



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia.**

**PROFESOR PATROCINANTE: Dalton Alarcón S.
INSTITUCIÓN: Laboratorio Bagó de Chile S.A**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUCIÓN: Universidad Austral de Chile**

**APLICACIÓN DEL CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE COMBINADA A
LA VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC,
EN UN PRODUCTO QUE CONTIENE CITALOPRAM BROMHIDRATO.**

**Internado presentado como parte
de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico.**

CRISTIAN MAURICIO GONZÁLEZ HINOSTROZA

VALDIVIA-CHILE

2006

RESUMEN	4
SUMMARY	5
NOTACIÓN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. OBJETIVO GENERAL.	9
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	9
1.3. VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	17
1.4. VALIDACIÓN MÉTODOS ANALÍTICOS.	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. MATERIALES.	22
2.2. METODOLOGÍA.....	23
2.3. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD.	24
2.4. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL PRODUCTO.	24
2.5. ACONDICIONAMIENTO DEL HPLC.....	25
2.6. APLICACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	26
2.7. PARÁMETROS PARA LA ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE	29
3. RESULTADOS	32
3.1. VALIDACIÓN CITALOPRAM BROMHIDRATO.	32
3.2. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE	42
4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES	51
5. REFERENCIA	53

ANEXOS.....54

ANEXO N° 1 RESULTADOS EN EXTENSO PARA LA PRECISIÓN POR REPETIBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO CITALOPRAM BROMHIDRATO.54

ANEXO N° 2 RESULTADOS EN EXTENSO PARA LA RECUPERACIÓN POR REPRODUCIBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO CITALOPRAM BROMHIDRATO.....55

ANEXO N° 3 DISTRIBUCIÓN t -STUDENT CON N GRADOS DE LIBERTAD.....65

INDICE DE TABLAS

1.1. Tabla N°1 Degradación forzada para p.a citalopram bromhidrato.....34

1.2. Tabla N°2 Resultados obtenidos del ensayo de linealidad para citalopram bromhidrato.....35

1.3. Tabla N°3 Características de la curva de calibración para citalopram bromhidrato.....36

1.4. Tabla N° 4 Cuadro resumen de criterios estadísticos (t de Student) para evaluación de la linealidad de la metodología analítica.....37

1.5. Tabla N° 5 Resultados de ensayo de exactitud para citalopram bromhidrato.....38

1.6. Tabla N°6 Cuadro resumen de los resultados del test estadístico efectuado para la determinación de la exactitud.....39

1.7. Tabla N° 7 Resultados de la precisión por repetibilidad obtenido para p.a citalopram bromhidrato.....39

1.8. Tabla N° 8 Resultados de evaluación de estabilidad para citalopram bromhidrato valores 24 hrs T ° ambiente 25°C y 24 hrs refrigerador 4°C40

1.9. Tabla N° 9 Serie de experimentos repetidos diferentes días y en diferentes equipos.....42

2.0. Tabla N°10: repetibilidad de la pesada con intervalo de 5 segundos.....44

2.1. Tabla N ° 11 Resultados de la precisión por repetibilidad obtenidos para citalopram bromhidrato.....54

2.2. Tabla N ° 12 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática. Día 08/11/2005.....	55
2.3. Tabla N ° 13 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática. Día 09/11/2005.....	56
2.4. Tabla N ° 14 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática. Día 17/01/2006.....	57
2.5. Tabla N ° 15 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática. Día 20/01/2006.....	58
2.6. Tabla N ° 16 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática. Día 22/01/2006.....	59
2.7. Tabla N ° 17 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 10/01/2006.....	60
2.8. Tabla N ° 18 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 11/01/2006.....	61
2.9. Tabla N ° 19 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 12/01/2006.....	62
3.0. Tabla N ° 20 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 13/01/2006.....	63
3.1. Tabla N ° 21 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 16/01/2006.....	64
3.2. Tabla N° 22 DE LA DISTRIBUCIÓN t -Student con n grados de libertad.....	65

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló la validación de la metodología analítica por HPLC y el cálculo de la incertidumbre combinada para el producto citalopram bromhidrato.

El método fue validado siguiendo una metodología de trabajo elaborada previamente en un protocolo de validación, donde se analizaron diferentes parámetros como: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad.

El método analítico propuesto es selectivo, porque no se evidencia que los productos de degradación interfieran en el análisis del principio activo. Además, se obtiene un porcentaje de pureza del pico cromatográfico de 100%. La metodología desarrollada es lineal para el rango de 50 % a 150 % de la concentración de trabajo obteniéndose un coeficiente de correlación de $r = 0.99999$. Además, de ser una técnica exacta al trabajar con soluciones de concentración de 70%, 100 % y 130 %, y precisas, cumpliendo con los criterios de RSD mínimos.

En el cálculo de la incertidumbre de medida para la metodología antes validada, se aprecia que la incertidumbre tipo A, por ser 3 órdenes de magnitud mayor que la incertidumbre tipo B, refleja el valor final de la incertidumbre combinada para esta metodología analítica, dando un valor de incertidumbre combinada (u_c)=0.3% y una incertidumbre expandida $U = 0,6\%$ con un nivel de confianza de 95%

SUMMARY

The following research has investigated the validation of the analytical methodology by HPLC and the calculation of the combined uncertainty for the citalopram hydrobromide product.

The method was validated following a methodology of work elaborated previously with a validation protocol where different parameters were analyzed, such as: selectivity, linearity, precision, accuracy and stability.

The analytical method proposed is a selective one, because there is no evidence that the degradation products interfere in the analysis of the active principle. More over, a percentage of purity of the chromatographic tip of 100 % is obtained. The used methodology is linear for the rank of 50% to 150% of the analysis concentration obtaining a coefficient of correlation of $r= 0,99999$. Besides, this technique is exact when working with solutions of concentration of 70 %, 100% and 130%, fulfilling the minimum criteria of RSD.

In the calculation of the uncertainty of measurement for the methodology before validated, it is observed that the uncertainty type A, being greater about three magnitudes order than the uncertainty type B, reflects the final value of the combined uncertainty for its analytical methodology, giving a value of combined uncertainty (u_c)=0.3% and one expanded uncertainty of $U =0,6%$ with confidence level of 95 %.

NOTACIÓN

a	Ordenada en el origen de la recta de regresión
b	Pendiente de la recta de regresión
C	Concentración
Cstd	Concentración estándar
DS	Desviación estándar
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia
k	Factor de cobertura
M.R	Material de referencia
Pstd	Peso estándar
r	Coefficiente de correlación
Rec	Recuperación
RSD	Desviación estándar relativa
u	Incertidumbre estándar
U	Incertidumbre expandida
u_{bal}	Incertidumbre calibración balanza
u_c	Incertidumbre combinada
u_{mst}	Incertidumbre masa estándar
Vfin	Volumen final
Vstd	Volumen estándar

1. INTRODUCCIÓN

La Food and Drugs Administration (FDA), desde mediados del siglo XIX ha dotado de un criterio unificador a las compañías farmacéuticas, mediante las buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio (GMP y GLP respectivamente), las cuales describen los métodos, equipos, instalaciones y controles (incluyendo las pruebas analíticas) requeridas para producir alimentos, medicamentos e instrumentos de uso médico. Aunque la GMP data desde 1893, no fue hasta el año 1962 que la FDA fue requerida para enunciar las regulaciones de GMP enumerando los procedimientos tendientes a respaldar la seguridad de los medicamentos.

La industria farmacéutica, después de una etapa de discusión, ha convertido a las validaciones en un mecanismo de control retroactivo de los medios de calidad. Las buenas prácticas de manufactura vigentes (cGMP) no estarían completas sin lo que llamamos validación de procesos de producción, la cual incluye la validación de los métodos de análisis para el control de calidad de los medicamentos.

Es aquí donde la evaluación de la incertidumbre de medición en química analítica ha despertado en los últimos años un marcado interés. Se acepta en general que, para evaluar si un resultado de análisis es apto para el propósito al cual se destinará, es indispensable realizar una estimación de la incertidumbre de medición. Son conocidos los documentos de referencias en cuanto a la metodología de evaluación de incertidumbre en química analítica (³⁻⁵)

Esta metodología requiere que se identifiquen todas las posibles fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medición y que se estime su valor, ya sea por medios estadísticos (evaluación tipo A) o por medios documentados (evaluación tipo B). Posteriormente se combinan estos componentes individuales para obtener las incertidumbres estándar y expandida para el proceso total.

En conjunto, tanto la validación de la metodología por HPLC como el cálculo de la incertidumbre, proporcionan un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico, y en la calidad de los resultados. Permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento, disminución del número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados. (7)

1.1. OBJETIVO GENERAL.

Aplicar el cálculo de incertidumbre combinada a la validación de una metodología analítica por HPLC, en un producto que contiene citalopram bromhidrato.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Adquirir una visión general de las variadas actividades desarrolladas dentro del departamento de control de calidad.
- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la validación del método analítico por HPLC.
- Calcular y desarrollar los parámetros a validar: selectividad, linealidad, precisión y exactitud.
- Calcular la incertidumbre tipo A y tipo B del método desarrollado en la validación.

