3 Población de estudio

Todas las tabletas de Ibuprofeno de 600 mg que ingresaron al Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. UNAN-LEON.

6.4 Muestra

Se tomaron 50 tabletas de ibuprofeno de 600 mg con lote # 065.

6.5 Alcance

Cuantificación de ibuprofeno en tabletas de 600 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

6.6. Plan de Análisis

El procesamiento de los datos obtenidos en cada parámetro se realizó a través del programa Microsoft Excel 2007, donde se crearon tablas y gráficos necesarios para el análisis de los resultados; y el programa Maple 17, donde se efectuaron cálculos de Incertidumbre.

6.7. Condiciones Cromatográficas.

Columna cromatográfica	**Eclipse XDB-C8**
Fase móvil	Acido Cloroacético y Acetonitrilo (40:60)
Detector	PDA
Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Temperatura de la columna	30ºC
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de inyección	5 min
Tiempo de retención	3.39 min
Concentración de estándar y Muestra	1mg/ mL

6.8 Reactivos y Materiales:

Tabla de Materiales	
Nombre	**Descripción**
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC o CLAR)	Cromatógrafo líquido: VARIAN HPLC. Con bomba cuaternaria y cuatro recipientes para solventes; automostrador (inyección automática); Bandeja de viales, horno para la columna, lámpara de deuterio y detector espectrofotométrico con series de diodos.
Columna cromatográfica	Eclipse XDB-C8; Marca: Agilent, tamaño de partícula 5µm de diámetro.
Balanza analítica	Marca AND; modelo GH-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 20 a 30ºC y Humedad Relativa: ≤80%
Balanza analítica	Marca AND; modelo HM-120; Capacidad: Max: 120g y Min: 0.0001g; Desviación: 0.1mg; Condiciones Operacional Ambiental: Temperatura: 20 a 30ºC y Humedad Relativa: ≤80%
Ultrasonic cleaner	Marca: Bransonic; Modelo: B3-R. Baño ultrasónico para clarificar soluciones.
Bomba de succión	Para filtrar y desgasificar solventes o la fase móvil.
Pipetas volumétricas	pipetas de 5 ml, 10 mL marca KIMAX
Pipetas serológicas	Pipeta de 5, 10 y 20 mL marca KIMAX Y FISHERbrand
Filtros	Filtro de membrana marca WHATMAN, de tamaño de poro de 0.45 µm y diámetro de 47 mm.
Balones	Balones de 100 ±0.8, 50 ±0.05, 25 ±0.03 mL. Marca: KIMAX; tipo A.
Espátulas	Espátula de acero inoxidable utilizado para pesar reactivos y patrones.
Probetas	Probetas de 1000, 500 y 25 mL. Marca: PYREX
Jeringa de Plástico	Para la toma de la muestra
Viales	Marca VARIAN para cargar la muestra que va a ser cromatografiada.
Destilador de Agua	Barnstead FISR TREEMI III
Beaker	Beaker de 250 y 100 mL

	Marca: KIMAX, PYREX
Pera de Succión	Marca: D&N
Agitador	Marca: Sybron; Modelo: 2 thermoly type 7200 Stir- light.
Magneto	Magneto para agitar las soluciones.
PH-metro	pH-metro Mettler Toledo Seven Easy

Tabla de Reactivos			
Nombre	**Grado**	**Descripción**	**Formula química**
Acido Cloroacético	Reactivo	Cristales incoloros o blancos. Marca: Fisher Scientific	$C_2H_3ClO_2$
Acetonitrilo	HPLC	Liquido incoloro Marca: MERCK	CH_3CN
Hidróxido de Amonio	Reactivo	Liquido incoloro	(NH_4) OH
Agua	Destilada	Agua destilada densidad 1g/ml Marca: Fisher Scientific	H_2O
Estándar de Ibuprofeno	Estándar USP	Polvo blanco, inodoro.	$C_{13}H_{18}O_2$

6.9 Procedimiento analítico para la cuantificación de Ibuprofeno en tabletas.

Preparación de soluciones:

- **Preparación de la fase móvil:**

Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de ácido cloroacético y acetonitrilo en una proporción de 40:60 en 1000 mL: disolver 4.0 g de ácido cloroacético en 400 mL de agua y ajustar el pH de esta solución con hidróxido de amonio a un pH de 3.0 ± 0.05, agregar 600 mL de acetonitrilo a la solución anterior, y mezclar.

La fase móvil preparada anteriormente se utiliza para la preparación del estándar y la muestra de Ibuprofeno.

- **Preparación del estándar de Ibuprofeno:**

Pesar aproximadamente 50 mg de estándar de Ibuprofeno y transferirlo a un balón volumétrico de 50 mL, disolver con fase móvil, tapar y sonificar durante 10 minutos, llevar a temperatura ambiente y aforar con fase móvil. Luego filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 µm, descartar los primeros mL. Tomar una cantidad suficiente del filtrado y llenar los viales (concentración del estándar: 1mg/mL).

- **Preparación de la muestra:**

Pesar individualmente 20 tabletas de Ibuprofeno y reducirlas a polvo fino; de este polvo pesar una cantidad equivalente a 50 mg de principio activo y transferirlos a un balón volumétrico de 50 mL, disolver con fase móvil, tapar y sonificar durante10 minutos, llevar a temperatura ambiente y aforar con fase móvil. Filtrar la solución y tomar una cantidad del filtrado que sea suficiente para llenar los viales (concentración de la muestra: 1 mg/mL).

6.10 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación

6.10.1 Linealidad

- **Determinación experimental de la linealidad:**

Para la determinación experimental de la linealidad, preparar 7 soluciones de estándar de Ibuprofeno a 7 concentraciones diferentes: 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% y 130% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo. Leer cada solución por triplicado, comenzando desde la concentración más baja hasta la más alta y en las condiciones establecidas en el método de análisis. Luego, graficar 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 procedimiento anterior, pero ahora trabajando con la matriz de Ibuprofeno (tabletas).

Realizar el procesamiento estadístico de los resultados determinando:

- Coeficiente de Determinación.
- Coeficiente de Variación de los factores respuesta.
- Intervalo de confianza para el intercepto.
- Intervalo de confianza para pendiente.
- Prueba t para la pendiente.
- Prueba t para el intercepto.
- Test de Cochran.
- Gráfico de los residuales.
- Análisis de Varianza ANOVA.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor que 0.999
- El CV de los factores de repuesta no debe ser superior al 2%.
- El intervalo de confianza para el intercepto: el intervalo debe incluir el valor de cero.
- El intervalo de confianza para la pendiente: el intervalo no debe incluir el valor de cero.
- Prueba t para pendiente: $t_{exp} > t_{tabla.}$
- Prueba t para el intercepto: $t_{exp} < t_{tabla.}$
- Test de Cochran: $G_{exp} < G_{tabla.}$
- Gráfico de los residuales: la distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.
- Análisis de varianza ANOVA: $F1_{exp} > F1_{tabla}$

$$F2_{exp} < F2_{tabla.}$$

6.10.2 Exactitud

- **Determinación experimental de la exactitud**

La exactitud se determina a través del método adición patrón. Preparar soluciones muestras a tres niveles de concentración, 80%, 100% y 120% de la concentración

nominal de trabajo. Tomar alícuotas de 5 ml de la solución madre de Ibuprofeno y adicionar cantidades crecientes de la solución estándar de Ibuprofeno hasta lograr el porcentaje teórico previamente descrito.

Cada muestra se inyecta al Cromatógrafo 3 veces, y se lee según las condiciones establecidas en el método de análisis. Inyectar las muestras desde la concentración más baja hasta la más alta.

Graficar la concentración de la curva de calibración normal (CCN) y curva de adición patrón (CAP) en función de las áreas obtenidas y confrontar las varianzas de ambas curvas a través de la prueba de Fisher. A partir de las pendientes de ambas curvas estimar el porcentaje de recobro y establecer si existe efecto de matriz

Criterios de aceptación:

- Porcentaje de recobro debe estar entre 100 ± 2.0 %
- Coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.999.
- CV menor al 2%.
- Prueba de Fisher: $F_{exp} < F_{tab.}$
- Prueba t para la recuperación media $t_{cal} < t_{tab}$

6.10.3 Precisión

- **Repetibilidad del sistema instrumental:**

Preparar una solución estándar de Ibuprofeno a la concentración nominal, analizarla por un día, un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Realizar, consecutivamente, nueve inyecciones al Cromatógrafo. Obtener las áreas de cada cromatograma y tabular los resultados.

- **Criterio de aceptación:**

- El CV de la repetibilidad del sistema instrumental no debe ser superior al 2.0%.

- **Repetibilidad del método:**

Preparar tres soluciones muestras de Ibuprofeno a tres niveles de concentración: 80%, 100%, y 120 %. Analizarlas por un día, un mismo analista y en el mismo instrumento de medida. Inyectar al Cromatógrafo cada solución por triplicado. Obtener las áreas de cada cromatograma y tabular los resultados.

Realizar el procesamiento estadístico de los resultados determinando:

- Coeficiente de variación de las concentraciones encontradas.
- Porcentaje recuperado.
- Intervalos de confianza a cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación:

- El CV no debe ser mayor al 2%.
- Porcentaje Recuperado entre 100 ± 3.0 %.
- Las concentraciones encontradas están dentro del intervalo de confianza calculado.

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

Para la determinación de la precisión intermedia del sistema y del método estudiar la influencia de dos factores, factor día y factor analista. Cada analista debe preparar por tres días, una solución estándar (precisión intermedia del sistema) y una solución muestra (precisión intermedia del método) a la concentración nominal de trabajo. Leer cada solución por triplicado.

Realizar el procesamiento estadístico de los resultados determinando:

- El Coeficiente de Variación Global de las áreas obtenidas.
- ANOVA de dos factores.
- Test de Bartlett entre analistas.
- Test de Bartlett entre días.

Criterios de aceptación:

- El Coeficiente de Variación Global generado durante los tres días no debe ser mayor al 2%**.**
- ANOVA: $F_{exp} < F_{critico}$ entre analistas y entre días.
- Bartlett: $M < X^2_{0.95}$ (entre analistas)

  $M < X^2_{0.95}$ (entre días).

6.10.4 Selectividad

- **Determinación experimental de la selectividad**

Para estudiar la selectividad del método se analizan muestras de Ibuprofeno a diferentes condiciones de estrés:

1. Hidrólisis básica: solución de NaOH 1N
2. Hidrólisis ácida: solución de HCL 1N
3. Oxidación: solución de H_2O_2 30%

El tiempo de exposición de las muestras, en las condiciones de estrés, es de dos horas. Cada muestra se inyecta al Cromatógrafo 3 veces, y se leen según las condiciones establecidas en el método de análisis. Se registran los cromatogramas y se comparan con el de la solución de estándar de Ibuprofeno.

- **Criterios de aceptación:**

- Se comprueba que no haya interferencia en la zona de elución del Ibuprofeno (tiempo de retención).
- Se confirma que los productos de degradación no eluyen en la zona en la cual eluye el analito.

6.10.5 Robustez

- **Determinación experimental de la Robustez**

La robustez se verifica mediante un análisis factorial 2^3, realizándose un total de 8 experimentos. Los factores de variación son el pH de la fase móvil, la temperatura del horno de la columna y la proporción del solvente orgánico usado para la elución del soluto. La matriz seguida en la realización de los experimentos es la siguiente:

N° de Experimentos	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Matriz de la Robustez.

