CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS

Tesis presentada para optar por el título de Máster en Investigación y Desarrollo de Medicamentos

Título: ***Desarrollo, validación y cálculo de la incertidumbre del resultado de la técnica cromatográfica para determinar G-1 y MBr en lotes de G-1***

Autor: ***Lic. Isabel María Caraballoso Noa***

Tutor (es): ***MSc. Amalia María Calvo Alonso***

MSc. Jorge Basilio de la Torre López

Santa Clara

2015

Saber leer es saber andar. Saber escribir es saber ascender.

José Martí

A mis padres,

a Yaidel

y a mis dos mayores tesoros, mis hijos Eliany y Reinier.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que con paciencia y dedicación colaboraron con la realización de este trabajo.

Amalia, además de tutora, ha sido amiga y compañera, y me ha brindado gran ayuda en el desarrollo de toda la investigación.

A mi otro tutor Jorge, gracias por el esfuerzo a pesar de los contratiempos.

A Yaidel, sin ti, no sé si hubiera podido enfrentar todo, gracias por formar parte de mi vida.

A Adalberto, su ayuda fue fundamental en cromatografía.

A Montenegro, Heidy y Reinaldo, por su granito de arena en este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Control de la Calidad: Marlene, Dianelys, Maritza, Ada y Robelio, por apoyarme en todo y por soportarme diariamente.

A todos, Gracias.

RESUMEN

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (Furvina; G-1), es el ingrediente farmacéutico activo (IFA) utilizado en la producción del Dermofural, ungüento tópico con propiedades antibacteriana y antifúngica. Debido al proceso de obtención por síntesis química se encuentra acompañado de una impureza conocida como monobromado (MBr), por lo que dentro de las especificaciones de calidad del IFA está incluido el por ciento de pureza (entre 98,00 % y 102,00 %) y el contenido de la impureza (≤ 1,00 %). El objetivo de este trabajo es desarrollar una técnica para determinar simultáneamente la pureza del G-1 y el contenido de la impureza MBr en el IFA por cromatografía de gases con detector de captura electrónica, validar dicha técnica y calcular la incertidumbre del resultado para asegurar la confiabilidad del mismo. Los parámetros desarrollados en la validación fueron: adecuación del sistema, especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad instrumental, repetibilidad del método, precisión intermedia), exactitud o veracidad y los límites de detección y cuantificación para la impureza MBr. El método analítico resultó ser específico, lineal en el intervalo de concentraciones de 8 mg/L a 12 mg/L para el G-1 y de 0,06mg/L a 0,14 mg/L para el MBr, preciso y exacto, con un límite de detección de 0,0006 mg/L y de cuantificación de 0,002 mg/L para la impureza. Se obtuvo un valor de incertidumbre para el G-1 de 1,48 % y para el MBr de 0,05 % con un factor de cobertura k = 2 y un nivel de confianza de 95 %.

ABSTRACT

The 2-bromine-5- (2-bromine-2-nitervinyl) -furan (Furvina; G-1), is the active pharmaceutical ingredient (API) used in Dermofural production, it is a topical ointment with antibacterial and antifungal properties. Due to the obtaining process by chemical synthesis it is accompanied by an impurity known as monobromate (MBr), so that within the API quality specifications it is included the purity percent (between 98,00 % and 102,00 %) and the impurity content (≤ 1,00 %). The objective of this work is to develop a technique for simultaneously determining the purity of G-1 and the MBr impurity content in the API by gas chromatography with electron capture detector, validating the technique and calculating the result uncertainty to ensure its reliability. The parameters developed on the validation were: the system adequacy, specificity, linearity, accuracy (instrumental repeatability, method repeatability, and intermediate precision), accuracy or reliability, and detection and quantification limits for MBr impurity. The analytical method was found to be specific, linear in the concentration range of 8 mg/L to 12 mg/L for the G-1 and 0,06 mg/L to 0,14 mg/L for MBr, precise and accurate, with a detection limit of 0,0006 mg / L and quantification of 0,002 mg / L for the impurity. An uncertainty value for G-1 of 1,48 % and for MBr of 0,05 % with a cover factor k = 2 and a reliability level of 95 % were obtained.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN…… 1