GENERALIDADES.

Gerencia de control de calidad.

A cargo de un Químico Farmacéutico (Q.F), esta gerencia vela por el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos por las normas nacionales e internacionales para cada medicamento en particular. Se responsabiliza de la calidad de las materias primas, a través de un control analítico y de proveedores, como así también, de la calidad de los productos de envase y empaque.

Conjuntamente, realiza un control a productos terminados a cargo de Q.F., Químicos y Analistas Químicos, supervisando cualquier alteración de las especificaciones y respaldando cada análisis con un protocolo firmado.

También se preocupa de la calibración, mantención y buen funcionamiento de todos los equipos utilizados en los análisis, de la prevención de riesgos y accidentes en el laboratorio y en general del cumplimiento de las normas de buenas prácticas de laboratorio (GLP). Está encargado a su vez, de llevar a cabo estudios de estabilidad de los diferentes productos, en variadas condiciones de ambiente y almacenamiento.

Labores en el departamento de control de calidad.

Control en proceso.

En esta parte se controlan las pruebas de sellado (Blister y pomo) en proceso de fabricación. Generalmente, éstas cumplen con los límites establecidos, si esto no es así, el proceso se detiene.

Una vez que los operadores efectúan las correspondientes correcciones, se realizan nuevamente los controles para permitir la continuación del proceso.

Control de parámetros físicos.

Durante el proceso de compresión, se realizan controles de peso y diámetro, con un equipo múltiple de medición de parámetros físicos, durometro (Pharmatest). De igual manera, se efectúan pruebas de desintegración y friabilidad. Si el control de dichos parámetros no cumple con los estándares específicos para cada producto en particular, el proceso de compresión se detiene, debiendo adecuarse los parámetros antes mencionados. Luego se realiza un nuevo control, el cual si es aprobado permite continuar el proceso.

Control de fabricación.

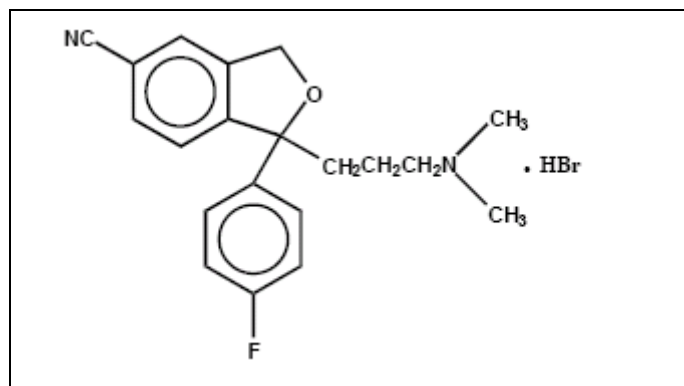
En esta área se realiza principalmente el control de fabricación de los diferentes productos, en sus diversas etapas de proceso (granulados, núcleos) como también de producto terminado (comprimidos, jarabes, suspensiones, granulados y polvos).

Según las características de la forma farmacéutica del producto y las especificaciones del laboratorio, se realizan los correspondientes análisis: identidad, pureza, potencia, valoración y uniformidad de contenido, con equipos tales como: HPLC y espectrofotómetro con arreglo de diodos. En la mayor parte de los análisis realizados, los resultados fueron satisfactorios, permitiendo al producto pasar a su siguiente etapa de fabricación. Sin embargo. En ciertas oportunidades, los análisis debieron ser realizados más de una vez. Si la repetición no resultaba satisfactoria, el producto era enviado a reproceso, a la vuelta de este. El producto, nuevamente analizado, en general era aprobado.

Descripción citalopram bromhidrato (2)

El citalopram bromhidrato es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI) y se administra oralmente.

El citalopram bromhidrato es designado como: (\pm)-1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carbonitrilo bromhidrato, con la siguiente fórmula estructural.



La fórmula molecular es $C_{20}H_{22}BrFN_2O$

Peso molecular: 405.4 g/mol

El citalopram bromhidrato se presenta como un polvo blanco levemente opaco. Es parcialmente soluble en agua y soluble en etanol.

Farmacodinámica (2)

El mecanismo de acción antidepresiva del citalopram, se presume que se liga a la potenciación de la actividad serotoninérgica en el sistema nervioso central, resultado de la inhibición de la recaptación neuronal de serotonina (5HT).

Los estudios in- vivo e in- vitro en animales, sugieren que el citalopram es un inhibidor altamente selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI), con efectos mínimos sobre la recaptación neuronal de noradrenalina y de dopamina.

Citalopram es una mezcla racémica (50/50) y la inhibición de recaptación de serotonina por citalopram es debido principalmente por el enantiómero S.

Citalopram posee muy baja o ninguna afinidad por los receptores. 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, α y β adrenérgicos, de la dopamina (D₁₋₂), histaminérgicos (H₁), gamaaminobutíricos, muscarínicos y receptores benzodiazepínicos (2)

Farmacocinética (²)

En un rango de 10 a 60 mg/día en dosis simple o múltiple el citalopram se comporta en forma lineal. La biotransformación del citalopram es netamente hepática con una vida media de alrededor de 35 horas, (con una dosis diaria la concentración plasmática en estado estacionario se logra aproximadamente en una semana)

Absorción y distribución (²)

Luego de una dosis oral simple de 40mg de citalopram, los niveles máximos en la sangre ocurren alrededor de las 4 horas. La biodisponibilidad absoluta del citalopram es del 80% en relación a una dosis intravenosa, y la absorción no se ve afectada por alimentos. El volumen de distribución es de aproximadamente 12 L/kg, y la unión del citalopram, desmetil citalopram (DCT) y didesmetil citalopram (DDCT) a las proteínas plasmáticas humanas es de alrededor del 80%.

Metabolismo y eliminación (²)

Después de la administración intravenosa de citalopram, la fracción de droga recuperada en la orina como citalopram y desmetil citalopram (DCT) es de alrededor del 10 y 5% respectivamente. El clearance sistémico de citalopram es de aproximadamente 330 mL/min. Con aproximadamente un 20% debido al clearance renal. Citalopram es metabolizado a desmetil citalopram (DCT), didesmetil citalopram (DDCT), óxido-N-citalopram y a un derivado del ácido propiónico desaminado. En humanos el citalopram se encuentra predominantemente inmodificado en el plasma. La concentración en el estado estacionario de los metabolitos de citalopram (DCT) y (DDCT) en el plasma, es de un medio y un décimo respectivamente, con respecto al citalopram. Estudios in- vitro han demostrado que el citalopram es 8 veces más

potente que sus metabolitos en la inhibición de la recaptación de serotonina, por lo tanto dichos metabolitos no contribuyen significativamente a la acción antidepresiva. Estudios in- vitro realizados sobre microsomas de hígado humano han demostrado que CYP3A4 y CYP2C19 son las isoenzimas principalmente involucradas en la N-demetilación del citalopram.

Interacciones fármaco-fármaco (²)

In- vitro los datos de inhibición enzimática no revelan un efecto inhibitorio del citalopram sobre CYP3A4, pero sugieren que es un débil inhibidor de CYP1A2, CYP2D6 y CYP2C19, por lo cual puede esperarse que el citalopram in- vivo posea un débil efecto inhibidor sobre los metabolismos mediados por esos citocromos, pero no se dispone de evidencia clínica que lo demuestre. Dado que citalopram es metabolizado por CYP3A4 y CYP2C19, existe la posibilidad de que el clearance de citalopram pueda disminuir si se administra en forma concomitante con un inhibidor potente de CYP3A4 (Ej.: ketoconazol, itraconazol, fluconazol o eritromicina) o con un potente inhibidor de CYP2C19 (Ej.: omeprazol), por lo cual debe tenerse presente en el momento de la administración a los pacientes.

1.3. Validación del sistema cromatográfico

Es la demostración documentada de que los parámetros que componen el método son adecuados para los requisitos de los datos analíticos.

Parámetros cromatográficos para la calibración del sistema

La calibración de un equipo consiste en un conjunto de operaciones que establecen una serie de relaciones, en condiciones específicas, entre los valores indicados por un instrumento y los correspondientes valores conocidos. El objetivo fundamental de la calibración de un equipo es tener seguridad en la medida. Los parámetros cromatográficos que nos permiten caracterizar y definir los cromatogramas y calibrar el sistema son los siguientes:

Línea de base:

Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil sin señal debida al soluto. ⁽⁶⁾

Relación o factor de capacidad (k)

Da la relación entre los tiempos de los solutos que intervienen en la fase estacionaria y en la fase móvil. Cuanto más grande sea este factor, más retenido estará el soluto por la fase estacionaria. ⁽⁶⁾

Número de platos teóricos (n)

Este parámetro indica la eficacia de la columna, ya que cuantos más anchos sean los picos, menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo, y por lo tanto podrán separarse menos componentes. (6)

Asimetría (As)

La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana, y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, motivo por el cual el valor ideal es lo más cercano a 1. (6)

1.4. Validación métodos analíticos.

La validación de los métodos analíticos es el establecimiento de la evidencia documentada que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de los atributos de calidad previamente establecidos. Es necesario validar para demostrar que los métodos son adecuados para los análisis propuestos en las condiciones descritas, y además porque es parte integral del desarrollo de un método analítico, También porque es necesario trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, y por último, porque resulta mucho más económico trabajar con métodos validados (7).