N° de Experimentos	A	B	C
	Temperatura(ºC)	**Proporción. (Solv. Org)**	**pH**
1	**29**	**68**	**2.9**
2	**31**	**68**	**2.9**
3	**29**	**72**	**2.9**
4	**31**	**72**	**2.9**
5	**29**	**68**	**3.1**
6	**31**	**68**	**3.1**
7	**29**	**72**	**3.1**
8	**31**	**72**	**3.1**

Tabla. Estudio de la Robustez.

Preparar dos soluciones muestra de Ibuprofeno a la concentración nominal de trabajo en fase móvil con pH 2.9 y 3.1.

Inyectar estas soluciones tres veces al Cromatógrafo, en las condiciones establecidas en la tabla anterior. Obtener el área promedio y las desviaciones estándares de los resultados obtenidos en cada experimento.

Calcular la influencia de cada factor mediante la siguiente fórmula:

Influencia del factor A: A= 1/4(-R1+R2-R3+R4-R5+R6-R7+R8)

Influencia del factor B: B= 1/4(-R1-R2+R3+R4-R5-R6+R7+R8)

Influencia del factor C: C= 1/4(-R1-R2-R3-R4+R5+R6+R7+R8)

Y la influencia de la interacción entre los factores mediante la siguiente fórmula:

AB= 1/4 (+R1-R2-R3+R4+R5-R6-R7+R8)

AC= 1/4 (+R1-R2+R3-R4-R5+R6-R7+R8)

BC= 1/4 (+R1+R2-R3-R4-R5-R6+R7+R8)

ABC= 1/4 (-R1+R2+R3-R4+R5-R6-R7+R8)

- **Criterios de aceptación:**

Si el efecto es mayor a dos veces la desviación estándar agrupada, los efectos son significativos.

6.10.6 Límite de Detección:

- **Determinación experimental del límite de detección**

La estimación del límite de detección del método de ensayo, se determina a través de la desviación estándar residual de la linealidad del sistema y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$LD = 3.3\ S/b_1$$

6.10.7 Límite de Cuantificación:

- **Determinación experimental del límite de cuantificación**

La estimación del límite de cuantificación del método de ensayo, se determina a través de la desviación estándar residual de la linealidad del sistema y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$LC = 10\ S/b_1$$

6.10.8 Estabilidad

- **Determinación experimental de la estabilidad del estándar**

Para realizar el estudio de estabilidad del estándar se prepara una solución estándar, a la concentración nominal (1mg/mL), y se lee por triplicado durante tres días.

- **Criterios de aceptación:**

  Los datos obtenidos del estudio de estabilidad se colocan en las cartas de control de precisión intermedia del sistema. La solución se mantiene estable durante el tiempo en el cual el proceso se mantenga bajo control estadístico.

6.10.9 Idoneidad del Sistema

Preparar una solución estándar de Ibuprofeno a la concentración nominal de 1mg/mL, realizar 5 inyecciones al Cromatógrafo.

Determinar:

- Coeficiente de variación de las áreas obtenidas.
- Números de platos teóricos.
- Factor de capacidad.
- Factor de asimetría.

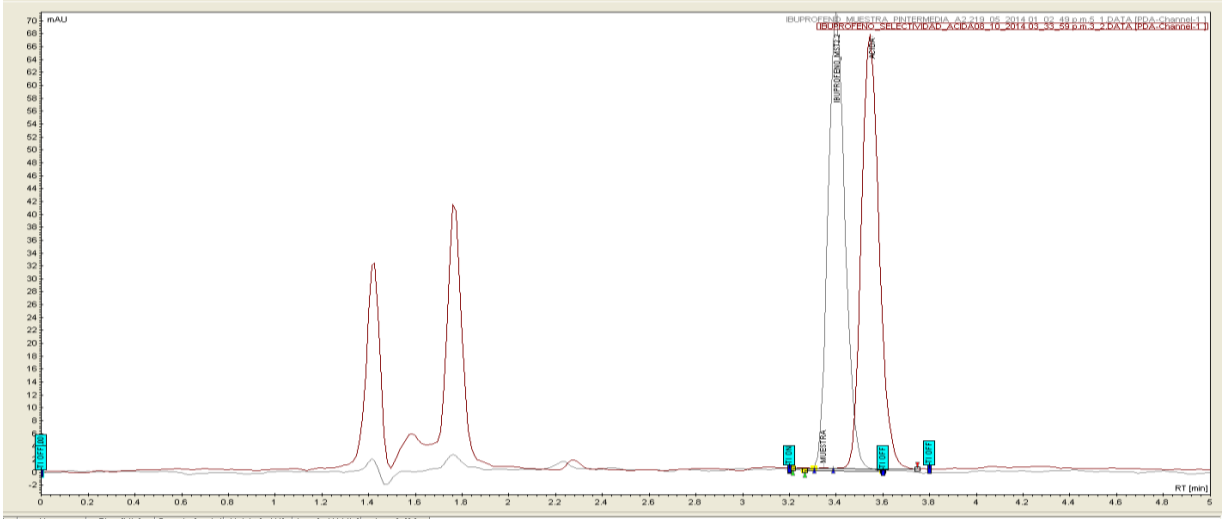
Criterios de aceptación:

- Coeficiente de Variación menor al 2%.
- Numero de platos teóricos mayor a 2000.
- Factor de capacidad mayor de 1.
- Factor de asimetría menor a 2.

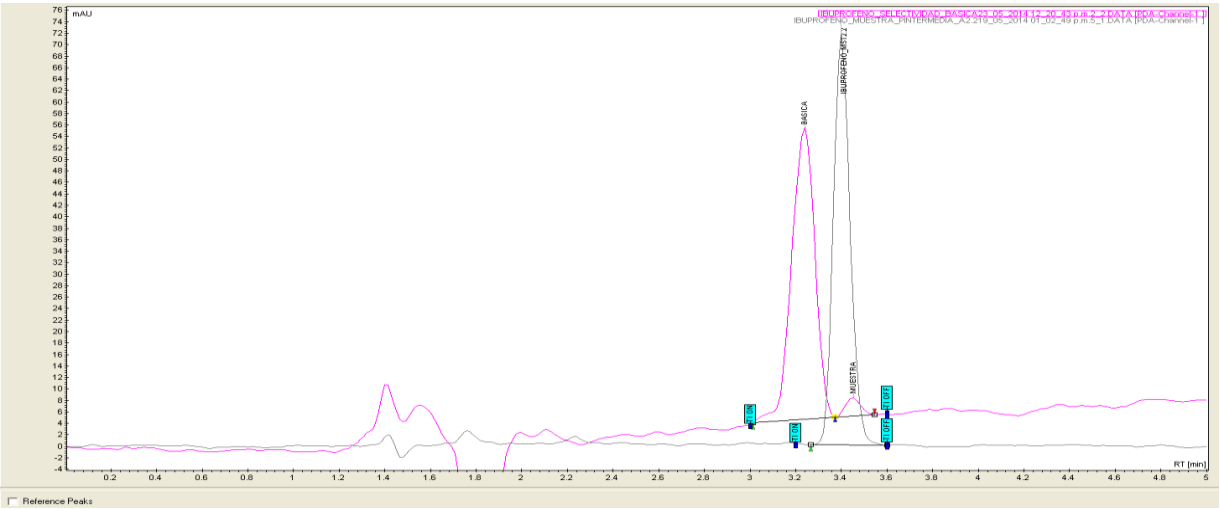
7. Análisis de Resultados.

7.1. Selectividad:

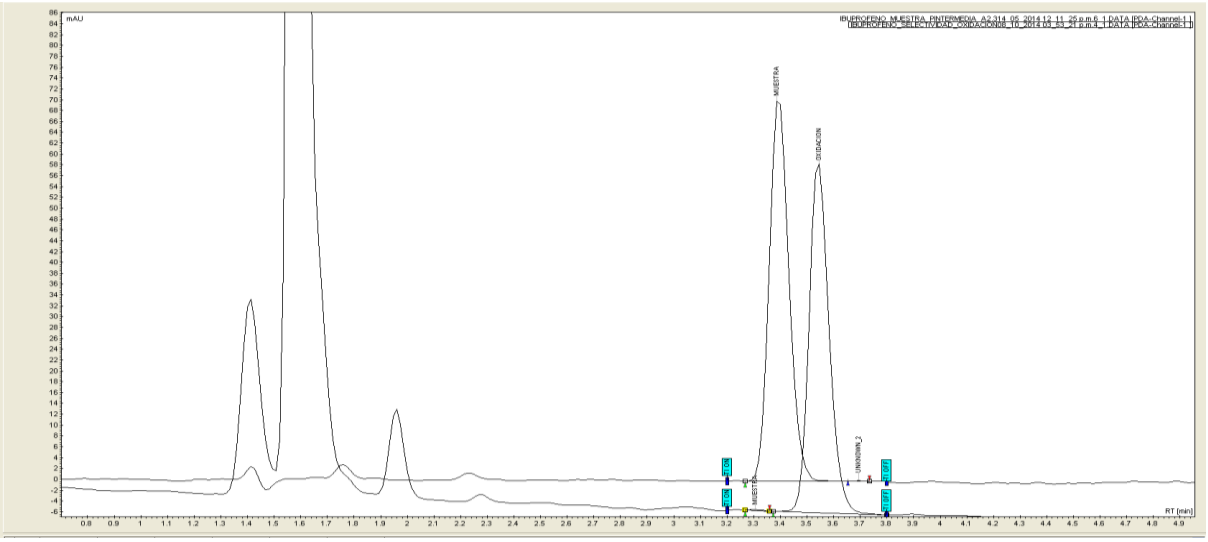
Los cromatogramas de la degradación acelerada del Ibuprofeno en medio básico, ácido y por oxidación con peróxido se muestra en las figura 1, 2, y 3. En los cromatogramas de estas soluciones se deja ver que los productos de degradación del Ibuprofeno no muestran ninguna señal a los 3.39 minutos, tiempo de retención característico para el Ibuprofeno; por lo que el método es selectivo para identificar y cuantificar de forma selectiva el Ibuprofeno bajo las condiciones de análisis descritas.



Cromatograma 1: Hidrólisis Acida.



Cromatograma 2: Hidrólisis Básica.



Cromatograma 3: Oxidación con peróxido.

7.2 Idoneidad del Sistema:

Los resultados para el estudio de la Idoneidad del sistema se muestran en la tabla 1.

Parámetro	Valor
Numero de Platos Teóricos	8747.04
Factor de Asimetría	1.09
Tiempo de Retención	3.39
Factor de Capacidad	1.42

Tabla 1. **Resultados del Estudio del Sistema Cromatográfico**

El número de platos teóricos obtenidos fue mayor a 2000 (valor establecido por el AEFI) lo que nos indica la eficacia del sistema cromatográfico. El factor de asimetría obtenido fue de 1.09 menor al criterio que es no mayor de 2. Y el factor de capacidad obtenido fue de 1.42 cumpliendo con el criterio que debe ser mayor a la unidad, por lo cual el sistema cromatográfico fue idóneo para llevar a cabo la validación del método analítico para la cuantificación de Ibuprofeno en tabletas de 600mg.

7.2.1 Precisión.

Para la determinación de la precisión instrumental, en el test de idoneidad, se preparó una solución de estándar de Ibuprofeno a la concentración nominal, la cual se inyectó por 5 veces, obteniéndose los resultados de la tabla 2.