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA…….. 4

2.1. GENERALIDADES……... 4

2.1.1. Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1)..... 4

2.1.2. Técnicas analíticas empleadas en la determinación de la pureza de G-1…… 5

2.2. CROMATOGRAFÍA……... 6

2.2.1. Generalidades……..... 6

2.2.2. Cromatografía de gases…….. 7

2.2.2.1. Instrumentación…… 7

2.3. VALIDACIÓN……. 12

2.3.1. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos……... 13

2.3.1.1. Linealidad……..... 14

2.3.1.2. Precisión…… 15

2.3.1.3. Exactitud (Veracidad)…… 17

2.3.1.4. Especificidad……. 18

2.3.1.5. Límites de detección y cuantificación……... 19

2.3.1.6. Robustez…… 20

2.4. INCERTIDUMBRE…… 20

2.4.1. Incertidumbre de las mediciones analíticas……..... 20

2.4.2. Diferencia entre error e incertidumbre de medición…….. 21

2.4.3. Valor verdadero y convencionalmente verdadero……. 21

2.4.4. Estimación de la incertidumbre de medición……. 22

2.4.5. Metodología para la estimación de la incertidumbre de la medición….. 22

2.4.6. Tipos de incertidumbre……..... 23

2.4.6.1. Métodos para evaluar la incertidumbre estándar…… 23

2.4.6.2. Evaluación de incertidumbre tipo A……... 24

2.4.6.3. Evaluación de incertidumbre tipo B……..... 25
2.4.7. Cálculo de la incertidumbre……..... 28
3. MATERIALES Y MÉTODOS…… 30
3.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO……... 30
3.1.1. Equipos…….. 30
3.1.2. Reactivos químicos, muestras y materiales de referencia……. 30
3.1.3. Material de laboratorio…… 31
3.2. DESARROLLO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD 31
3.2.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para determinar el contenido de G-1 y MBr en lotes de IFA G-1 por GC-ECD…… 31
3.2.1.1 Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector…… 31
3.2.1.2. Selección del flujo de fase móvil…….. 31
3.2.1.3. Selección del Tiempo de corrida……... 31
3.2.1.4. Volumen de inyección……... 32
3.2.1.5. Selección del estándar interno……... 32
3.2.1.6. Selección del disolvente utilizado……. 32
3.2.1.7. Concentración de la muestra……. 32
3.2.2. Preparación de las disoluciones…….. 32
3.2.2.1. Preparación de la disolución de estándar interno (SI)…….. 32
3.2.2.2. Preparación de la disolución de G-1 (MR)……... 32
3.2.2.3. Preparación de la disolución de MBr (MR)…….. 33
3.2.2.4. Preparación de la disolución de G-1 muestra de ensayo……..... 33
3.3. DESARROLLO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD…… 33
3.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo para el proceso de validación…… 34
3.3.2. Pruebas de Adecuación del sistema…… 34
3.3.2.1. Repetibilidad de los tiempos de retención…… 34

3.3.2.2. Eficacia de la columna o número de platos teóricos……. 34
3.3.2.3. Simetría del pico de G-1 y MBr…… 35
3.3.2.4. Resolución entre el pico de G-1 y el de MBr…… 35
3.3.3. Especificidad…….. 36
3.3.4. Linealidad……... 37
3.3.5. Precisión……. 38
3.3.5.1. Repetibilidad instrumental……. 39
3.3.5.2. Repetibilidad del método……... 39
3.3.5.3. Precisión intermedia…….. 39
3.3.6. Exactitud (Veracidad)……. 40
3.3.7. Límites de detección y cuantificación (solo para MBr)…….. 40
3.4. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DEL RESULTADO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD …… 41
3.4.1. Pasos para el cálculo de la incertidumbre del resultado……. 42
3.4.1.1. Expresión matemática de la magnitud que se mide. Modelo matemático…….. 42
3.4.1.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre. Diagrama de causa - efecto (Espina de Pescado)……. 42
3.4.1.3 Determinación y evaluación de los componentes de incertidumbres..... 43
3.4.1.4 Cálculo de la incertidumbre estándar combinada……... 44
3.4.1.5 Cálculo de la incertidumbre expandida…….. 44
3.4.1.6 Expresión del resultado de la medición…….. 44
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS…… 45
4.1. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD…….. 45
4.2 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD ……... 46
4.2.1. Pruebas de adecuación del sistema……. 46
4.2.2. Especificidad…….. 47