Según la USP XXVII (8) los métodos analíticos se clasifican en varias categorías para su validación. El método que es objeto de estudio en el presente trabajo pertenece a la categoría "I" y se clasifica dentro de los "métodos cuantitativos para la determinación del principio activo

como materia prima o en formulaciones farmacéuticas". Los parámetros de validación que se deben considerar varían según los requisitos legales exigidos por distintas organizaciones según la literatura consultada (8-9). Para este tipo de método debe evaluarse la selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

Selectividad (9)

La selectividad, es la capacidad del método para evaluar únicamente el principio activo íntegro de forma exacta y específica, en presencia de los componentes que puedan estar presentes, como por ejemplo: impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Linealidad (9)

La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba se relacionan adecuadamente a través del modelo propuesto.

Precisión (9)

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea.

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales. En este contexto definimos:

Reproducibilidad (⁷)

Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios.

Precisión intermedia (⁷)

Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, en diferentes días, diferentes analistas o equipos.

Exactitud (⁹)

La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real. La exactitud de un método analítico debe establecerse a lo largo de todo un rango de concentraciones.

Incertidumbre analítica (⁵)

La incertidumbre es un parámetro que, en general, comprende varios componentes. Los componentes pueden ser evaluados de distintas maneras.

Las formas de evaluar la incertidumbre estándar son: tipo A y tipo B

Tipo A: La incertidumbre tipo A, se relaciona con fuentes de error aleatorios, y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados, que pueden caracterizarse por desviaciones estándar.

Tipo B: La incertidumbre tipo B, no se determina por medios estadísticos, están asociadas a los errores de tipo sistemático; esto es, se estiman a partir de datos del fabricante del instrumento, especificaciones, certificados de calibración, y en general de datos subjetivos (¹)

La incertidumbre representa el intervalo en él que se puede encontrar el valor verdadero con mayor probabilidad.

Los parámetros para la estimación de incertidumbre son: incertidumbre estándar, incertidumbre estándar combinada e incertidumbre expandida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

- Programa estadístico computacional “**Statgraphics statistical graphis system**”
- Materia prima citalopram bromhidrato.
- Cromatógrafo Liquido de Alta Eficiencia (HPLC), Agilent Serie 1100, Código CC-ECR-4.

Detector DAD	N ° Serie DE01608414
Bomba Cuaternaria	N ° Serie DE91609119
Autosampler	N ° Serie DE91611592
Compartimiento Columna	N ° Serie DE91614374
Desgasificador	N ° Serie 5P73021196
- Cromatógrafo Liquido de Alta Eficiencia (HPLC), Hitachi Lachrom, Código CC-ECR-3. Compuesto de los siguientes módulos:

Bomba Cuaternaria	Modelo: L7100	N ° de Serie: 063-006
Detector Arreglo de Diodos	Modelo: L7450	N ° de Serie: 0702-025
- Columna RP-Select B (5µm) C-8 Merck N° 526304
- Espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard
Modelo 8452 A, Serie 3104601516
- pHmetro Fisher Scientific Modelo Accumet 50 Serie C0006941
- Sonicador Transsonic 460/H (ELMA R)
- Balanza analítica Sartorius Modelo A200S
- Material volumétrico tipo A

2.2. Metodología.

Se puede dividir básicamente en cuatro etapas:

- Confirmar la identidad del citalopram bromhidrato en columna Select B C-8. En equipo HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia)
- Preparación solución ácida (ácido fosfórico 0.05N pH4 TEA) para la fase móvil.
- Aplicación de parámetros de desempeño analítico: selectividad, linealidad, exactitud, precisión y estabilidad. Para el producto citalopram bromhidrato.
- Obtener a través de estudios de recuperación, el RSD del método y calcular la incertidumbre tipo A (¹⁻³⁻⁴). Por medios documentados establecer la incertidumbre tipo B (¹⁻³⁻⁴). De esta manera tener un cálculo aproximado de la incertidumbre combinada y expandida.

2.3. Confirmación de identidad.

Estándar.

Se prepara una solución con estándar de referencia del analito de interés (citalopram bromhidrato) y se determina su espectro UV en solvente adecuado, generalmente fase móvil en espectrofotómetro UV visible. También se prepara una muestra conteniendo el estándar para ser inyectada al HPLC, se obtienen ambos espectros y comparan (máximos y mínimos). Una vez confirmada la identidad se obtiene el tiempo de retención.

Muestra.

Se prepara una solución muestra conteniendo el analito, se inyecta al HPLC y se obtiene su espectro y tiempo de retención y se comparan ambos parámetros con los obtenidos en la solución estándar.

2.4. Metodología Analítica para el producto.

Preparación de la solución ácida:

Se prepara una solución de ácido fosfórico 0.05 N tomando 6.7 mL de ácido fosfórico concentrado (85%) y diluyendo a 2000 mL con agua HPLC. Ajustando a pH $4 \pm$ mediante la adición de Trietilamina (TEA).

2.5. Acondicionamiento del HPLC.

- Se limpia la columna cromatográfica con agua HPLC por 10 minutos aproximadamente y luego con metanol otros 10 minutos.
- Cambiar a fase móvil y esperar hasta que la presión y la línea base se estabilicen
- Se preparan 2 estándares y muestras según metodología analítica ⁽⁴⁾
- Se inyecta el estándar 1 cuatro veces para la calibración del equipo verificando que la repetibilidad de inyección sea menor de 2 %, luego se inyecta el estándar 2 y se verifica
- que la recuperación del estándar sea menor al 2% ⁽⁴⁾
- Se inyectan las muestras al HPLC. El estándar intermedio se inyecta cada 5 muestras cuya desviación entre lo obtenido y lo preparado no debe superar el 2 % para así asegurar que el equipo no ha perdido la calibración.
- Una vez finalizado el uso del equipo HPLC, se limpia de la siguiente manera: ingresando agua HPLC al equipo para eliminar las posibles sales que se pueden formar y obstruir el recorrido de la fase móvil (tiempo aproximado 15 minutos). Luego, se ingresa metanol aproximadamente 10 minutos y se registra la presión final en la bitácora.

Determinación de citalopram bromhidrato

Preparación solución estándar:

Se pesa exactamente alrededor de 100 mg de citalopram bromhidrato estándar (equivalente a 80 mg de citalopram) en matraz aforado de 100 mL, se afora con solución ácida (ácido fosfórico 0.05 N pH4 (TEA)). Se sonica durante 30 minutos, luego se toma una alícuota de 5 mL y lleva a matraz de 50 mL aforando con solución ácida (conc. Citalopram: 0.08 mg/mL).

Condiciones cromatográficas:

Columna	: RP Select B (C8) N° 526304
Fase Móvil	: Solución de Ácido Fosfórico 0.05 N pH=4 (TEA) / Metanol (50:50)
Detector UV	: 254 nm.
Flujo	: 1 mL/minuto.
Inyección	: 20 µL
TR	: Aprox. 3,5 minutos

2.6. Aplicación de parámetros de desempeño analítico

Selectividad.

- A) Blanco: se prepara medio de disolución de la muestra y estándares. Se inyecta y deja correr la cromatografía aproximadamente 30 minutos y se determina la contribución del placebo al cromatograma.
- B) Frente a componentes de la matriz: se prepara una solución de placebo la cual es 10 veces más concentrada que la de trabajo y se inyecta al cromatógrafo, se deja correr la cromatografía aproximadamente 30 minutos y se determina la contribución de los componentes de la matriz.

C) Frente a potenciales productos de degradación: se someten a degradación forzada soluciones conteniendo el analito 10 veces más concentrada que la concentración de trabajo. Se adicionan 10 mL de esta solución a 4 matraces erlenmeyer de 100mL y se procede de la siguiente forma:

- Agregar al matraz N°1 25 mL de una solución de HCl 0.5 N y someter a reflujo durante una hora.
- Agregar al matraz N°2 25 mL de una solución de NaOH 0.5 N y someter a reflujo durante una hora.
- Agregar al matraz N°3 25mL de una solución de HCl 0.5 N y granallas de zinc y someter a reflujo durante una hora.
- Agregar 5 mL de peróxido de hidrogeno (30 %) al matraz N°4, mezclar y dejar reaccionar durante 30 minutos.

Cada una de las muestras obtenidas se transfiere a un matraz de 100 mL y se afora con solución ácida (ácido fosfórico 0.05 N pH4). Las muestras se neutralizan previamente con 25 mL de HCl 0.5 N o NaOH 0.5 N según corresponda.

D) Materia prima en estado sólido sometida a degradación forzada: se dispone de suficiente cantidad de droga pura en dos placas petri bien cerradas y se procede a someter la placa N°1 a la acción del calor, exponiéndola a 105°C durante una semana, y se somete la placa N°2 a la acción de la luz o de una lámpara que simule la radiación UV durante una semana. Posteriormente se preparan soluciones muestra de acuerdo a la metodología analítica desarrollada como si fuera un estándar

Los puntos C y D, se analizaron de la siguiente manera:

- D) Se prepara una solución estándar la cual se inyecta 4 veces en el HPLC y se verifica la repetibilidad de inyección, la cual debe ser menor al 2 %

- II) Se inyectan las muestras de degradación forzada obtenidas en los puntos C y D y se deja eluir las muestras durante 30 minutos, luego se reporta la aparición de cualquier peak extraño correspondiente a productos de degradación.