N° de Lecturas	**Concentración en mg/mL**	**Aéreas**
1	1mg/ mL	6.24
2	1mg/ mL	6.28
3	1mg/ mL	6.30
4	1mg/ mL	6.35
5	1mg/ mL	6.37
Promedio		6.31
Desviación Estándar		0.05
CV%		0.82%

Tabla 2. **Datos de Precisión Idoneidad del Sistema.**

El coeficiente de variación de las áreas es menor al criterio de aceptación que es del 2%.

7.3. Estudio de la Estabilidad:

Para el estudio de estabilidad se preparó una solución estándar de Ibuprofeno a la concentración nominal de 1mg/mL y se midieron las aéreas de los picos durante tres días consecutivos.

En el gráfico 1, se muestran los resultados obtenidos al realizar el estudio de estabilidad del Estándar de Ibuprofeno, en el que se observa que el estándar permanece estable debido a que no presentó ningún cambio al transcurrir los 3 días de estudio.

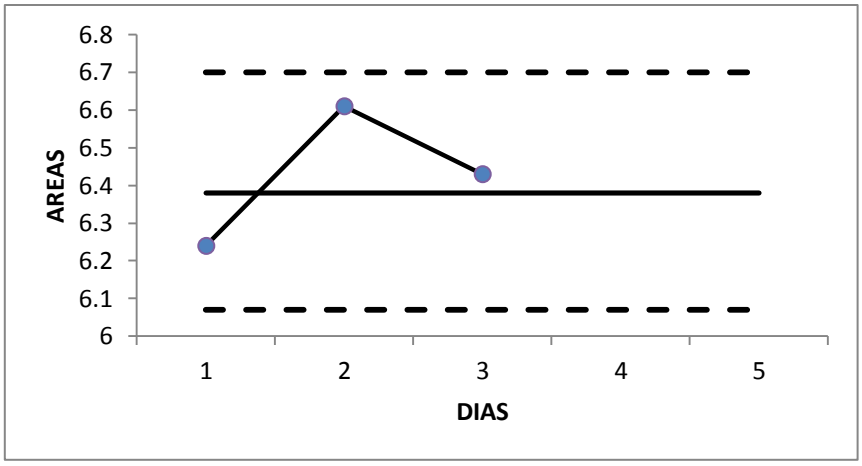


***Gráfico1*. Estudio de la Estabilidad del Estándar.**

7.3. Precisión Intermedia del Sistema:

Para el estudio de la Precisión intermedia del sistema instrumental, se estudió la influencia de dos factores: factor día y factor analista. Cada analista, durante tres días, preparó una solución estándar de Ibuprofeno a la concentración de 1mg/mL y se midieron las áreas de los picos por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla número 3.

ANALISTA	**DIA 1**	**DIA 2**	**DIA3**
	AREA	AREA	AREA
A1	6.21	6.39	6.32
	6.18	6.41	6.30
	6.27	6.13	6.30
A2	6.60	6.36	6.18
	6.52	6.45	6.22
	6.57	6.42	6.14

***Tabla 3.* Datos de Precisión Intermedia del Sistema.**

Se aplicó el test de HUBER para verificar la existencia de datos atípicos, no encontrándose ninguno, debido a que todos los valores se encuentran dentro del intervalo calculado en el test (5.96-6.66).

Se determinó el coeficiente de variación global para observar la variabilidad de los resultados, siendo éste de 0.9%, menor al criterio de aceptación que es no mayor al 2%. Según el coeficiente de variación el sistema es capaz de producir resultados precisos.

Para estudiar la precisión intermedia de las mediciones analíticas se demostró la homogeneidad en las varianzas por medio del test de Bartlett. El valor calculado del test de Bartlett para el estudio de homogeneidad de las varianzas entre analista es de 2.66, siendo el de tabla de 3.84, a un nivel de confianza del 95%. El valor calculado entre los días es de 3.93 siendo el de tabla de 5.99, a un nivel de confianza del 95%, por lo que las varianzas entre los días y analistas son homogéneas y por lo tanto hay precisión entre las mediciones, ya que cumple con el criterio de $M<X^2_{0.95}$.

Factor	M	Grado de Libertad	$X^2_{0.95}$
Analista	2.66	1	3.84
Día	3.93	2	5.99

Tabla 4. **Resultados del test de Bartlett. Precisión intermedia del sistema.**

Para identificar si existen diferencias significativas de los resultados entre los días y analistas se realizó ANOVA de dos factores. La tabla 5 nos muestra los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que los F calculados son menores que los valores de F críticos, por lo tanto se puede decir que no existe diferencia significativa entre los días y entre los analistas.

Orígenes de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	Fcalculado	Fcrítico
Entre Días	0.02343333	2	0.011716667	0.42426071	19
Entre Analista	0.01601667	1	0.016016667	0.57996379	18.5128205
Error	0.05523333	2	0.027616667		

Tabla 5. **ANOVA para el estudio de la Precisión intermedia del sistema instrumental.**

Para identificar los cambios en el proceso de medición en el tiempo, y llevar un control de la calidad en las mediciones de rutina, se elaboraron cartas de control para la exactitud y precisión de las mediciones del sistema. La figura 2 y 3, representan los gráficos de control para los promedios y la desviación estándar de las áreas para los 3 días estudiados.

Se puede observar que tanto los promedios, como la desviación estándar, de los resultados por día, se encuentran dentro de los límites de control establecidos.

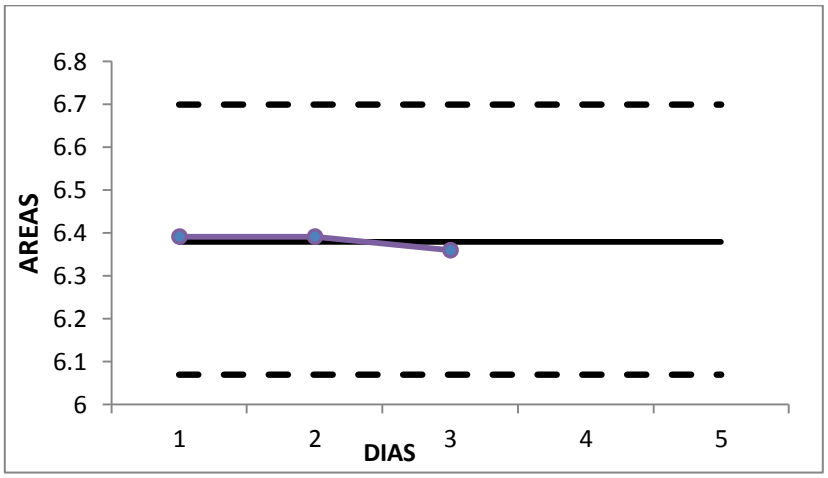


Figura 2. **Gráfico de control para la Exactitud del Sistema.**

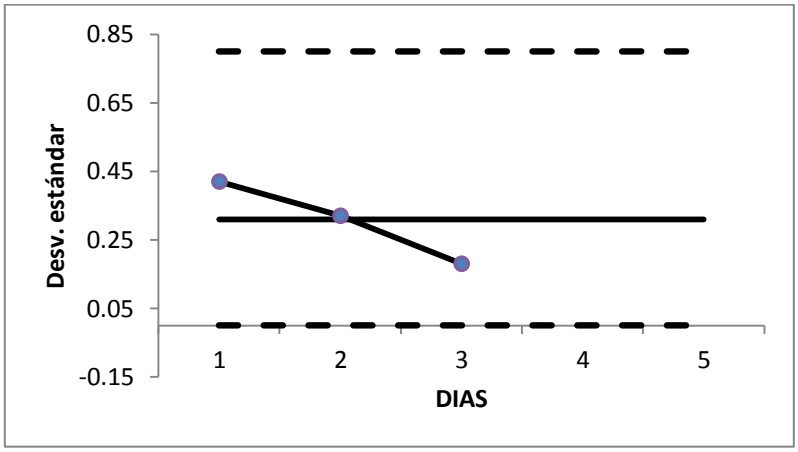


Figura 3. **Gráfico de control para la Precisión del Sistema.**

7.4. Repetibilidad del sistema:

Para el estudio de la Repetibilidad del sistema instrumental, se preparó una solución estándar de Ibuprofeno, a una concentración de 1mg/mL, se analizó repetidamente la solución y se midieron las áreas de los picos por un día.

N° de Lecturas	Áreas
1	6.28
2	6.30
3	6.32
4	6.30
5	6.35
6	6.37
7	6.38
8	6.41
9	6.27
Promedio	6.33
Desvest	0.05
C.V	0.7 %

Tabla 6. **Datos de Repetibilidad del Sistema**

Se determinó el coeficiente de variación global para observar la variabilidad de los resultados siendo de 0.7%, menor al criterio de aceptación (menor de 2 %). Según el resultado del porcentaje de coeficiente de variación, el sistema es capaz de producir resultados precisos.

7.5. Precisión Intermedia del Método:

Para el estudio de la Precisión intermedia del método, se estudió la influencia de dos factores: factor día y factor analista. Cada analista, durante tres días, preparó una solución muestra de Ibuprofeno, a una concentración de 1mg/mL. Se midieron las áreas de los picos por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 7.

	DIA 1	DIA 2	DIA 3
Analista 1	6.15	6.12	6.08
	6.05	6.12	6.08
	6.08	6.13	6.09
Analista 2	6.13	6.16	6.03
	6.15	6.13	6.07
	6.12	6.10	6.09

Tabla 7. **Datos de Precisión Intermedia del Método.**

Se aplicó el test de HUBER para verificar la existencia de datos atípicos, no encontrándose ninguno, debido a que todos los valores se encuentran dentro del intervalo calculado en el test (6.00-6.21).

Se determinó el coeficiente de variación global para observar la variabilidad de los resultados siendo éste de 0.4%, menor al criterio de aceptación (menor al 2%). Según el resultado del porcentaje de coeficiente de variación, el sistema es capaz de producir resultados precisos.

Para estudiar la precisión intermedia de las mediciones analíticas, se demostró la homogeneidad en las varianzas por medio del test de Bartlett. El valor calculado del test de Bartlett para el estudio de homogeneidad de las varianzas entre analista es de 0.72, siendo el de tabla de 3.84, a un nivel de confianza del 95%.

El valor calculado entre los días es de 4.50, siendo el de tabla de 5.99 a un nivel de confianza del 95%, por lo cual, las varianzas entre los días y analistas son homogéneas y por lo tanto hay precisión entre las mediciones, ya que cumple con el criterio de $M<X^2_{0.95}$.

Factor	**M**	**Grado de Libertad**	$\mathbf{X^2_{0.95}}$
Analista	0.72	1	3.84
Día	4.50	2	5.99

Tabla 8. **Resultados del test de Bartlett. Precisión intermedia del Método.**

Para identificar si existen diferencias significativas entre los días y analistas se realizó ANOVA de dos factores. La tabla 9 muestra los resultados para el análisis de varianza, se puede observar que los F calculados son menores que los valores de F críticos, por lo cual, no existe diferencia significativa entre los días y entre los analistas.

Orígenes de las variaciones	**Suma de cuadrados**	**Grados de Libertad**	**Promedio de los Cuadrados**	**Fc**	**Valor critico**
Entre Días	0.00323333	2	0.001616667	3.592592593	19
Entre Analista	0.00015	1	0.00015	0.333333333	18.5128205
Error	0.0009	2	0.00045		

Tabla 9. **ANOVA para el estudio de la precisión Intermedia del método.**

7.6. Repetibilidad del método

Para el estudio de la Repetibilidad del método, se prepararon 3 soluciones muestras de Ibuprofeno, a 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), se analizó repetidamente la muestra por triplicado y se midieron las áreas de los picos por 1 día.