4.2.3. Linealidad……... 51
4.2.4. Precisión…….. 54
4.2.4.1. Repetibilidad instrumental……. 54
4.2.4.2. Repetibilidad del método…….. 56
4.2.4.3. Precisión intermedia…….. 57
4.2.5. Exactitud……. 61
4.2.6 Límite de detección y cuantificación (solo para MBr)……. 65
4.3 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DEL RESULTADO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD…… 66
4.3.1 Expresión matemática de la magnitud que se mide. Modelo matemático…. 67
4.3.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre. Diagrama de causa - efecto (Espina de Pescado)…… 67
4.3.3. Determinación y evaluación de los componentes de incertidumbres…….. 68
4.3.4. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada……. 70
4.3.4.1. Incertidumbre estándar combinada para G-1 y MBr……. 71
4.3.5. Cálculo de la incertidumbre expandida ……..…… 73
4.3.6. Expresión del resultado de la medición…… 73
5. CONCLUSIONES…… 74
6. RECOMENDACIONES……... 75
7. BIBLIOGRAFÍA……... 76

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos medicamentos se hace cada vez más necesario por la situación en los aspectos de salud que se enfrenta en el mundo actual, es por ello que es preciso contar con laboratorios de control de medicamentos y métodos de ensayo que cumplan con los requisitos establecidos en función del incremento de los estándares de calidad de los productos farmacéuticos. En Cuba se hacen cumplir estrictas normas y regulaciones para estos fines como son las farmacopeas, normas internacionales como las ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) y las ISO (International Organization for Standardization) y las regulaciones dictadas por el CECMED (Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos), entre otras.

El Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) es una organización dedicada a la producción de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) obtenidos por vía sintética, tal es el caso del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1), conocido también como Furvina, el cual es utilizado en la producción del Dermofural®, ungüento tópico con propiedades antibacteriana y antifúngica que forma parte del cuadro básico de medicamentos en Cuba desde el año 2007 [Dermofural®, 2014]. Como parte integrante del CBQ se encuentra el laboratorio de control de la calidad donde se aplican técnicas para determinar la pureza del IFA G-1, este, debido al proceso de obtención por síntesis química, se encuentra acompañado de una impureza conocida como monobromado (MBr), por lo que dentro de las especificaciones de calidad del IFA está incluido, entre otros, el porcentaje de pureza del G-1 (entre 98,00 % y 102,00 %) y el contenido de la impureza (no más de 1,00 %) [Castañedo, N.; Gaitán, T., 2003]. El laboratorio es el responsable de la validez de los resultados de los ensayos realizados y que los mismos sean confiables para el uso que se les tiene destinado. En este sentido debe demostrarse que los métodos de ensayo que se aplican tienen un desempeño adecuado, así como sus equipos y personal técnico. Por ello, en estos se exige la existencia de procedimientos encaminados a asegurar la confiabilidad de los resultados analíticos obtenidos.

Por todo lo anterior, se ha identificado como **problema científico** a resolver el hecho de que el laboratorio de control de la calidad del CBQ no cuenta con una técnica analítica sencilla,

económica y fiable que permita determinar simultáneamente el contenido de G-1 y de su impureza MBr en lotes de IFA G-1, ni con el cálculo de la incertidumbre del resultado para dicha técnica.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente **hipótesis**:

Es posible mejorar la calidad de los resultados analíticos de la determinación del contenido de G-1 y de su impureza MBr en el IFA G-1 si se desarrolla una técnica en el laboratorio de control de la calidad del CBQ por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD), se valida y se calcula la incertidumbre del resultado.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone como **objetivo general**:

Realizar el procedimiento, la validación y el cálculo de la incertidumbre del resultado para la técnica de determinación simultánea del contenido de G-1 y MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica (GC-ECD).