Linealidad.

- A) Se preparan soluciones estándar que contengan aproximadamente 50 %, 75%, 100%, 125%, 150% de la concentración teórica y se inyectan en quintuplicado.
- B) Se gráfica la señal obtenida (área del peak) v/s su correspondiente concentración.
- C) Se obtiene la pendiente, intercepto y coeficiente de regresión

Exactitud.

- A) Se preparan 3 muestras cada una a un nivel de concentración diferente 70 %, 100%, 130% e inyecta por duplicado, se calcula el porcentaje obtenido, la recuperación de las 9 muestras en base de lo agregado, la recuperación media, la desviación estándar y el coeficiente de regresión (Total 9 muestras)

Precisión por repetibilidad.

- A) Se representa por el análisis estadístico, de los datos obtenidos de las mediciones de curvas de linealidad.

Evaluación de estabilidad de muestras y estándares.

Esta evaluación consta en la medición de la variación de concentración que podría experimentar el principio activo (citalopram bromhidrato) a estudiar durante el tiempo de duración de los análisis. Corresponde a una estabilidad a corto plazo en la cual se miden muestras almacenadas en distintas condiciones ambientales (temperatura ambiente y 4° C en refrigerador), las cuales

corresponden a los lugares donde se almacenan las muestras o las condiciones ambientales de trabajo.

2.7. Parámetros para la estimación de incertidumbre

Incertidumbre Estándar: $u(y')$

Cada componente de la incertidumbre (y'), expresada como desviación estándar.

Incertidumbre estándar Combinada: $u_c(y)$

Para el resultado y (Ley de propagación de errores)

Incertidumbre expandida: U

Proporciona un intervalo dentro del cual se cree que está el valor del medido, cuando por razones de seguridad o salud se necesite expresar la incertidumbre con un alto nivel de confianza, se multiplica esta incertidumbre combinada por un factor de cobertura o seguridad K .

$$U = K u_c(y)$$

K = factor de seguridad o de cobertura. Para un nivel de confianza del 95%, se considera un valor de K igual a 2.

Componentes de la incertidumbre.

La incertidumbre de un resultado puede originarse por diferentes causas, algunas de ellas son:

- Inadecuada definición del medido

- Muestreo
- Efectos de la matriz e interferencias
- Contaminación durante el muestreo o la preparación de la muestra
- Incertidumbre de pesas y material volumétrico
- Pureza de reactivos
- Valores asignados a patrones y materiales de referencia
- Calibración de equipos, etc.

Reglas para el cálculo de la incertidumbre combinada

Regla 1: Sumas y restas: $y = a + b + c + \dots$

$$u(y) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + u(c)^2 + \dots}$$

Regla 2: Productos y cocientes: $y = abc$ o $y = a/bc$

$$\frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{u(a)}{a}\right]^2 + \left[\frac{u(b)}{b}\right]^2 + \left[\frac{u(c)}{c}\right]^2}$$

Regla 3: Exponentes: $y = a^n$

$$\frac{u(y)}{y} = n \frac{u(a)}{a}$$

Cálculo de incertidumbre tipo A

Se desarrolla una serie de experimentos, 5 repeticiones en cada equipo HPLC en diferentes días utilizando la misma columna cromatográfica Select B C8, se registra la recuperación de citalopram bromhidrato se calcula el promedio tanto para el equipo 1 como para el 2, se calcula el promedio final y se divide por la raíz del número de repeticiones, así de esta manera se obtiene una aproximación al valor de incertidumbre tipo A.

Cálculo de incertidumbre tipo B

Para el cálculo de incertidumbre tipo B se establece primero de forma independiente la contribución tanto de la pesada como del proceso de dilución a que fue sometida la muestra de citalopram bromhidrato, aquí se establece por medios documentados la calibración de la balanza, la especificación de las masas, la incertidumbre del estándar, la incertidumbre de los matraces aforados y de la pipeta. Luego se combinan estas incertidumbres y se obtiene el valor de la incertidumbre tipo B.

Cálculo de incertidumbre combinada

Luego de tener los valores tanto de la incertidumbre tipo A como la de tipo B, se procede a calcular la incertidumbre combinada, a través, de las regla N°1 de sumas y restas de incertidumbres parciales.

3. RESULTADOS

3.1. Validación citalopram bromhidrato.

Confirmación de identidad

En la figura N°1 se muestra un cromatograma representativo, obtenido a partir de una solución estándar de referencia de citalopram bromhidrato.

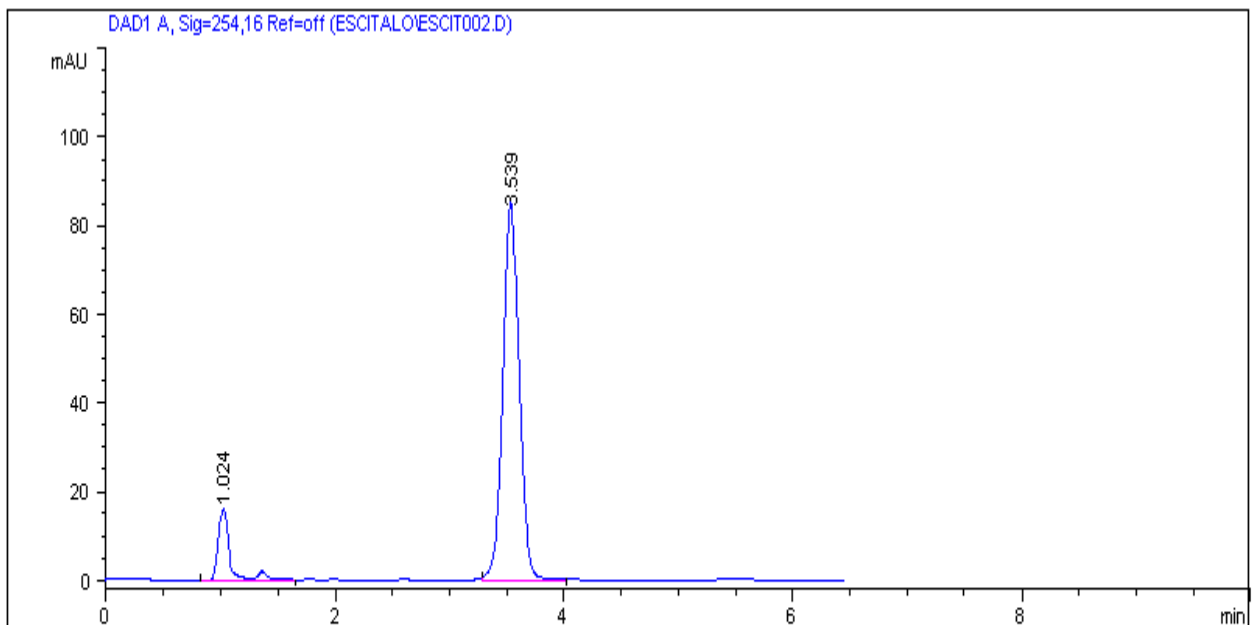


Figura N°1: Cromatograma obtenido de la inyección de citalopram bromhidrato estándar RT 3.539 min. $A_s = 1.002$

Aplicación de parámetros de desempeño analítico.

Selectividad.

- Comportamiento del medio de disolución: Al inyectar el medio de disolución al HPLC se dejó eluir por 30 minutos y no se observó ninguna señal. Esto indica que no hay influencia del medio de disolución en la determinación cromatográfica.
- Frente a componentes de la matriz: cuando se inyectó una muestra de placebo 10 veces más concentrada que la solución de trabajo, con elución de 30 min. no apareció señal alguna al tiempo de retención del principio activo citalopram bromhidrato. confirmando así la no influencia de la matriz en la determinación cromatográfica.
- Frente a potenciales productos de degradación: En la tabla N°1 se muestran los resultados obtenidos de la degradación forzada de citalopram bromhidrato.

Tabla N°1 Degradación forzada para p.a citalopram bromhidrato.

Tipo de ensayo	Especificación de pureza	Resultado
Selectividad al medio de disolución	Sin presencia de señales al tiempo de retención del citalopram	No hay señal
Selectividad a la matriz	Sin presencia de señales al tiempo de retención del citalopram	No hay señal
Fotólisis	(98-102) %	100 % de pureza
Termólisis	(98-102) %	100% de pureza
Hidrólisis ácida	(98-102) %	100% de pureza
Hidrólisis básica	(98-102) %	Degradación
Reducción	(98-102) %	100 % de pureza
Oxidación	(98-102) %	100 % de pureza

La degradación forzada constituye una prueba para evaluar el comportamiento de los principios activos a estudiar en situaciones de estrés por ejemplo: alta temperatura 105°C, acción de la luz, presencia de soluciones oxidantes y reductoras. El fin de este ensayo es obtener los productos de degradación que potencialmente podrían aparecer en un estudio de estabilidad y, determinar si la metodología analítica es selectiva a través de la pureza del peak cromatográfico, el criterio de aceptación más importante de este ensayo es que las probables señales que aparezcan no deben interferir con la señal del principio activo o de la molécula intacta. De esta manera las señales obtenidas en ensayos futuros serán, con una alta probabilidad, respuesta del p.a estudiado y no de mezclas del analito- interferencias (4)

Linealidad y rango.