Nº de análisis	**Muestra 1**		**Muestra 2**		**Muestra 3**	
	(0.80 mg/mL) 80%		**(1.0 mg/mL) 100%**		**(1.20 mg/mL) 120%**	
	Área	**$C_{calculada}$(mg/mL)**	**Área**	**$C_{calcuada}$ (mg/mL)**	**Área**	**$C_{calcuada}$(mg/mL)**
1	5.11	0.82	6.12	0.98	7.84	1.25
2	5.11	0.82	6.11	0.98	7.79	1.25
3	5.14	0.82	6.07	0.97	7.83	1.25
Media		0.82		0.98		1.25
S		0.003		0.004		0.005
C.V (%)		0.38		0.45		0.36

Tabla 10. **Datos de Repetibilidad del Método**.

Se determinó el coeficiente de variación global para observar la variabilidad de los resultados siendo éste de 0.40% menor al criterio de aceptación (menor de 2%). Según el porcentaje de coeficiente de variación el sistema es capaz de producir resultados precisos.

Los intervalos de confianza a cada nivel de concentración se muestran en la tabla 11. Se observa que los intervalos de confianza calculados incluyen las medias de los tres niveles de concentración; por lo tanto existe precisión entre los resultados.

Concentración	Intervalo
0.8 mg/ mL	0.81- 0.83
1.0 mg/ mL	1.00 - 0.99
1.2 mg/ mL	1.24- 1.26

Tabla 11. **Intervalos de confianza a cada nivel de concentración.**

El Porcentaje de recobro obtenido fue de 102% que cumple con el criterio de aceptación que es de 97 a 103%.

7.7. Evaluación de la exactitud del método:

Para la evaluación de la exactitud del método, se prepararon soluciones muestras enriquecidas a tres niveles de concentración, 80%, 100% y 120% de la concentración nominal de trabajo del método y se leyeron por triplicado.

Los resultados de las áreas de la muestra sin estándar (X) y la de las soluciones enriquecidas con estándar a las diferentes concentraciones se muestran en la tabla 12.

REPLICAS	X	80%	100%	120%
	Área	Área	Área	Área
1	3.35	5.34	6.46	7.77
2	3.34	5.37	6.44	7.80
3	3.35	5.30	6.45	7.85
PROMEDIO	3.35	5.34	6.45	7.81
C.V (%)	0.17	0.62	0.16	0.52

Tabla 12. **Áreas de las mediciones a diferentes concentraciones.**

Se realizó una curva de calibración de adición patrón (CAP) y una curva de calibración normal (CCN) a 3 niveles de concentración, 80%, 100% y 120% de la concentración

nominal. El gráfico 4 muestra ambas curvas, los parámetros de regresión para las dos curvas se muestran en la tabla 13.

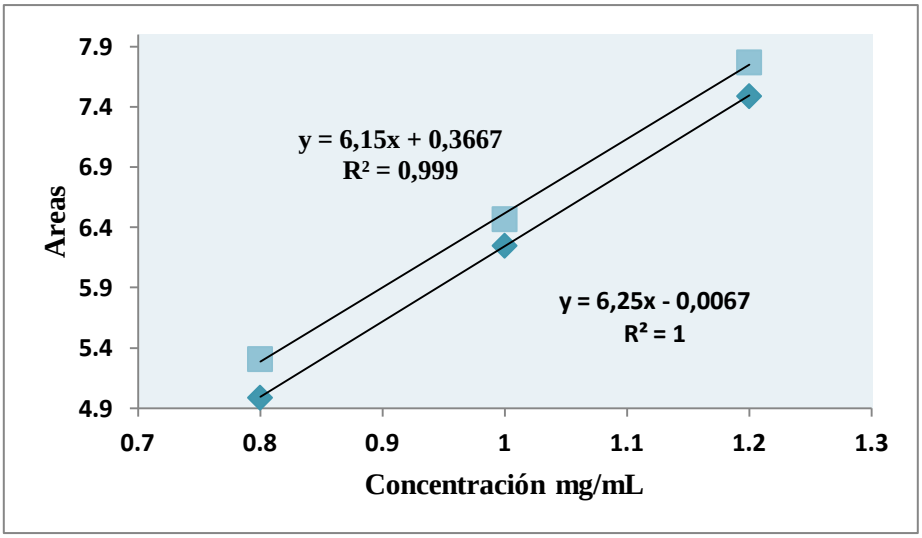


Gráfico 4. **Curvas de Calibración Normal y Curva de Adición Patrón.**

Parámetro	Curva Estándar(CCN)	Curva Muestra(CPA)
Pendiente (b_1)	6.25	6.15
Desv. Est. (Sb_1)	0.0289	0.2021
Var. Residual	0.0001	0.0043

Tabla 13. **Parámetros de la curva de calibración estándar y muestra.**

A partir del Test de Fisher, se demostró la homogeneidad de las varianzas de ambas curvas ya que el F calculado es menor que el F de tabla. Por medio de la t de Student se demostró que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, ya que la t calculada es menor a la t de tabla. Los resultados del test de Fisher y la t de Student se muestran en la siguiente tabla.

Test de Fisher	**F_{cal} = 32.7**	**F_{tab} = 39.0**
t de Student	**t_{cal} =** 1.08	**T_{tab} =** 4.30

Tabla 14. **Resultados del test de Fisher y la t de Student.**

Estimación del recobro

Para evaluar el tipo de efecto que ejerce la matriz, se calculó el porcentaje de recobro por comparación de las pendientes de las curvas de adición patrón y la curva de calibración normal, mediante la ecuación:

$$R_C = \frac{b_{1CPA}}{b_{1CCN}} 100$$

El porcentaje de recobro obtenido es de 98.4 %, lo que nos indica que el tipo de efecto que ejerce la matriz es depresor; es decir, que las interferencias debido a la matriz, producen una disminución en la señal del analito.

7.8. Linealidad del Sistema:

Para la evaluación de la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración estándar a 7 niveles de concentración; los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Nivel de Concentración	Concentración en mg/ m L	Área
70%	0.70	4.43
70%	0.70	4.44
70%	0.70	4.44
80%	0.80	4.99
80%	0.80	4.99
80%	0.80	4.99
90%	0.90	5.62
90%	0.90	5.64
90%	0.90	5.62
100%	1.00	6.25
100%	1.00	6.24
100%	1.00	6.26
110%	1.10	6.85
110%	1.10	6.87
110%	1.10	6.89
120%	1.20	7.48
120%	1.20	7.49
120%	1.20	7.50
130%	1.30	8.07
130%	1.30	8.07
130%	1.30	8.06

***Tabla 15*. Datos de Linealidad del sistema.**

Los parámetros de regresión obtenidos a partir de la curva de calibración se muestran en la siguiente tabla.

Pendiente	**6.2529**
Intercepto	-0.0058
r^2	0.9999
Var. Res.	0.00011364
S_{bo}	9.49401E-05
S_{b1}	0.000141241

Tabla 16. **Parámetros de regresión. Linealidad del Sistema.**

La tabla 15 nos indica que existe una buena linealidad entre los resultados obtenidos. (99.99%). Los coeficientes de correlación y determinación son 1.0000 y 0.9999 respectivamente; lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos en la recta de ajuste y los datos experimentales.

Para verificar la linealidad, se calculó el coeficiente de variación de los factores respuestas obteniendo un valor de 0.16, el cual se encuentra por debajo del criterio de aceptación establecido (CV < 2%), lo que nos demuestra la poca variación de las respuestas obtenidas.

Se estableció que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student, siendo el valor de t experimental mayor que el valor critico establecido (exp= 526.14, t tab= 1.7291), así mismo, se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente, siendo estos de 6.2324 - 6.2734.

La proporcionalidad entre la concentración del analito y las áreas obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla (t exp= -0.5930, t tabla=1.7207), por lo tanto, se cumple con el criterio de que el intercepto tiene que ser estadisticamente igual a cero para un grado de significancia de 0.05. Los intervalos de confianza calculados para la variable independiente corresponden a -0.0226 - 0.0110.

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se aplicó el test de Cochran, en el cual el G_{exp} = 0.1694 es menor al G_{tablas} = 0.4800, a un nivel de significancia de 0.05, por lo

cual podemos afirmar que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Los resultados del test de Cochran se muestran en la siguiente tabla.

Varianza máxima	**0.00011**
Suma de varianzas	**0.00065**
G experimental	**0.1694**
G tabla	**0.4800**

Tabla 17. **Resultados del test de Cochran.**

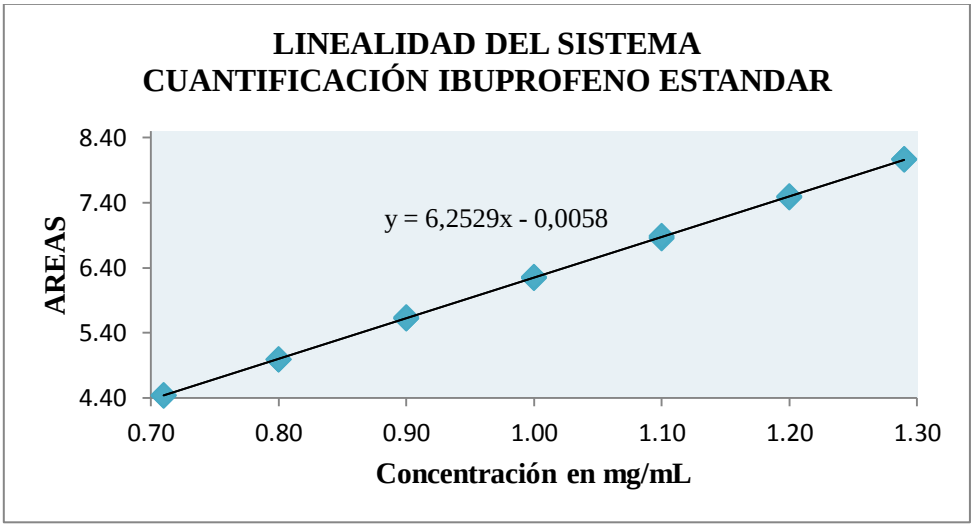


Gráfico 5. **Curva de calibración de la linealidad del Sistema**

La normalidad de los residuales se muestra en el Gráfico 6, donde se puede observar que los residuales se distribuyen aleatoriamente y no reflejan ninguna tendencia, lo que confirma la validez del modelo.