Como **objetivos específicos** se proponen:

1. Desarrollar una técnica para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica.
2. Validar la técnica para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica.
3. Calcular la incertidumbre del resultado para G-1 y MBr obtenido a partir de la técnica para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica.

Organización del informe

Este informe está estructurado de la forma siguiente: Una **Introducción**, que hace referencia al problema científico a resolver, se formula la hipótesis y se proponen los objetivos generales y específicos que se deben cumplir al culminarse el trabajo, **Revisión Bibliográfica** con los temas de interés para el trabajo, **Materiales y Métodos** utilizados en el desarrollo de la investigación y **Resultados y Discusión** de los temas abordados. Culmina con las

Conclusiones y **Recomendaciones** derivadas de la investigación realizada y una relación de la **Bibliografía** consultada.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

La industria farmacéutica es la encargada de producir medicamentos, por lo que requiere de una exigente política de calidad que proteja los intereses del paciente y de la sociedad.

Existen regulaciones que deben cumplirse en los laboratorios de control de medicamentos para que los productos farmacéuticos se obtengan con la calidad requerida, por lo que se deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos. Estos métodos deben estar validados y es importante además, que se estime la incertidumbre de la medición.

Uno de los ensayos más importantes que se debe tener en cuenta cuando se analiza la calidad de un medicamento es la determinación de la pureza.

2.1.1. Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1)

El CECMED es la Autoridad Reguladora de Medicamentos en Cuba y estipula, que un ingrediente farmacéutico activo es:

"cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a ser usada en la fabricación de un producto farmacéutico y que, cuando se use, constituye el ingrediente activo del mismo. Tales sustancias están destinadas a ejercer una actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o a afectar la estructura y función del organismo". [Regulación 16, 2012; 37,2012]

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) es un ingrediente farmacéutico activo cuya acción farmacológica está dada por las propiedades bactericidas y fungicidas que presenta, con un mecanismo de acción que difiere de los antibióticos y fungicidas que se utilizan en la actualidad [González, O. y Col., 1993, I; González, O. y Col., 1993, II; González, O. y Col., 1993, III, González, O. y Col., 1993, IV]; se obtiene por vía sintética en el CBQ, su fórmula estructural se muestra en la figura 1.

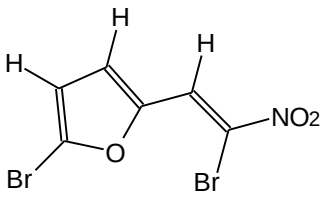

Figura 1. Fórmula estructural del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1)

El G-1 se presenta en forma de sólido cristalino de color amarillo con olor característico, tiene una masa molecular de 296,924 g/mol y su temperatura de fusión es de 89 °C - 92 °C. Según las categorías que establece la Farmacopea de los Estados Unidos, [USP 35,2012] el G-1es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido y benceno; soluble en tetracloruro de carbono y polietilenglicol 400, poco soluble en metanol absoluto y etanol 90°, difícilmente soluble en etanol 70° y n-hexano, y muy difícilmente soluble en agua. [Jorge, E. y Col., 1993 II]

En el proceso de síntesis de G-1 se obtiene como impureza el 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano conocido como MBr. De fórmula global $C_6H_4BrNO_3$ y masa molecular de 218,0065 g/mol. [Jorge, E. y Col., 1993 II]

2.1.2. Técnicas analíticas empleadas en la determinación de la pureza de G-1 [Dermofural, 2014]

Dentro de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de la pureza y de su principal impureza en el G-1se encuentran:

- Método volumétrico, desarrollado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), en 1992.
- Técnica por cromatografía líquida (HPLC) en fase normal, desarrollada en el CIDEM, en 1992.
- Técnica por cromatografía de gases con detector de ionización por llama (FID) con columna empacada, desarrollada en el CBQ, en 1992.
- Técnica por cromatografía líquida (HPLC) en fase inversa, desarrollada en el CBQ, en 1998.

- Técnica por cromatografía de gases con detector de ionización por llama (FID) con columna capilar, desarrollada en el CBQ, en 2005.