En la tabla N°2 aparecen los resultados obtenidos en la determinación de la linealidad para citalopram bromhidrato. En la figura N°2 aparece la representación gráfica de la curva de calibración respectiva.

Tabla N°2 Resultados obtenidos del ensayo de linealidad para citalopram bromhidrato.

	41.20 µg/mL	60.45 µg/mL	80.48 µg/mL	105.18 µg/mL	120.60 µg/mL
Área	51.5 %	75.6 %	100.6 %	131.5 %	150.7 %
1	449.783	663.610	883.086	1151.300	1318.236
2	451.572	664.205	884.637	1157.670	1320.640
3	453.167	663.245	886.043	1157.815	1321.888
4	453.336	663.353	888.256	1160.380	1325.819
5	454.024	665.455	890.265	1162.431	1329.359
Área promedio	452.4	664.0	886.5	1157.9	1323.2
DS	1.706	0.908	2.854	4.192	4.408
RSD	0.377	0.137	0.322	0.362	0.333

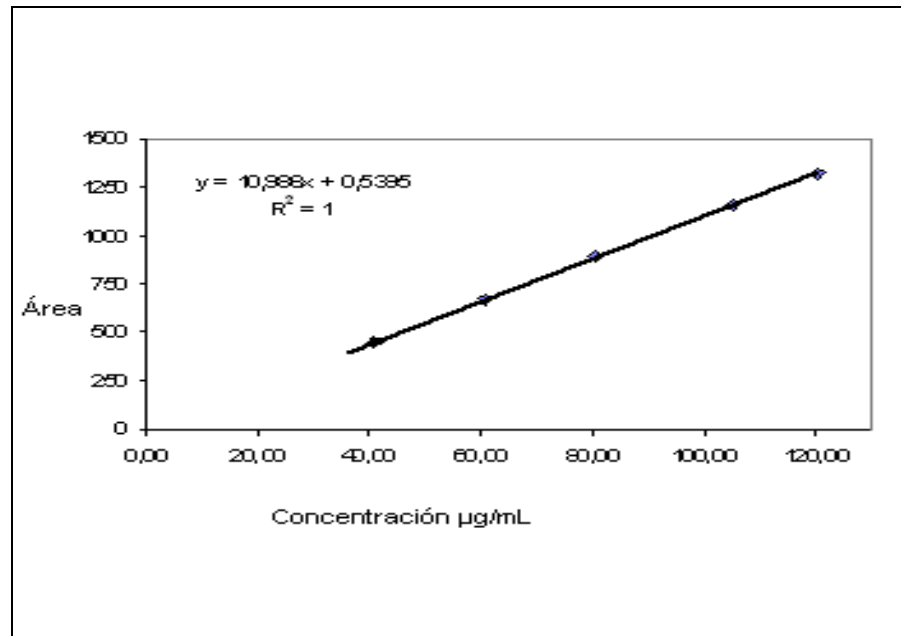


Figura N°2 expresión gráfica de la recta obtenida para la determinación de la linealidad de la metodología analítica para cuantificación de citalopram bromhidrato.

En la tabla N°3 se muestra un resumen con las principales características de la curva de calibración utilizada para la determinación de la linealidad.

Tabla N°3: Características de la curva de calibración para citalopram bromhidrato.

	citalopram bromhidrato
Coefficiente de correlación (r)	0.99999
Pendiente	10.986
Intercepto	0.540
Numero de repeticiones (n)	5

Uno de los criterios elegidos en este estudio para evaluar la linealidad de las metodologías fue el índice de correlación “r”. En la tabla N° 3 aparece el resultado obtenido para este parámetro, el cual fue de 0.99999 para citalopram bromhidrato. Este resultado demuestra que se cumplió el criterio establecido. En la práctica generalmente “r” es mayor de 0.999. Sin embargo, el mejor indicador para evaluar el modelo lineal es un prueba estadística, el test de Student, en el cual se

calcula un valor t experimental (t_{exp}) con n-2 grados de libertad y se compara con un t tabla (t_{tabla}) para el nivel de confianza requerido (generalmente 95% o $p > 0.05$)

En la tabla N°4 se encuentran los valores de t_{exp} y t_{tabla} para la curva obtenida. La ecuación que da cuenta de t_{exp} es:

$$t_{\text{exp}} = \frac{r \times \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Criterio de aceptación: la recta es lineal cuando t_{exp} es mayor que t_{tabla}

Tabla N° 4: Cuadro resumen de criterios estadísticos (t de Student) para evaluación de la linealidad de la metodología analítica.* Anexo N°3

	citalopram
t_{exp}	340.95
t_{tabla}	2.353
$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	Si

De los resultados anteriores puede señalarse que: existe una correlación lineal en la metodología analítica, por lo tanto es lineal dentro de las concentraciones estudiadas.

Exactitud.

En la tabla N°5 se muestran los datos obtenidos para la determinación de la exactitud en el producto citalopram bromhidrato. En este caso se prepararon tres muestras con 70%, 100 %, 130% de la concentración estimada del analito y se analizo cada una por duplicado.

Tabla N° 5 Resultados de ensayo de exactitud para citalopram bromhidrato

% Teórico	% Recuperación			Promedio	DE
70	99.7	101.4	102.2	101.1	1.27
100	100.0	100.6	100.6	100.4	0.35
130	99.1	101.3	100.1	100.2	1.10

Porcentaje de recuperación media n: 9	100.5
Desviación estándar	0.958
Coefficiente de variación (RSD)	0.95%

La exactitud debe ser tan alta como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Lo que quiere decir que la recuperación del analito debe ser cercana al 100%.

Para evaluar si cumple con los requisitos fijados se realizó un test estadístico ó t Student, efectuando varias determinaciones y calculando el t experimental que se compara con el t_{tabla} para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido (95% generalmente). La ecuación para t_{exp} es la siguiente:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - X| \sqrt{n}}{RSD}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{(100 - 100.5) \sqrt{9}}{0.95} = 1.58$$

Si t_{exp} resulta menor que el t_{tabla}, el método tiene la exactitud requerida para este nivel de confianza. Es decir, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es la apropiada.

Tabla N°6: Cuadro resumen de los resultados del test estadístico efectuado para la determinación de la exactitud. Anexo N°3

	citalopram
t_{exp}	1.58
t_{tabla}	1.860
t_{exp}<t_{tabla}	Si

De acuerdo con los datos obtenidos, $t_{exp} < t_{tabla}$, por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100% para la metodología analítica en estudio, por lo cual se puede señalar que es exacta.

Precisión.

En la tabla N° 7 se muestran los resultados correspondientes al ensayo de precisión por repetibilidad para la metodología analítica del principio activo citalopram bromhidrato.

Tabla N° 7: Resultados de la precisión por repetibilidad obtenido para p.a citalopram bromhidrato.

	RSD
Concentración Aproximada	citalopram bromhidrato
50 %	0.377 %
75 %	0.137 %
100 %	0.322 %
125 %	0.362 %
150 %	0.333 %

* Los resultados en extenso aparecen en el anexo N° 1.

Los resultados muestran valores de RSD menores al criterio establecido en este estudio (2%) (4).

Lo que indica que la metodología desarrollada es precisa. Es decir hay un alto grado de concordancia en el ensayo cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

Estabilidad de las muestras sometidas a almacenamiento.

En la tabla N° 8 se muestran los resultados de la evaluación de estabilidad para las muestras de citalopram bromhidrato. El día 1 se prepararon 2 estándares con los cuales se realizó la calibración del HPLC luego se tomaron 2 muestras que fueron analizadas, los estándares y muestras fueron guardados durante 24 horas en distintas condiciones ambientales, una a temperatura ambiente y la otra en refrigerador a 4° C. El día 2 se vuelve a calibrar con estándares recién preparados y se leen las muestras guardadas.

Tabla N° 8 Resultados de evaluación de estabilidad para citalopram bromhidrato valores 24 hrs T ° ambiente 25°C y 24 hrs refrigerador 4°C.