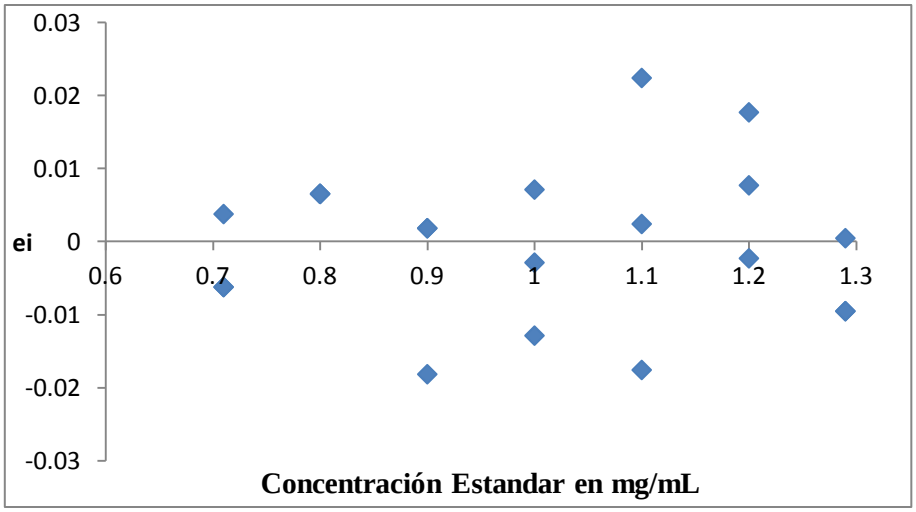


Figura 6. **Gráfico de los residuales.**

Para verificar la validez del modelo, se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, se presenta en la tabla 18. Donde se observa que el F_1 experimental es mayor al F de tabla, lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero y el F_2 experimental es menor que el F de tabla, lo que demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Verificación	Suma de Cuadrados	G.l	Varianza	Fexp	F tabla
Regresión	31.4591	1	31.4591		
Residual	0.0022	19	0.0001	276824.83 F1	4.38
Falta de Ajuste	0.3099	5	0.0620		
Error Experimental	-0.3077	14	-0.0220	-2.82 F2	2.96
Total	0.3120	20	31.4992		

Tabla 18. **ANOVA para el estudio de la Linealidad del Sistema.**

7.9. Linealidad del Método

Para la evaluación de la linealidad del método se construyó una curva de calibración con soluciones de muestras de ibuprofeno, a 7 niveles de concentración, los resultados obtenidos se muestran en siguiente tabla.

Nivel de Concentración	Concentración en mg/ mL	Área
70%	0.71	4.57
70%	0.71	4.49
70%	0.71	4.55
80%	0.80	5.11
80%	0.80	5.11
80%	0.80	5.14
90%	0.90	5.88
90%	0.90	5.85
90%	0.90	5.87
100%	1.00	6.48
100%	1.00	6.44
100%	1.00	6.52
110%	1.10	7.12
110%	1.10	7.13
110%	1.10	7.10
120%	1.20	7.84
120%	1.20	7.79
120%	1.20	7.83
130%	1.29	8.60
130%	1.29	8.58
130%	1.29	8.62

Tabla 19. **Datos de Linealidad del Método**

Los parámetros de regresión obtenidos a partir de la curva de calibración se muestran en la siguiente tabla.

Pendiente	**6.7429**
Intercepto	-0.2390948
r^2	0.9990
Var. Res.	0.00294486
S_{bo}	0.00257263
S_{b1}	0.00350579

Tabla 20. **Coeficientes de regresión**

Los resultados que se observan en la tabla número 20 nos indica que existe una buena linealidad entre los resultados obtenidos. Los coeficientes de correlación y determinación son 0.9993 y 0.9990 respectivamente; lo que indica correspondencia entre los valores obtenidos en la recta de ajuste y los datos experimentales.

Para verificar la linealidad, se calculó el coeficiente de variación de los factores respuestas, obteniendo un valor de 0.71, el cual se encuentra por debajo del criterio de aceptación establecido (CV < 2%), lo que nos demuestra la poca variación entre las respuestas obtenidas.

Se estableció que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student, siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido (t_{exp}=113.88, t_{tab}=1.7291), así mismo se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente, 6.6405- 6.8453.

La proporcionalidad entre la concentración del analito y las areas obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla (t exp= -4.7139, t tabla=1.7207), por lo tanto, se cumple con el criterio de que el intercepto tiene que ser estadisticamente igual a cero para un grado de significancia de 0.05. Los intervalos de confianza calculados para la variable independiente corresponden a (-0.3264 a -0.1518).

Para comprobar la homogeneidad de varianzas se aplicó el test de Cochran en el cual el G_{exp} = 0.3231 es menor al G_{tablas} igual a 0.4800 y a un nivel de significancia de 0.05, por lo cual podemos afirmar que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Los resultados del test de Cochran se muestran en la tabla 21.

Varianza máxima	**0.002**
Suma de varianzas	**0.005**
G experimental	**0.3231**
G tabla	**0.4800**

Tabla 21. **Resultados del test de Cochran.**

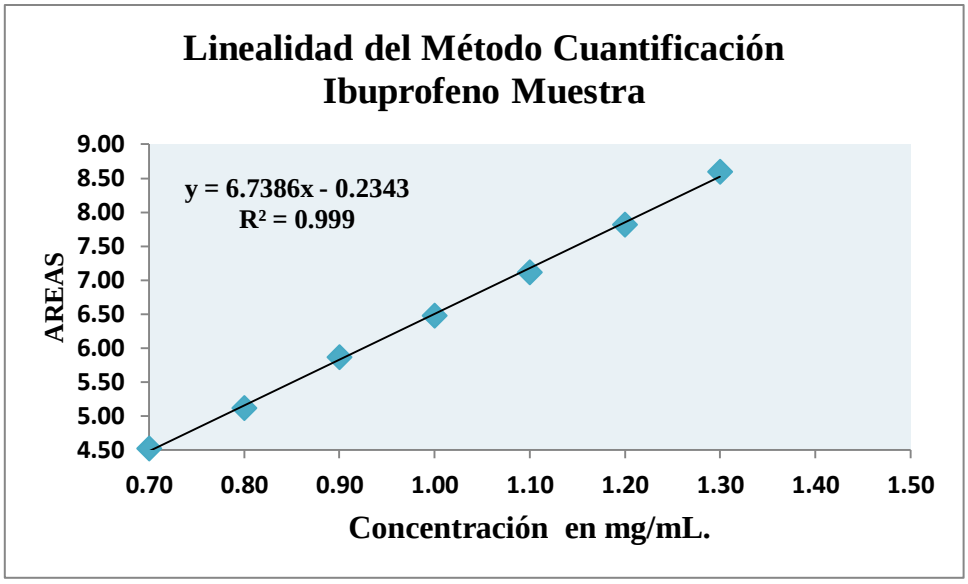


Gráfico 7. **Curva de calibración de la linealidad del Método**

La normalidad de los residuales se muestra en el gráfico N° 8, se puede observar que los residuales se distribuyen aleatoriamente y no reflejan ninguna tendencia. Lo que confirma la validez del método.

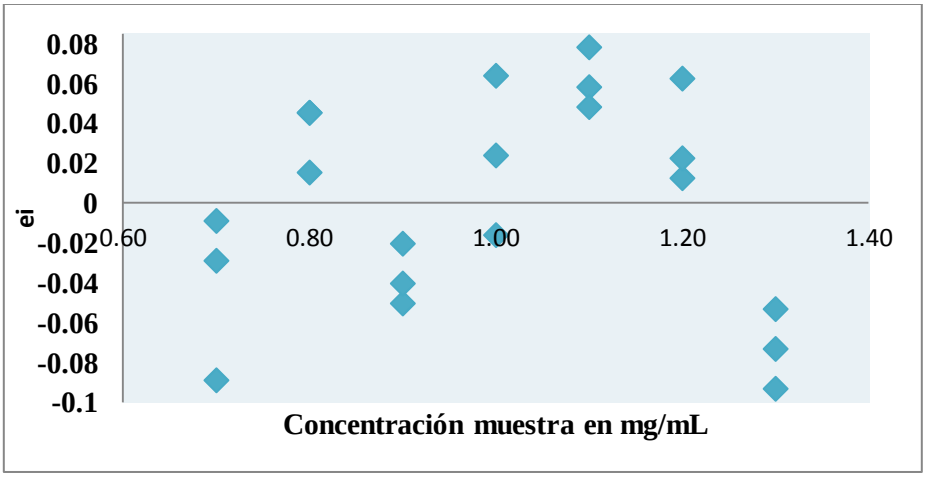


Figura 8. **Gráfico de los residuales.**

Para verificar la validez del modelo, se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA). El resultado para el análisis de la varianza, se presenta en la tabla 22. Donde se observa que el F_1 experimental es mayor al F de tabla, lo que demuestra la existencia de una

pendiente distinta de cero y el F_2 experimental es menor que el de F de tabla, lo que demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Verificación	Suma de Cuadrados	G.L	Varianza	Fexp	F tabla
Regresión	38.1915	1	38.1915		
Residual	0.0560	19	0.0029	12968.87 F1	4.38
Falta de Ajuste	0.4527	5	0.0905		
Error Experimental	-0.3967	14	-0.0283	-3.19 F2	2.96
Total	0.5086	20	38.2567		

Tabla 22. **ANOVA para el estudio de la Linealidad del Método.**

7.10. Robustez:

En la tabla 23 se presentan los resultados de las áreas, leídas por triplicado, del estudio de la robustez del método cuando se modifica el pH (3.0± 0.1), Temperatura T ˚C (30.0± 0.1) y proporción del solvente orgánico SO (68% y 72%). Ninguno de los factores supera el intervalo de ±2S del promedio (0.061), por lo que su variación no influye en la capacidad del método analítico, siendo éste robusto.

Experimentos	T°C	Solv. Org.	pH	Área Lectura 1	Área Lectura 2	Área Lectura 3	Promedio	S
1	29	68	2.9	6.11	6.13	6.09	6.11	0.020
2	31	68	2.9	6.15	6.21	6.14	6.17	0.038
3	29	72	2.9	6.03	5.97	6.02	6.01	0.032
4	31	72	2.9	6.09	6.07	6.08	6.08	0.010
5	29	68	3.1	5.98	6.04	5.95	5.99	0.046
6	31	68	3.1	6.15	6.21	6.14	6.17	0.038
7	29	72	3.1	6.06	6.04	6.05	6.05	0.010
8	31	72	3.1	6.23	6.22	6.14	6.20	0.049

Tabla 23. **Resultados del ensayo de Robustez del método.**

Influencia de cada Factor	
Factor A	0.0975
Factor B	-0.0075
Factor C	0.0275
Interacciones	
AB	0.0125
AC	0.0675
BC	0.0525
ABC	-.0275

Tabla 24. **Resultados de las influencias de los factores y sus interacciones en el estudio de la Robustez.**

En el siguiente gráfico se puede observar el efecto de cada uno de los factores así como las interacciones entre ellos, en el cual, el factor que tiene mayor efecto es la temperatura, y de las interacciones, la Temperatura- pH y Proporción del solvente orgánico- pH.

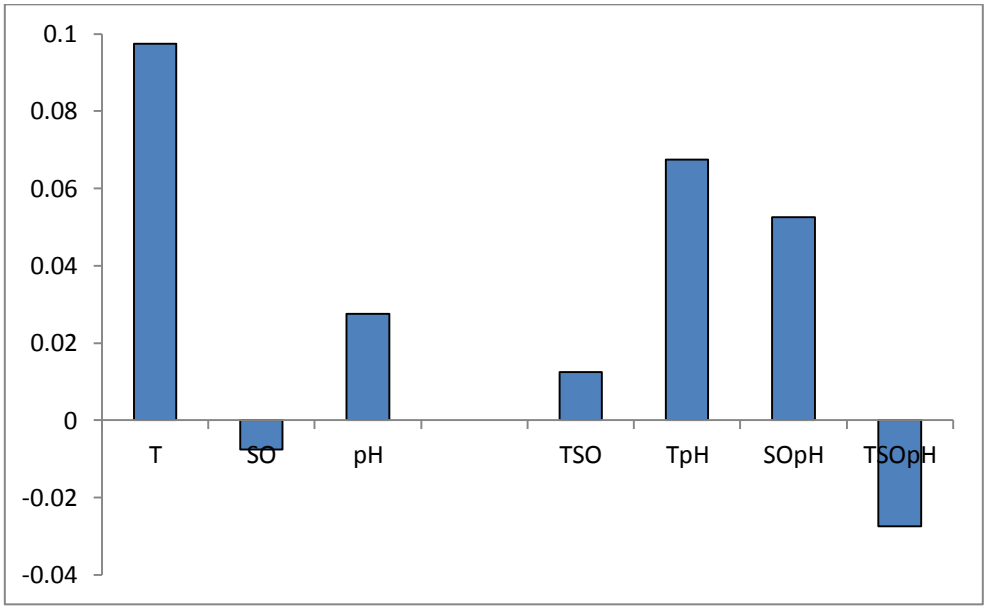


Figura 9. Efectos de los factores y sus interacciones

7.10. Límite de Detección y Cuantificación

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

Parámetro	Valor
Desviación Estándar Residual	0.0107
Pendiente	6.15
LD (mg/ml)	0.01
LC (mg/ml)	0.02

Tabla 25. **Resultados de Límite de Detección y Cuantificación**.