2.2. CROMATOGRAFÍA [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F., 2001;; Dierksmeier, G., 2005]

2.2.1. Generalidades

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia. Se pueden separar las moléculas en función de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, sus constantes de ionización o en función de la disposición de sus enlaces. Como resultado, hay una gran cantidad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia, la cual tiene lugar en gases, líquidos y fluidos supercríticos, de ahí la denominación de Cromatografía de Gases (CG) Cromatografía Líquida (CL) y Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), respectivamente.

Las técnicas cromatográficas se fundamentan en el empleo de una columna de cromatografía consistente en un tubo relleno con un material sólido sobre cuya superficie se enlazan las moléculas, conocido como soporte sólido, sorbente, fase estática, materia empaquetada o fase estacionaria (mineral, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos). La muestra se introduce en una fase fluida en movimiento -un líquido o gas- denominada fase móvil. La fase móvil transporta la muestra a través de la fase estacionaria proporcionando la separación. Las interacciones físicas tienen lugar en la superficie de la fase estacionaria con la misma superficie del soporte sólido, con líquidos que estén en contacto con esa superficie o con moléculas enlazadas a dicha superficie.

En los análisis modernos es posible detectar los componentes separados midiendo los cambios que se producen en una serie de diferentes propiedades físicas o químicas: conducción de corriente eléctrica, absorción de luz y habilidad para conducir el calor, por citar solo algunos. Para esto se utiliza el detector el cual registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasa por él. Estos cambios son producidos en forma de gráfica observándose la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo. Esta gráfica que recoge la respuesta del detector en función del tiempo se denomina cromatograma.

Es de interés de este trabajo la Cromatografía de Gases, por eso se dedican los siguientes acápites a determinados aspectos importantes sobre este tipo de cromatografía.

2.2.2. Cromatografía de gases (CG) [http://www.rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf]

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que la fase móvil es un gas; comúnmente se emplean helio y nitrógeno, mientras que la fase estacionaria, contenida en una columna, es un sólido o un líquido impregnado en un soporte sólido inerte, o una película líquida que recubre uniformemente las paredes de la columna, en ella se produce la separación de los solutos.

Cuando la fase estacionaria es de baja polaridad la separación se produce en base a la volatilidad relativa de los compuestos, la cual está en función de la temperatura de ebullición y esta a su vez está en correspondencia con la masa molar y la distribución espacial de la molécula.

La cromatografía de gases es el método de elección para la separación de sustancias volátiles y térmicamente estables. Este campo de aplicación involucra un enorme número de sustancias orgánicas y organometálicas, así como gases permanentes, lo cual convierte a la técnica en una de las más versátiles y potentes en el laboratorio analítico.

Ninguna otra técnica de separación es capaz de proporcionar una resolución equivalente y a la vez, una sensibilidad tan elevada. Esto significa que, en realidad, la principal limitación de la técnica está en la estabilidad térmica de los componentes de la mezcla o de la propia matriz.

2.2.2.1. Instrumentación [Willard, H., 1991; Skoog, D. & Leary, J., 1994].

La cromatografía de gases se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases, figura 2. Este consta de diversos componentes como, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno) y el detector.