		LECTURA DÍA 2	PROMEDIO	VALOR INICIAL DIA 1	% VARIACIÓN
ST1	25°C	0.08157	0.08135	0.08040	1.18%
ST1	25°C	0.08112			
ST2	25°C	0.07937	0.07942	0.07886	0.71%
ST2	25°C	0.07946			
M1	25°C	0.08242	0.08255	0.08189	0.81%
M1	25°C	0.08267			
M2	25°C	0.08187	0.08176	0.08077	1.23%
M2	25°C	0.08164			
ST1	4°C	0.08169	0.08164	0.08040	1.54%
ST1*	4°C	0.08159			
ST2*	4°C	0.07950	0.07964	0.07886	0.99%
ST2*	4°C	0.07977			
M1*	4°C	0.08313	0.08291	0.08189	1.25%
M1*	4°C	0.08269			
M2*	4°C	0.08169	0.08184	0.08077	1.32%
M2*	4°C	0.08199			
Promedio % Variación 25°C ambiente		0.98%			
Promedio % Variación 4°C refrigerador		1.28%			

La evaluación de la estabilidad es un ensayo para determinar si son estables las concentraciones de los p.a durante el tiempo de trabajo, es decir de un día para otro (24 hrs), la variación de concentración no debe ser mayor a un 2% con respecto a los resultados obtenidos del primer día de análisis (⁴)

En la tabla N° 8 aparecen las variaciones tanto para las muestras a temperatura ambiente como las guardadas a 4° C y en ellas se puede apreciar que ninguna de las muestras supera el 2%. De lo que se deduce que el principio activo citalopram bromhidrato es estable a condiciones de almacenamiento de 24 hrs tanto a temperatura ambiente como refrigerado. Lo cual se traduce en confianza de los resultados obtenidos en la validación y en futuros análisis.

3.2. Cálculo de incertidumbre

Cálculo de incertidumbre tipo A.

La incertidumbre tipo A se relaciona con fuentes de error aleatorios, y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados (ver anexo N°2), que pueden ser caracterizadas a partir de desviaciones estándar.

Tabla N° 9 Serie de experimentos repetidos diferentes días y en diferentes equipos.

Día	Equipo 1	Equipo 2	% Recuperación	RSD
10/10/2006	Merck hitachi/inyección manual		100.5 %	0.94
11/01/2006	Merck hitachi/inyección manual		100.6 %	1.5
12/01/2006	Merck hitachi/inyección manual		100.2 %	1.12
13/01/2006	Merck hitachi/inyección manual		99.9 %	1.33
16/01/2006	Merck hitachi/inyección manual		99.8 %	0.65
08/11/2005		Agilent/inyección automática	99.1 %	0.31
09/01/2006		Agilent/inyección automática	99.7 %	0.95
17/01/2006		Agilent/inyección automática	100.5 %	0.75
20/01/2006		Agilent/inyección automática	99.8 %	0.95
22/01/2006		Agilent/inyección automática	100.1 %	0.82
Promedio equipo 1			100.2 %	1.108
Promedio equipo 2			99.4 %	0.756
Promedio final			99.8 %	0.932

$$u = \frac{RSD_{promedio}}{\sqrt{n}} \Rightarrow u = \frac{0.932}{\sqrt{10}} \Rightarrow u = 0.295$$

Cálculo de la incertidumbre tipo B

Cálculo de incertidumbre pesada

- Calibración de la balanza u_{bal}
- Repetibilidad de la pesada $u_{Rep.}$
- Especificación de las masas u_{masas}

$$u_{mstd} = \sqrt{\left(u_{bal}\right)^2 + \left(u_{rep}\right)^2 + \left(u_{masas}\right)^2}$$

Incertidumbre en la pesada de 100 mg del estándar.

Desarrollando: $\left(\frac{u(mstd)}{Mstd}\right)^2 =$

- **Calibración de la balanza:** u_{bal}

Según la información proporcionada por el certificado de calibración: para el rango de 100mg la incertidumbre es:

$$\pm 0.00005g \text{ (K=2)}$$

Esto significa una incertidumbre estándar de:

$$u_{bal} = \frac{0.00005g}{2} = 2.5 \times 10^{-2} mg$$

Repetibilidad de la pesada (masas): u_{rep}

La desviación estándar de una masa patrón efectuada en el rango de pesada 100mg es de 0.00006g (n=10) ver tabla N°10.

$$u_{rep} = \frac{0.00006g}{\sqrt{10}} = 0.00002g \Rightarrow 0.02mg$$

Tabla N°10: repetibilidad de la pesada con intervalo de 5 segundos.

Nº lectura	Lecturas de las pesas (g)
1	0.0999
2	0.1000
3	0.0999
4	0.1001
5	0.1000
6	0.0999
7	0.1000
8	0.1000
9	0.1000
10	0.1000
X	0.09998
DE	0.00006

• **Calibración de las masas: u_{masas}**

Trazabilidad: Laboratorio Custodio de los patrones nacionales de masa de Chile.

Según la información proporcionada por el certificado de calibración de las masas patrón de 100 mg la incertidumbre es:

$$\pm 0.05\text{mg} \text{ (K=2)}$$

Esto significa una incertidumbre estándar de:

$$u_{\text{masas}} = \frac{0.05\text{mg}}{2} = 0.025\text{mg}$$

Entonces:

$$u_{\text{mstd}} = \sqrt{\left(u_{\text{bal}}\right)^2 + \left(u_{\text{rep}}\right)^2 + \left(u_{\text{masas}}\right)^2}$$

$$u_{\text{mstd}} = \sqrt{(0.025\text{mg})^2 + (0.02\text{mg})^2 + (0.025\text{mg})^2}$$

$$u_{\text{mstd}} = 0.04\text{mg}$$

$$\text{Desarrollando: } \left(\frac{u(\text{mstd})}{M\text{std}}\right)^2 = \left(\frac{0.04\text{mg}}{100\text{mg}}\right)^2 = 1.6 \times 10^{-7}$$

Cálculo de incertidumbre por dilución

$$\frac{P_{std}}{100mL} \xrightarrow{5} 50 mL$$

$$P_{st} = 100 \text{ mg}$$

Expresión del cálculo de incertidumbre asociado al proceso de dilución:

$$u(c) = C(dil) \times \sqrt{\left(\frac{u(c_{std})}{C_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(v_{std})}{v_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(v_{fin})}{v_{fin}}\right)^2}$$

Incertidumbre asociada a la concentración del estándar

$$\text{Pureza M.R } (100.02 \pm 0.15) \text{ mg}$$

Matraz de (100 ± 0.06) mL (incertidumbre estándar)

Matraz de (50 ± 0.03) mL (incertidumbre estándar)

Pipeta (5 ± 0.009) mL (incertidumbre estándar)

$$C_{std} = \frac{P_{std}}{V_{inicial}} \Rightarrow \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 1 \text{ mg / mL}$$

Incertidumbre de C (std)

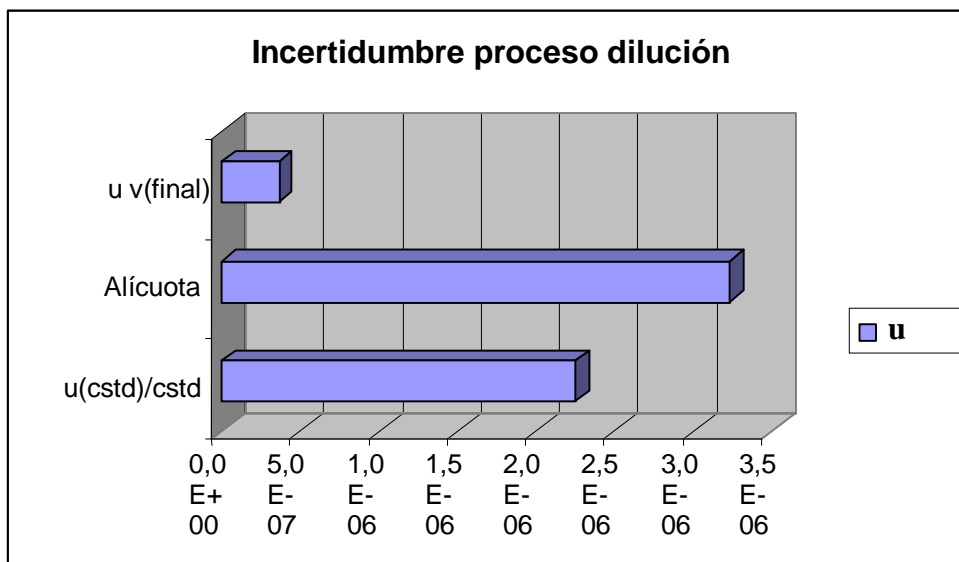
$$C_{std} = 1\text{mg} / \text{mL} \pm \sqrt{\left(\frac{0.15}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.06}{100}\right)^2}$$

$$C_{std} = 1\text{mg} / \text{mL} \pm 0.0015$$

$$C_{dil} = \frac{C_{std} \times V_{std}}{V_{final}} \Rightarrow C_{dil} = \frac{1\text{mg} / \text{mL} \times 5\text{mL}}{50\text{mL}} \Rightarrow C_{dil} = 0.1\text{mg} / \text{mL}$$

- $\left(\frac{u(c_{std})}{c_{std}}\right)^2 = \left(\frac{0.0015\text{mg} / \text{mL}}{1\text{mg} / \text{mL}}\right)^2 = 2.25 \times 10^{-6}$ **Incertidumbre del estándar.**
- $\left(\frac{u(V_{std})}{V_{std}}\right)^2 = \left(\frac{0.009\text{mL}}{5\text{mL}}\right)^2 = 3.24 \times 10^{-6}$ **Incertidumbre de la alícuota.**
- $\left(\frac{u(V_{final})}{V_{final}}\right)^2 = \left(\frac{0.03\text{mL}}{50\text{mL}}\right)^2 = 3.6 \times 10^{-7}$ **Incertidumbre del matraz.**

Fig. N° 2: Gráfico comparativo de aportes de cada fuente de incertidumbre en el proceso de dilución.