7.12. Estimación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración de Ibuprofeno tabletas.

Definición del mensurando

El mensurando es la concentración de principio activo encontrado en la muestra de Ibuprofeno tabletas 600 mg.

Modelo Matemático

El modelo para la concentración de Ibuprofeno tabletas, está dada por la expresión matemática presentada en la ecuación:

$$Cm = \frac{A_m * V_1 * W_m}{A_s * V_2 * W_s}$$

Donde:

Cm: concentración de Ibuprofeno presente en la muestra expresada en mg/mL.

Am: Es el área promedio de la muestra de Ibuprofeno.

As: Área promedio del estándar de Ibuprofeno.

Wm: Es la masa pesada en miligramos de la muestra de Ibuprofeno.

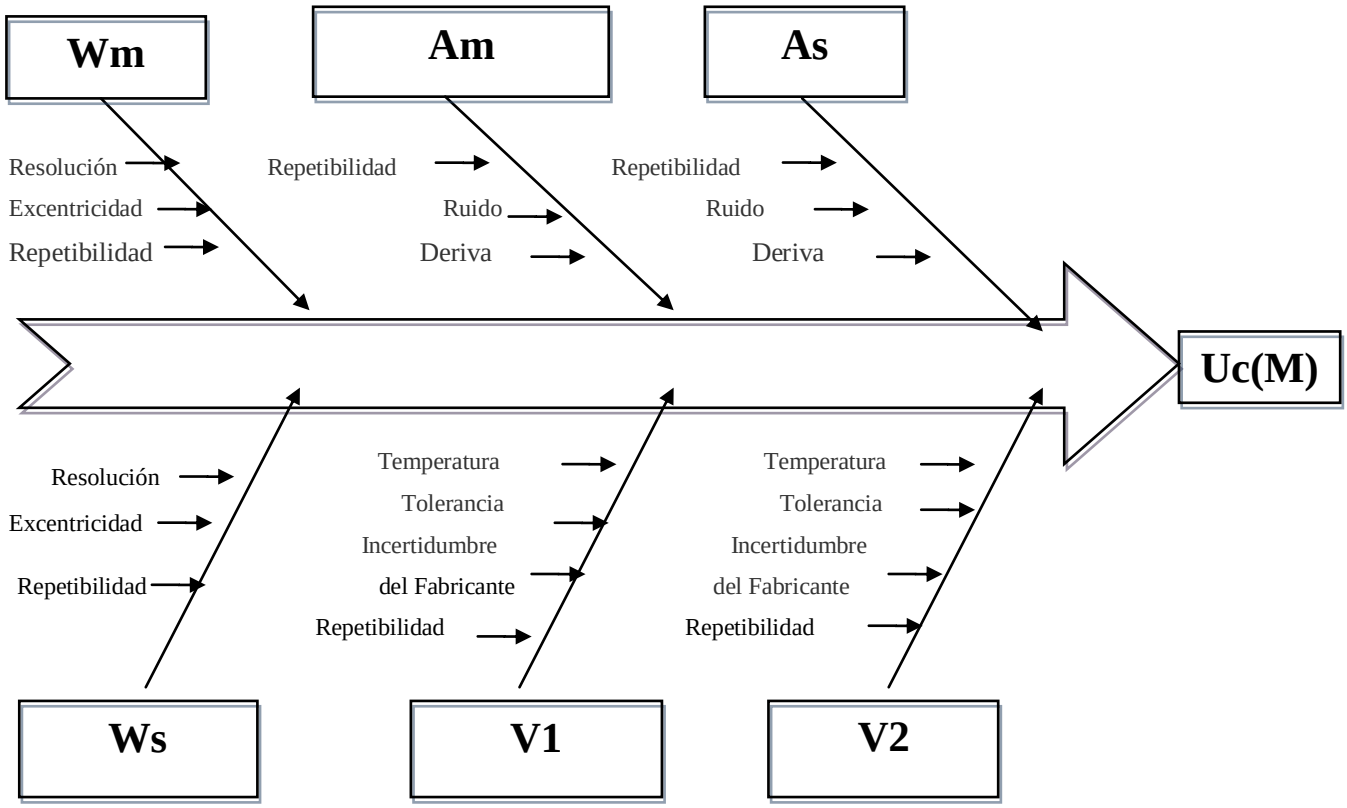
Ws: Es la masa pesada en miligramos del estándar de Ibuprofeno.

V1: Volumen del balón en el cual se preparó el estándar de Ibuprofeno.

V2: Volumen del balón en el cual se preparó la muestra de Ibuprofeno.

Identificación de los componentes de la incertidumbre

Los componentes que influyen en la incertidumbre para la estimación de la concentración de Ibuprofeno presente en la muestra se describen en el diagrama causa-efecto en la figura 10.



Cuantificación de los componentes de la incertidumbre

Para calcular la incertidumbre de las mediciones de las aéreas de los picos es necesario tener en cuenta tres componentes: las lecturas del área del pico cromatográfico, las del ruido y las de la deriva.

La incertidumbre en la medición de volumen a partir de volumétricos calibrados, se calcula tomando en cuenta cuatro componentes: la tolerancia, la incertidumbre del fabricante, la incertidumbre debido al efecto que tiene la variación de temperatura ambiental sobre la expansión de los líquidos y la repetibilidad.

La incertidumbre de las masas del estándar y la muestra de Ibuprofeno se calculó a partir de los datos del certificado de calibración de la balanza utilizada en el ensayo y tomando en cuenta tres componentes: repetibilidad, resolución y excentricidad de la balanza.

Tabla N° 26. Datos y cálculos para estimar la incertidumbre de los componentes que influyen en la estimación de la incertidumbre de la concentración de Ibuprofeno.

Variable	Fuente	Especificación	Distribución	Fórmula y grados de libertad	Incertidumbre
Am	Repetibilidad	0.002	t-student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.00066
	Ruido	0.33	Rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.095262794
	Deriva	2.36	Rectangular	$u_D = \frac{D}{2\sqrt{3}}$	0.681273317
Ap	Repetibilidad	0.05	t-student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.016666666
	Ruido	0.33	Rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.095262794
	Deriva	2,36	Rectangular	$u_D = \frac{D}{2\sqrt{3}}$	0.681273317
Volumen 1	Temperatura	2 ^{o}C	Rectangular	$u_T = \frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}}$	0.089633629
	Tolerancia	0.05	Triangular	$u_T = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.020412414
	Incertidumbre del fabricante	± 0.011	Normal	$uf = \frac{a}{1.96}$	0.005612244
	Repetibilidad	0.01707331	t-Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.005399054

Variable	Fuente	Especificación	Distribución	Fórmula y grados de libertad	Incertidumbre
Volumen 2	Temperatura	2 °C	Rectangular	$u_T = \frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}}$	0.089633629
	Tolerancia	0.05	Triangular	$u_T = \frac{T}{\sqrt{6}}$	0.020412414
	Incertidumbre del fabricante	± 0.0011	Normal	$uf = \frac{a}{1.96}$	0.005612244
	Repetibilidad	0.01707331	t-Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.005399054
α = 2.07x10^{-4}/ °C factor de expansión cubica del solvente ΔT = 3.0 (variación máxima de la temperatura ambiental en °C)					
Masa Muestra	Resolución	0.0001g	rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.000028867
	Excentricidad	0.0004g	Rectangular	$u_{Ex} = \frac{Ex}{2\sqrt{3}}$	0.000115470
	Repetibilidad	0.0516g	t Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.210656117
Masa Estándar	Resolución	0.0001g	rectangular	$u_R = \frac{R}{2\sqrt{3}}$	0.000028867
	Excentricidad	0.0004g	Rectangular	$u_{Ex} = \frac{Ex}{2\sqrt{3}}$	0.000115470
	Repetibilidad	0.1761g	t Student	$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$	0.071892523

Tabla 27. Incertidumbre combinada para cada componente.

Variable	Ecuación	Incertidumbre combinada
Masa estándar	$u_{m1} = \sqrt{u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_{\mathrm{Res}}^2 + u_{Ex}^2}$	0.071892621
Masa muestra	$u_{m2} = \sqrt{u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_{\mathrm{Res}}^2 + u_{Ex}^2}$	0.210656151
Área estándar	$u_A = \sqrt{u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_{Ruid}^2 + u_D^2}$	0.68810327
Área muestra	$u_A = \sqrt{u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_{Ruid}^2 + u_D^2}$	0.687901714
Volumen 1	$u_{vi} = \sqrt{u_T^2 + u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_f^2 + \left(\frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}}\right)^2}$	0.092257797
Volumen 2	$u_{vi} = \sqrt{u_T^2 + u_{\mathrm{Re}p}^2 + u_f^2 + \left(\frac{V\alpha\Delta T}{2\sqrt{3}}\right)^2}$	0.092257797

En la tabla 22, columna 3, muestra la incertidumbre combinada para cada componente obtenida al aplicar la ley de propagación de la incertidumbre.

En la tabla 23 se muestran las ecuaciones para calcular los coeficientes de sensibilidad de los parámetros que influyen en el cálculo de la incertidumbre de la concentración de Ibuprofeno en la muestra. Los coeficientes de sensibilidad se calcularon a través de la derivada parcial de cada componente de la expresión matemática.

Tabla 28. Ecuaciones para al cálculo de los coeficientes de sensibilidad

Ecuaciones	Magnitud
$cAm := \frac{\partial}{\partial Am} = \frac{V1Wm}{AsV1Ws}$	**0.1579778831**
$cV1 := \frac{\partial}{\partial V1} = \frac{AmWs}{AsV2Wm}$	**0.01927330174**
$cWm := \frac{\partial}{\partial Wm} = \frac{AmV1}{AsV2Ws}$	**0.01927330174**
$cAs := \frac{\partial}{\partial A_s} = -\frac{AmV1Wm}{As^2V2Ws}$	**-0.1522377704**
$cV2 := \frac{\partial}{\partial V2} = -\frac{AmV1Wm}{AsV2^2Ws}$	**-0.01927330174**
$cWs := \frac{\partial}{\partial Ws} = -\frac{AmV1Wm}{AsV2Ws^2}$	**-0.01927330174**

En la tabla 29, se resumen todos los parámetros que intervienen en la evaluación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración de Ibuprofeno en la muestra.

En esta tabla se muestran las variables (xi) del modelo matemático, su valor correspondiente, la incertidumbre (u_{xi}), los coeficientes de sensibilidad de cada variable (C_{xi}), calculados a partir de la derivada parcial de Cm con respecto a x_i, el producto de C_{xi} y u_{xi}, y el índice de contribución (ind%).

Tabla 29. Balance de la incertidumbre en la medición de la concentración de Ibuprofeno tabletas.