Sustituyendo las incertidumbres parciales en la ecuación general de incertidumbre por dilución tenemos:

$$u(c) = C(dil) \times \sqrt{\left(\frac{u(cstd)}{Cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vstd)}{vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vfin)}{vfin}\right)^2}$$

$$u(c) = 0.1 \text{ mg / mL} \times \sqrt{\left(2.25 \times 10^{-6}\right) + \left(3.24 \times 10^{-6}\right) + \left(3.6 \times 10^{-7}\right)}$$

$$u(c) = 0.1 \text{ mg / mL} \times 2.419 \times 10^{-3}$$

$$u(c) = 2.42 \times 10^{-4} \text{ mg / mL} \quad \text{Incertidumbre tipo B errores sistemáticos y datos de fabricante.}$$

Para el proceso de dilución.

Cuadro resumen

Incertidumbre tipo B	
U _{peso}	1.6×10^{-7}
U _{diluciones}	2.42×10^{-4}
Incertidumbre tipo A	
U _{reproducibilidad}	2.95×10^{-1}

La incertidumbre tipo B en el presente trabajo se divide en la incertidumbre de dilución y pesada, en este caso la incertidumbre de pesada es despreciable con respecto a la incertidumbre de la dilución. De igual forma la incertidumbre tipo A por ser 3 magnitudes mayor que la incertidumbre tipo B que es la representación final de la incertidumbre combinada para esta metodología analítica por HPLC.

Ahora la incertidumbre combinada final es la siguiente:

$$u_c = \sqrt{\left(u_{tipoA}\right)^2 + \left(u_{tipoB}\right)^2} \Rightarrow u_c = \sqrt{\left(2.95 \times 10^{-1}\right)^2 + \left(2.42 \times 10^{-4}\right)^2}$$

$$u_c = 0.295$$

Teniendo el resultado de la incertidumbre combinada estándar podemos calcular la incertidumbre expandida (U). Del método analítico antes validado.

$$U = K \times u_c$$

$$U = 2 \times 0.295$$

$$U = 0.59\%$$

K= factor de seguridad o de cobertura. Aprox. K=2 para un nivel de confianza del 95%

4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El análisis de incertidumbre en el análisis químico es extremadamente relevante dentro de la administración de los recursos de un laboratorio de control de ensayo, porque conocer la incertidumbre de los métodos de análisis da un valor tremendo a la calidad de los productos certificados, y a la trazabilidad del resultado informado.

La incertidumbre es quizás la única forma de medir objetivamente a un laboratorio de control de ensayo, incluso más allá del sistema de documentación.

El diseño experimental desarrollado en el presente trabajo, fue adecuado ya que permitió desarrollar la metodología analítica para el citalopram bromhidrato en la determinación cuantitativa por HPLC.

La metodología analítica descrita para citalopram bromhidrato resultó ser selectiva y lineal dentro del rango de concentración de 50% a 150% de la concentración de trabajo.

Los parámetros de exactitud y precisión fueron aprobados y validados dentro de los rangos establecidos en la metodología.

Con respecto a la incertidumbre, uno de los componentes más importantes es la incertidumbre del procedimiento. Este componente considera la variabilidad experimental de los resultados debida a las condiciones en que se efectúa el análisis (analista, día, calibrado, instrumento, etc.) y se calcula a partir de la recuperación de diferentes muestras (precisión intermedia del método).

Una forma de disminuir la incertidumbre es mantener en condiciones de aptitud equipos y

analistas, dentro de las variables más importantes de controlar están los parámetros de desempeño de método donde la eficiencia de columna cromatográfica juega un papel de vital importancia.

Cabe destacar la aproximación de los valores de la precisión por repetibilidad y el resultado del cálculo de la incertidumbre de medida, ya que ambos valores bordean el 0.3% lo que demuestra en parte que un grado de incertidumbre se genera de forma propia por el instrumento de medida (HPLC).

5. REFERENCIA

- 1.-Elizondo,A.(1993) Manual de aseguramiento metrológico industrial. Basado en los requerimientos de calidad de la normativa QS-9000 (11-19) Ediciones Castillo, S.A
- 2.-http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2004/apr_PI/Celexa_annotated_PI.pdf -actualización 06-10-2004 Rev: 13-03-2006
- 3.-NCh 2755/1 of 2003 Guía para cuantificación y expresión de la incertidumbre en el análisis químico-parte 1.
- 4.-Protocolo general de validación, Laboratorio Bagó de Chile S.A
- 5.-Quantifyng Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide (2000), 2° edition. (16-20)
- 6.-Quattrocchi,O.(1992) Introducción a la HPLC aplicación y práctica. (46-51)
- 7.-The Fitness for Purpose of Analytical Methods, EURACHEM Working Group (1998). (3-7)
- 8.-USP XXVII Ed. (2004) Validation of Compendial Methods. (2622-2625)
- 9.-Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH 1996 (International Conference on Harmonisation). (1-8)

ANEXOS.

Anexo N° 1 Resultados en extenso para la precisión por repetibilidad del principio activo citalopram bromhidrato.

Tabla N° 11 Resultados de la precisión por repetibilidad obtenidos para citalopram bromhidrato.

Concentración en porcentaje del valor teórico a cuantificar	Área	RSD
51.5	449.783 451.572 453.167 453.336 454.024	0.377 %
75.6	663.610 664.205 663.245 663.353 665.455	0.137 %
100.6	883.086 884.637 886.043 888.256 890.265	0.322 %
131.5	1151.300 1157.670 1157.815 1160.380 1162.431	0.362 %
105.7	1318.236 1320.640 1321.888 1325.819 1329.359	0.333 %

Anexo N° 2 Resultados en extenso para la recuperación por reproducibilidad del principio activo citalopram bromhidrato.

Tabla N ° 12 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática.

Día 08/11/2005.

%	Peso(mg)	Conc(mg/ml)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.2	0.0569	0.0564	99.0	99.1%
70	74.2	0.0569	0.0565	99.1	
70	73.7	0.0565	0.0558	98.7	98.8%
70	73.7	0.0565	0.0559	98.8	
70	73.3	0.0562	0.0560	99.5	99.4%
70	73.3	0.0562	0.0558	99.2	
St intermedio			0.0807	100.3%	
100	103.8	0.0796	0.0789	99.1	99.1%
100	103.8	0.0796	0.0788	99.0	
100	107.2	0.0822	0.0820	99.7	99.6%
100	107.2	0.0822	0.0819	99.6	
100	108.2	0.0830	0.0823	99.2	99.3%
100	108.2	0.0830	0.0825	99.4	
St intermedio			0.0809	100.6%	
130	134.7	0.1033	0.1023	99.0	99.1%
130	134.7	0.1033	0.1026	99.3	
130	137.3	0.1053	0.1039	98.7	98.7%
130	137.3	0.1053	0.1039	98.6	
130	135.9	0.1043	0.1035	99.3	99.3%
130	135.9	0.1043	0.1036	99.3	
St Final			0.0810	100.7%	
Promedio de recuperación final					99.1%
RSD					0.31%

Tabla N ° 13 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática.

Día 09/11/2005.

%	Peso(mg)	Conc(mg/ml)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.7	0.0573	0.0575	100.4%	100.1%
70	74.7	0.0573	0.0572	99.8%	
70	74.4	0.0571	0.0568	99.5%	99.5%
70	74.4	0.0571	0.0568	99.5%	
70	74.5	0.0572	0.0571	99.9%	99.9%
70	74.5	0.0572	0.0571	99.9%	
St intermedio			0.0792	99.5%	
100	106.9	0.0820	0.0818	99.7%	99.7%
100	106.9	0.0820	0.0818	99.8%	
100	106.7	0.0819	0.0812	99.2%	99.3%
100	106.7	0.0819	0.0813	99.4%	
100	107.6	0.0825	0.0817	99.0%	99.2%
100	107.6	0.0825	0.0820	99.4%	
St intermedio			0.0792	99.5%	
130	135.1	0.1036	0.1017	98.1%	98.2%
130	135.1	0.1036	0.1019	98.3%	
130	137.5	0.1055	0.1055	100.0%	100.0%
130	137.5	0.1055	0.1055	100.0%	
130	135.6	0.1040	0.1058	101.7%	101.7%
130	135.6	0.1040	0.1058	101.7%	
St Final			0.0794	99.7%	
Promedio de recuperación final					99.7%
RSD					0.95

Tabla N ° 14 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática.

Día 17/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	lectura	Recup%	Promedio
70	73.9	56.693	57.097	100.7	100.7%
70	73.9	56.693	57.030	100.6	
70	74.6	57.230	57.294	100.1	100.0%
70	74.6	57.230	57.222	100.0	
70	74.5	57.154	57.448	100.5	100.5 %
70	74.5	57.154	57.419	100.5	
St intermedio			80.457	100.2%	
100	105.8	81.166	81.434	100.3	100.9%
100	105.8	81.166	82.306	101.4	
100	107.7	82.623	82.862	100.3	100.1%
100	107.7	82.623	82.631	100.0	
100	106.2	81.473	81.531	100.1	100.5%
100	106.2	81.473	81.600	100.2	
St intermedio			80.311	100.0%	
130	147.2	112.926	114.173	101.1	101.1%
130	147.2	112.926	114.213	101.1	
130	151.8	116.455	115.531	99.2	99.1%
130	151.8	116.455	115.192	98.9	
130	148.6	114.000	115.254	101.1	101.7%
130	148.6	114.000	116.629	102.3	
St Final			81.500	101.5%	
Promedio de recuperación final					100.5%
RSD					0.75%

Tabla N ° 15 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática.