Variable	**Valor**	C_{xi}	U_{xi}	$\lvert C_{xi} \times U_{xi} \rvert$	$(C_{xi} \times U_{xi})^2$	***Idn%***	***IndAcum***
Am	6.10	0.1507840772	0.687901714	0.103724625	0.010758798	49.854276	49.9
As	6.33	-0.1390978565	0.68810327	0.09571369	0.00916111	46.0038945	95.9
Wm	50	0.01844993969	0.210656151	0.003886593	1.51056E-05	1.8680549	97.7
Ws	50	-0.01844993969	0.071892621	0.001326415	1.75938E-06	0.6375288	98.4
V1	50	0.01844993969	0.092257797	0.001702151	2.89732E-06	0.81812294	99.2
V2	50	-0.01844993969	0.092257797	0.001702151	2.89732E-06	0.81812294	100
			SUMA	0.208055624	0.019942568		

La figura 11. Se muestra el diagrama de Pareto donde se puede observar que los parámetros Am y As son los que contribuyen más a la incertidumbre en la medición de Cm

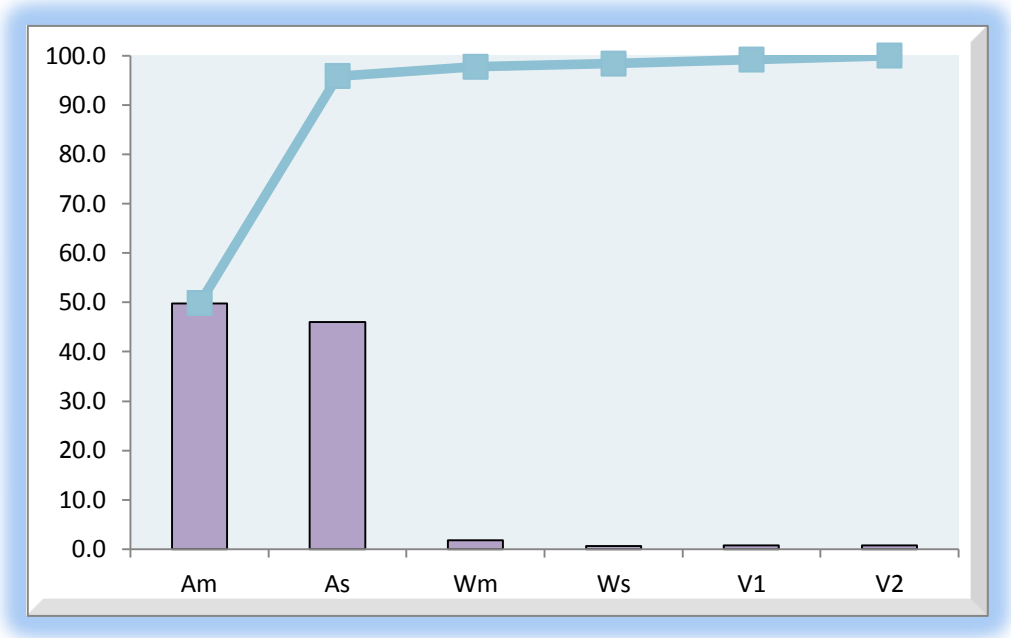


Figura 11. Diagrama de Pareto. Contribución de los componentes de la incertidumbre en la Concentración de Ibuprofeno.

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

$$u_{Cm} = \sqrt{uAm^2.cAm^2 + uV1^2.cV1^2 + uWm^2.cWm^2 + uAs^2.cAs^2 + uV2^2.cV2^2 + uWs^2.cWs^2}$$

Ecuación para estimar la incertidumbre combinada

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

$$u_{Cm} = 0.15$$

Considerando un factor de cobertura *k*= 2, con una probabilidad del 95.45% obtenemos la incertidumbre expandida que es igual a:

$$u_e = 0.30$$

8. Conclusión

Se validó la metodología analítica planteada para la cuantificación de Ibuprofeno tabletas de 600mg, lo cual demostró que cumple con los parámetros descritos en los libros normalizados que hacen referencia a métodos analíticos. El método respondió satisfactoriamente a cada uno de los ensayos realizados, con lo cual se garantiza la calidad de las muestras y se tiene la certeza que los resultados obtenidos son confiables dentro de las condiciones de trabajo descritas en este documento.

9. Recomendaciones

- Tener en cuenta los parámetros de validación calculados en el experimento como una referencia.

- Tener en cuenta este estudio de validación para ser implementado como un ensayo de rutina.

- Garantizar el mantenimiento y calibración de los equipos del laboratorio utilizados en el ensayo.

- Tratar de reducir el valor de la incertidumbre, revisando los componentes que más aportan en el valor de esta.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Asociación Española de Farmacéuticos de España de la industria A.E.F.I (2001). Validación de métodos analíticos. Barcelona: A.E.F.I.
2. Ramis Ramos, G., & Álvarez – Coque, M. C. (2001). Quimiometría. Madrid; España: Síntesis.
3. Flores Jesús. (2005). Farmacología Humana (3ª ed.).Barcelona, España: Masson S.A.
4. The United States Pharmacopeia XXX. (2007). Estados Unidos de América.
5. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 33/ NF28
6. Goodman y Gilman las bases Farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Vol. 1. Mc. GRAW- HILL INTERAMERICANA.
7. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (3ª edición). London.
8. Lainfiesta, R. A.(2000). Validación del método por Cromatografía Líquida de alta Resolución para la cuantificación de Ibuprofeno en suspensión. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Guatemala. Universidad San Carlos. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2060.pdf.
9. MATKOVIC, R. S. (2004). Desarrollo y validación de análisis cuantitativo de Ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja. *Act. Farm. Bonaerense* 23 (4): 527 – 532.
10. (2011). Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.03.39:06 Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la calidad de los Medicamentos.
11. Delgado, G. (2009). Validación de métodos analíticos.
12. Báez, E.M, Chávez, U.S y Díaz, M.V. (2012). Validación de un método volumétrico para la cuantificación de yodopovidona en solución al 10% aplicado a un estudio de estabilidad. Monografía para optar al título de químico farmacéutico no publicada. UNAN, León, Nicaragua.

13. Beltrán, J. (2004*). La gestión de los procesos metrológicos. Análisis e integración e un sistema de gestión de las mediciones (ISO 10012:2003).* Publicado en Madrid, España: editorial AENOR.

14. S, Ellison. M, Roesslein, y A, Williams. (2000). *Guía EURACHEM/CITAC. Cuantificación de la incertidumbre en la mediciónanalítica.*

15. Matamoros Sanchez Alicia, Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Tesis Doctoral Tarragona 2002. Universidad de Rovira I Virgili, Facultad de Química.

16. Universitas, Julio (2009). Revista Científica. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-León, León, Nic. Editorial Universitaria, UNAN-León.

17. Compaño, R., & Ríos, A. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Madrid; España: síntesis S.A.

18. Miller, J. N., & Miller, J. N. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4 ed.). Madrid; España: Pearson Educación.

19. Parajón, G.E, Parajón, S.C y Peralta, V.J. (2000). Validación de la metodología Analítica en la Cuantificación de un Paraaminofenol (ACETAMINOFEN); en Solución Oral por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC o CLAR). Monografía para optar al título de químico farmacéutico no publicada. UNAN, León, Nicaragua.

20. Gutiérrez, P.H, Vara, S.R. (2003). Análisis y Diseño de Experimentos. Mexico, D.F. McGRAW- HILL/GRAW- HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A DE C.V.

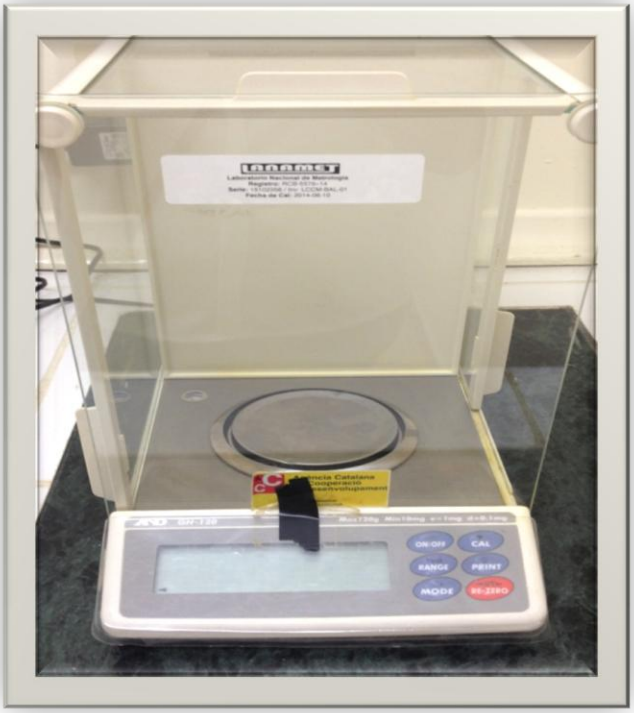
ANEXOS

Control y Registro de condiciones ambientales en área de HPLC, durante el estudio de validación.

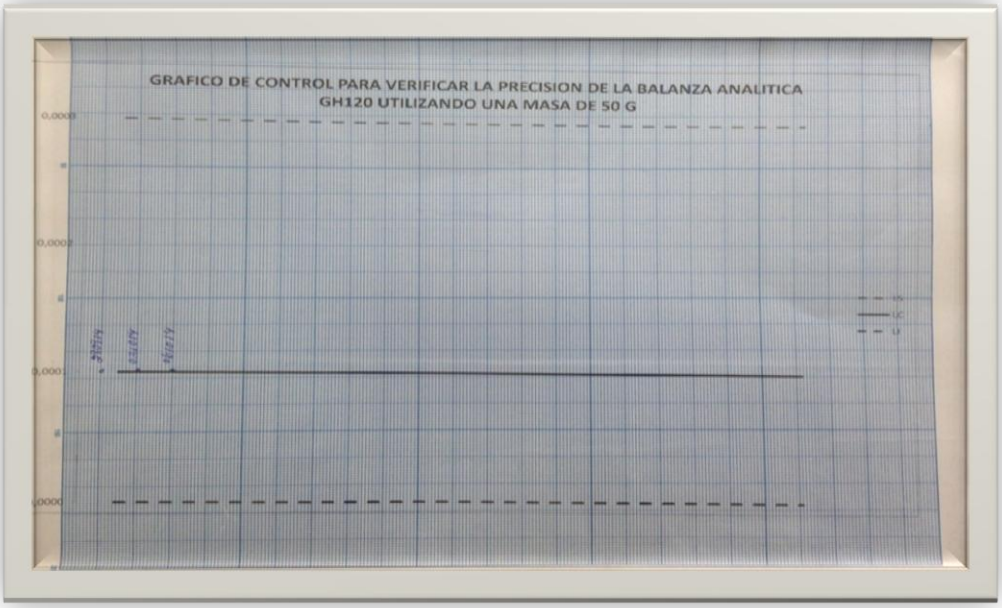
Fecha	Temperatura(°C)	Humedad Relativa
25-03-14	23.4	44.6
26-03-14	25.2	46.9
27-03-14	23.4	48.7
31-03-14	23.6	50.3
01-04-14	23.5	49.8
07-05-14	23.1	49.7
12-05-14	22.9	48.7
13-05-14	23.4	44.6
14-05-14	24.4	53.5
15-05-14	25.3	46.9
16-05-14	23.6	56.8
20-05-14	22.5	57.4
21-05-14	23.5	60.2
22-05-14	23.2	55.8
23-05-14	23.8	54.7

HPLC utilizado para la validación del método analítico de Ibuprofeno 600mg.

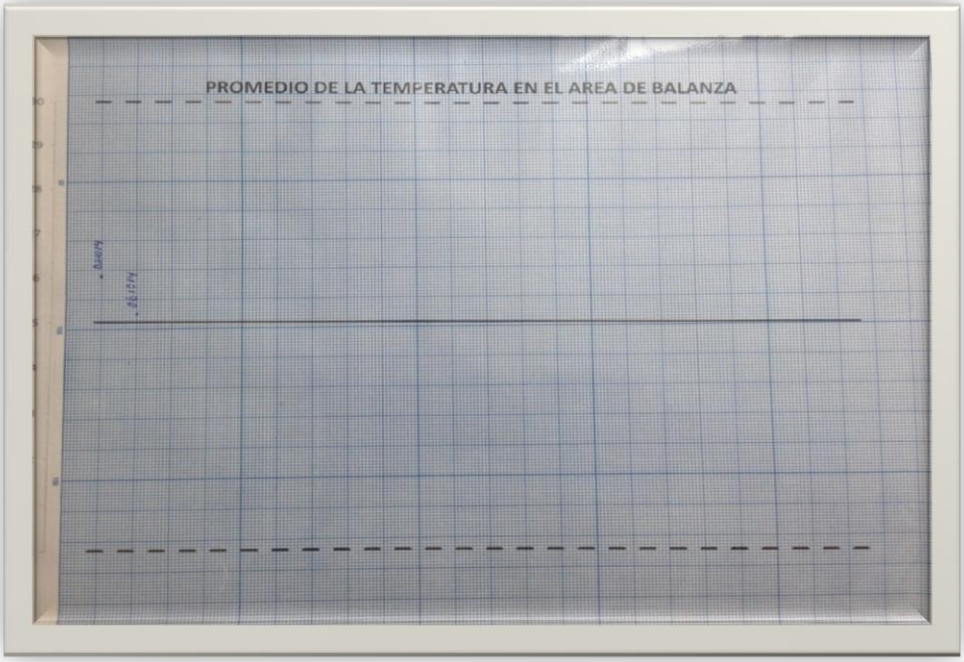
Viales utilizados para las inyecciones de las lecturas de estándar y muestras de Ibuprofeno 600 mg.



Balanza Analítica utilizada para pesar estándar y muestras de Ibuprofeno 600 mg.



Carta de Control.



Carta Control.

pH-metro utilizado.

Tabla de t de Student, en función de los grados de libertad.

	α							
ν	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.689
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.660
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
∞	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290

Tabla chi cuadrado, en función de los grados de libertad.

	Nivel de significación											
V	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.75	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.10	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	0.01	0.02	0.05	0.10	0.21	0.58	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.07	0.11	0.22	0.35	0.58	1.21	4.11	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84
4	0.21	0.30	0.48	0.71	1.06	1.92	5.39	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	0.41	0.55	0.83	1.15	1.61	2.67	6.63	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	0.68	0.87	1.24	1.64	2.20	3.45	7.84	10.64	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.99	1.24	1.69	2.17	2.83	4.25	9.04	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	5.07	10.22	13.36	15.51	17.53	20.09	21.95
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	5.90	11.39	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	6.74	12.55	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.82	4.57	5.58	7.58	13.70	17.28	19.68	21.92	24.73	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	8.44	14.85	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	9.30	15.98	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	4.07	4.66	5.63	6.57	7.79	10.17	17.12	21.06	23.68	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	11.04	18.25	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	11.91	19.37	23.54	26.30	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.09	12.79	20.49	24.77	27.59	30.19	33.41	35.72
18	6.26	7.01	8.23	9.39	10.86	13.68	21.60	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.91	10.12	11.65	14.56	22.72	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.59	10.85	12.44	15.45	23.83	28.41	31.41	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.59	13.24	16.34	24.93	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.34	14.04	17.24	26.04	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	13.09	14.85	18.14	27.14	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.85	15.66	19.04	28.24	33.20	36.42	39.36	42.98	45.56
25	10.52	11.52	13.12	14.61	16.47	19.94	29.34	34.38	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.38	17.29	20.84	30.43	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	16.15	18.11	21.75	31.53	36.74	40.11	43.19	46.96	49.65
28	12.46	13.56	15.31	16.93	18.94	22.66	32.62	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.71	19.77	23.57	33.71	39.09	42.56	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.49	20.60	24.48	34.80	40.26	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.43	26.51	29.05	33.66	45.62	51.81	55.76	59.34	63.69	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	42.94	56.33	63.17	67.50	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.48	40.48	43.19	46.46	52.29	66.98	74.40	79.08	83.30	88.38	91.95
70	43.28	45.44	48.76	51.74	55.33	61.70	77.58	85.53	90.53	95.02	100.43	104.21
80	51.17	53.54	57.15	60.39	64.28	71.14	88.13	96.58	101.88	106.63	112.33	116.32
90	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	80.62	98.65	107.57	113.15	118.14	124.12	128.30
100	67.33	70.06	74.22	77.93	82.36	90.13	109.14	118.50	124.34	129.56	135.81	140.17

Tabla G de Cochran.

ν \ k	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9985 *0.9999*	0.9669 *0.9933*	0.9065 *0.9676*	0.8412 *0.9279*	0.7808 *0.8828*	0.7271 *0.8376*	0.6798 *0.7945*	0.6385 *0.7544*	0.6020 *0.7175*	0.5410 *0.6528*	0.4709 *0.5747*	0.3894 *0.4799*	0.2929 *0.3632*
2	0.9750 *0.9950*	0.8709 *0.9423*	0.7679 *0.8643*	0.6838 *0.7885*	0.6161 *0.7218*	0.5612 *0.6644*	0.5157 *0.6152*	0.4775 *0.5727*	0.4450 *0.5358*	0.3924 *0.4751*	0.3346 *0.4069*	0.2705 *0.3297*	0.1980 *0.2412*
3	0.9392 *0.9794*	0.7977 *0.8831*	0.6841 *0.7814*	0.5981 *0.6957*	0.5321 *0.6258*	0.4800 *0.5685*	0.4377 *0.5209*	0.4027 *0.4810*	0.3733 *0.4469*	0.3264 *0.3919*	0.2758 *0.3317*	0.2205 *0.2654*	0.1593 *0.1913*
4	0.9057 *0.9586*	0.7457 *0.8335*	0.6287 *0.7212*	0.5441 *0.6329*	0.4803 *0.5635*	0.4307 *0.5080*	0.3910 *0.4627*	0.3584 *0.4251*	0.3311 *0.3934*	0.2880 *0.3428*	0.2419 *0.2882*	0.1921 *0.2288*	0.1377 *0.1635*
5	0.8772 *0.9373*	0.7071 *0.7933*	0.5895 *0.6761*	0.5065 *0.5875*	0.4447 *0.5195*	0.3974 *0.4659*	0.3595 *0.4226*	0.3286 *0.3870*	0.3029 *0.3572*	0.2624 *0.3099*	0.2195 *0.2593*	0.1735 *0.2048*	0.1237 *0.1454*
6	0.8534 *0.9172*	0.6771 *0.7606*	0.5598 *0.6410*	0.4783 *0.5531*	0.4184 *0.4866*	0.3726 *0.4347*	0.3362 *0.3932*	0.3067 *0.3592*	0.2823 *0.3308*	0.2439 *0.2861*	0.2034 *0.2386*	0.1602 *0.1877*	0.1137 *0.1327*
7	0.8332 *0.8988*	0.6530 *0.7335*	0.5365 *0.6129*	0.4564 *0.5259*	0.3980 *0.4608*	0.3535 *0.4105*	0.3185 *0.3704*	0.2901 *0.3378*	0.2666 *0.3106*	0.2299 *0.2680*	0.1911 *0.2228*	0.1501 *0.1748*	0.1061 *0.1232*
8	0.8159 *0.8823*	0.6333 *0.7107*	0.5175 *0.5897*	0.4387 *0.5037*	0.3817 *0.4401*	0.3384 *0.3911*	0.3043 *0.3522*	0.2768 *0.3207*	0.2541 *0.2945*	0.2187 *0.2535*	0.1815 *0.2104*	0.1422 *0.1646*	0.1002 *0.1157*
9	0.8010 *0.8674*	0.6167 *0.6912*	0.5017 *0.5702*	0.4241 *0.4854*	0.3682 *0.4229*	0.3259 *0.3751*	0.2926 *0.3373*	0.2659 *0.3067*	0.2439 *0.2813*	0.2098 *0.2419*	0.1736 *0.2002*	0.1357 *0.1567*	0.0958 *0.1100*
10	0.7880 *0.8539*	0.6025 *0.6743*	0.4884 *0.5536*	0.4118 *0.4697*	0.3568 *0.4084*	0.3154 *0.3616*	0.2829 *0.3248*	0.2568 *0.2950*	0.2353 *0.2704*	0.2020 *0.2320*	0.1671 *0.1918*	0.1303 *0.1501*	0.0921 *0.1054*
16	0.7341 *0.7949*	0.5466 *0.6059*	0.4366 *0.4884*	0.3645 *0.4094*	0.3135 *0.3529*	0.2756 *0.3105*	0.2462 *0.2779*	0.2226 *0.2514*	0.2032 *0.2297*	0.1737 *0.1961*	0.1429 *0.1612*	0.1108 *0.1248*	0.0771 *0.0867*
36	0.6602 *0.7067*	0.4748 *0.5153*	0.3720 *0.4057*	0.3066 *0.3351*	0.2612 *0.2858*	0.2278 *0.2494*	0.2022 *0.2214*	0.1820 *0.1992*	0.1655 *0.1811*	0.1403 *0.1535*	0.1144 *0.1251*	0.0879 *0.0960*	0.0604 *0.0658*
144	0.5813 *0.6062*	0.4031 *0.4230*	0.3093 *0.3251*	0.2513 *0.2644*	0.2119 *0.2229*	0.1833 *0.1929*	0.1616 *0.1700*	0.1446 *0.1521*	0.1308 *0.1376*	0.1100 *0.1157*	0.0889 *0.0934*	0.0675 *0.0709*	0.0457 *0.0480*
∞	0.5000 *0.5000*	0.3333 *0.3333*	0.2500 *0.2500*	0.2000 *0.2000*	0.1667 *0.1667*	0.1429 *0.1429*	0.1250 *0.1250*	0.1111 *0.1111*	0.1000 *0.1000*	0.0833 *0.0833*	0.0667 *0.0667*	0.0500 *0.0500*	0.0333 *0.0333*

α = 0.05 (redonda) primer valor de las filas α=0.01 (cursiva) segundo valor de las filas

Distribución de F de Snedecor. Valores que dejan un área de cola de 0.05 en función de los grados de libertad de la distribución.

	V_1														
V_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	30	40	50	100
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	248.016	250.096	251.144	251.774	253.043
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.446	19.463	19.471	19.476	19.486
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.660	8.617	8.594	8.581	8.554
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.803	5.746	5.717	5.699	5.664
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.558	4.496	4.464	4.444	4.405
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	3.874	3.808	3.774	3.754	3.712
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.445	3.376	3.340	3.319	3.275
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.150	3.079	3.043	3.020	2.975
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	2.936	2.864	2.826	2.803	2.756
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.774	2.700	2.661	2.637	2.588
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.124	2.039	1.994	1.966	1.907
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	1.932	1.841	1.792	1.761	1.695
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	1.839	1.744	1.693	1.660	1.589
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.784	1.687	1.634	1.599	1.525
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.676	1.573	1.515	1.477	1.392