Día 20/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.4	57.077	56.343	98.7	98.6%
70	74.4	57.077	56.208	98.5	
70	74.7	57.307	57.025	99.5	99.2%
70	74.7	57.307	56.709	99.0	
70	73.8	56.617	56.021	98.9	99.9%
70	73.8	56.617	57.090	100.8	
St intermedio			86.873	100.1%	
100	104.4	80.092	79.487	99.2	99.6%
100	104.4	80.092	80.136	100.1	
100	105.2	80.705	81.965	101.6	101.7%
100	105.2	80.705	82.134	101.8	
100	105.8	81.166	81.581	100.5	99.7%
100	105.8	81.166	80.321	99.0	
St intermedio			86.589	99.8%	
130	138.7	106.405	104.869	98.6	98.8%
130	138.7	106.405	105.339	99.0	
130	134.5	103.183	103.031	99.9	99.8%
130	134.5	103.183	102.967	99.8	
130	134.4	103.107	102.128	99.1	100.7%
130	134.4	103.107	105.615	102.4	
St Final			86.885	100.1%	
Promedio de recuperación final					99.8%
RSD					0.95%

Tabla N ° 16 Resultados de la recuperación equipo HPLC Agilent 1100 inyección automática.

Día 22/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	72.5	55.619	55.848	100.4	100.3%
70	72.5	55.619	55.719	100.2	
70	73.6	56.463	57.023	101.0	101.0%
70	73.6	56.463	57.083	101.1	
70	73.6	56.463	56.679	100.4	100.3%
70	73.6	56.463	56.588	100.2	
St intermedio			80.862	100.1%	
100	107.7	82.623	81.421	98.5	98.7%
100	107.7	82.623	81.633	98.8	
100	108.3	83.084	82.230	99.0	99.0%
100	108.3	83.084	82.254	99.0	
100	106.8	81.933	82.493	100.7	100.8%
100	106.8	81.933	82.622	100.8	
St intermedio			81.104	100.4%	
130	134.8	103.413	103.185	99.8	99.6%
130	134.8	103.413	102.842	99.4	
130	136.4	104.641	104.992	100.3	100.5%
130	136.4	104.641	105.247	100.6	
130	136.8	104.948	105.668	100.7	100.6%
130	136.8	104.948	105.567	100.6	
St Final			81.383	100.7%	
Promedio de recuperación final					100.1%
RSD					0.82%

Tabla N ° 17 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 10/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.6	57.2303	57.1860	99.9	99.7%
70	74.6	57.2303	56.9260	99.5	
70	73.9	56.6933	57.4500	101.3	101.4%
70	73.9	56.6933	57.4720	101.4	
70	74.8	57.3837	58.2770	101.6	102.2%
70	74.8	57.3837	58.9690	102.8	
St intermedio			79.61	100.4%	
100	110.2	84.5413	85.1470	100.7	100%
100	110.2	84.5413	83.9200	99.3	
100	105.3	80.7822	81.0990	100.4	100.6%
100	105.3	80.7822	81.3780	100.7	
100	107.2	82.2398	82.9310	100.8	100.6%
100	107.2	82.2398	82.4990	100.3	
St intermedio			78.8330	99.4%	
130	136.4	104.6409	103.0770	98.5	99.1%
130	136.4	104.6409	104.3020	99.7	
130	134.5	103.1833	104.3020	101.1	101.3
130	134.5	103.1833	104.7210	101.5	
130	135.1	103.6436	102.9300	99.3	100.1
130	135.1	103.6436	104.5180	100.8	
St Final			80.69	101.7%	
Promedio de recuperación final					100.5%
RSD					0.94%

Tabla N ° 18 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 11/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.3	57.0001	57.7680	101.3	101.4%
70	74.3	57.0001	57.8370	101.5	
70	73.1	56.0796	56.7180	101.1	102.0%
70	73.1	56.0796	57.6950	102.9	
70	73.4	56.3097	57.0480	101.3	100.7%
70	73.4	56.3097	56.3750	100.1	
St intermedio			80.0960	100.3%	
100	108.3	83.0837	82.8320	99.7	99.0%
100	108.3	83.0837	81.7040	98.3	
100	106.9	82.0096	82.5440	100.7	100.1%
100	106.9	82.0096	81.6520	99.6	
100	108.4	83.1604	82.8870	99.7	99.4%
100	108.4	83.1604	82.3810	99.1	
St intermedio			81.7550	102.4%	
130	135.1	103.6436	107.2860	103.5	103.6%
130	135.1	103.6436	107.4080	103.6	
130	141.6	108.6302	108.4310	99.8	100.0%
130	141.6	108.6302	108.8430	100.2	
130	134.5	103.1833	102.7580	99.6	99.1%
130	134.5	103.1833	101.8020	98.7	
St Final			80.6860	101.0%	
Promedio de recuperación final					100.6%
RSD					1.5%

Tabla N ° 19 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 12/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.1	56.8467	57.6020	101.3	100.2%
70	74.1	56.8467	56.2900	99.0	
70	73.4	56.3097	56.7730	100.8	101.1%
70	73.4	56.3097	57.0850	101.4	
70	72.9	55.9261	57.3200	102.5	102.4%
70	72.9	55.9261	57.1740	102.2	
St intermedio			82.7620	101.3%	
100	105.2	80.7055	81.4970	101.0	100.7%
100	105.2	80.7055	81.0350	100.4	
100	104.5	80.1684	79.8220	99.6	98.8%
100	104.5	80.1684	78.5440	98.0	
100	105.9	81.2425	81.8690	100.8	100.5%
100	105.9	81.2425	81.3710	100.2	
St intermedio			81.7280	100.0%	
130	139.2	106.7890	105.1570	98.5	99.0%
130	139.2	106.7890	106.2680	99.5	
130	137.2	105.2546	105.1020	99.9	99.6%
130	137.2	105.2546	104.5720	99.4	
130	135.3	103.7970	103.5800	99.8	99.5%
130	135.3	103.7970	103.0590	99.3	
St Final			83.4220	102.1%	
Promedio de recuperación final					100.2%
RSD					1.12%

Tabla N ° 20 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 13/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	74.2	56.923	57.941	101.8	101.7%
70	74.2	56.923	57.785	101.5	
70	73.7	56.540	57.384	101.5	101.5%
70	73.7	56.540	57.380	101.5	
70	74.4	57.077	58.216	102.0	101.7%
70	74.4	57.077	57.863	101.4	
St intermedio			86.097	101.0%	
100	108.4	83.160	81.560	98.1	99.5%
100	108.4	83.160	83.878	100.9	
100	113.5	87.073	87.030	100.0	99.7%
100	113.5	87.073	86.676	99.5	
100	109.9	84.311	83.552	99.1	98.8%
100	109.9	84.311	83.012	98.5	
St intermedio			85.080	99.8%	
130	135.6	104.027	102.727	98.8	98.6%
130	135.6	104.027	102.482	98.5	
130	136.6	104.794	102.761	98.1	98.7%
130	136.6	104.794	104.023	99.3	
130	137.6	105.562	104.525	99.0	99.0%
130	137.6	105.562	104.588	99.1	
St Final			85.205	100.0%	
Promedio de recuperación final					99.9%
RSD					1.33%

Tabla N ° 21 Resultados de la recuperación equipo HPLC Merck hitachi inyección manual. Día 16/01/2006.

%	Peso(mg)	Conc(mg/Rec)	Lectura	Recup%	Promedio
70	72.9	55.926	56.263	100.6	100.5%
70	72.9	55.926	56.189	100.5	
70	74.4	57.077	57.414	100.6	100.5%
70	74.4	57.077	57.320	100.4	
70	74.8	57.384	57.021	99.4	100.0%
70	74.8	57.384	57.021	100.7	
St intermedio			78.577	98.6%	
100	108.3	83.084	82.637	99.5	98.9%
100	108.3	83.084	81.734	98.4	
100	109.2	83.774	82.949	99.0	99.3%
100	109.2	83.774	83.422	99.6	
100	105.9	81.242	80.826	99.5	99.1%
100	105.9	81.242	80.124	98.6	
St intermedio			80.340	100.8%	
130	136.1	104.411	104.074	99.7	99.4%
130	136.1	104.411	103.414	99.0	
130	134.9	103.490	103.864	100.4	100.1%
130	134.9	103.490	103.228	99.7	
130	134.9	103.490	103.567	100.1	100.4%
130	134.9	103.490	104.304	100.8	
St Final			80.214	100.6%	
Promedio de recuperación final					99.8%
RSD					0.65%

Anexo N° 3 Distribución t -Student con n grados de libertad

TABLA N° 22 DE LA DISTRIBUCIÓN t -Student con n grados de libertad

n	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576