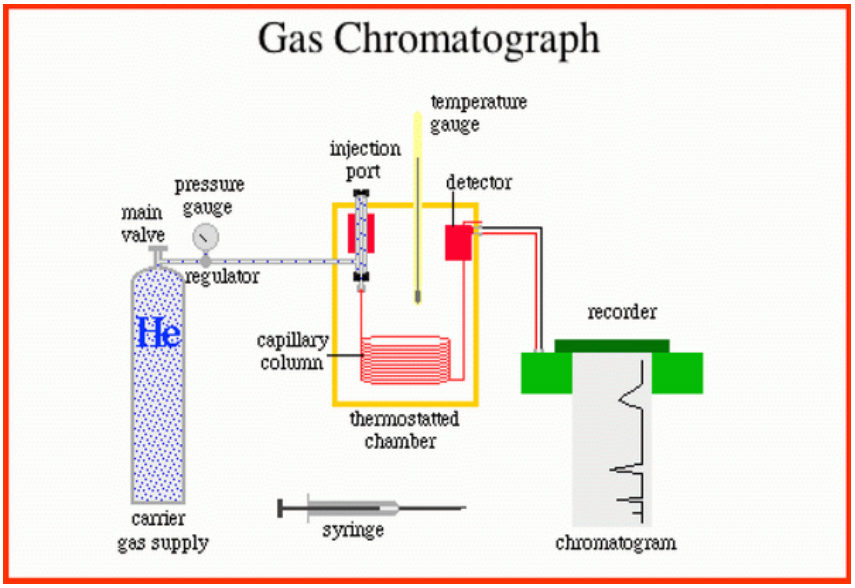

Figura 2. Diagrama de un cromatógrafo de gases

Sistema de inyección de muestra

La inyección de la muestra es un apartado crítico, se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara debe estar a 50 ºC por encima de la temperatura de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona llamado septa o septum, figura 3.

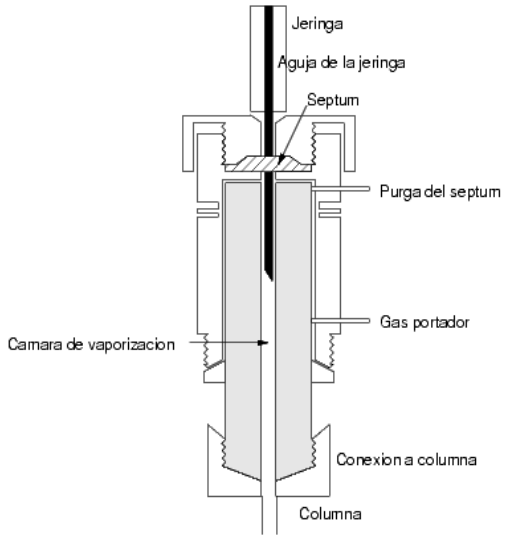

Figura 3. Inyector de muestra para un cromatógrafo de gases (GC)

Columna

La columna es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo. En la cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. La longitud de estas columnas es variable, de 2 m a 50 m. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o sílice fundida. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 cm a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

Hay numerosos factores que afectan la eficacia de una columna, entre ellos los más importantes son: su longitud, diámetro, temperatura, material del cual está elaborada y enrollado, tamaño de las partículas del relleno, naturaleza de las fases, cantidad de fase estacionaria, velocidad del gas portador y cantidad de muestra inyectada.

Detectores

Durante el desarrollo de la cromatografía de gases se han investigado y utilizado docenas de detectores.

En cromatografía de gases un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que

previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal de tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará y se obtendrá mediante un registrador gráfico o integrador, permitiendo indicar el momento que eluyen de la columna los componentes.

Un detector ideal tiene las siguientes características:

1. Adecuada sensibilidad.
2. Buena estabilidad y reproducibilidad.
3. Una respuesta lineal para los analitos que se extienda a varios órdenes de magnitud.
4. Un intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 ºC.
5. Un tiempo de respuesta corto que lo haga independiente del caudal.
6. Alta fiabilidad y manejo sencillo. Hasta el punto de estar a prueba de la impericia de operadores inexpertos.
7. Respuesta semejante para todos los analitos, o por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.
8. No destructivo de la muestra.

De hecho, no hay detector que reúna todas esas características, y tampoco parece probable que pueda llegar a diseñarse nunca.

Entre los detectores que se emplean en cromatografía de gases se encuentran el detector de conductividad térmica, el de ionización por llama, el de captura electrónica, el de fotometría de llama, el de nitrógeno – fósforo, el de ionización de llama alcalina y el detector de espectrometría de masas, entre otros.

De ellos un detector ampliamente utilizado y de interés en este trabajo es el de captura electrónica. Este ocupa probablemente el segundo lugar entre los detectores de más utilización, debido a su excepcional sensibilidad (es probablemente el dispositivo analítico más sensible que se conoce) este hecho junto a su selectividad hacia compuestos de enorme interés (fundamentalmente en los campos de la toxicología y el medio ambiente) hacen que sea enormemente utilizado para la detección y la cuantificación de trazas.

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitro; en cambio, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos.

Los detectores de captura de electrones además de ser altamente sensibles tienen la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del detector de llama). Por otra parte, su intervalo lineal de respuesta normalmente se limita a unos dos órdenes de magnitud.

El detector de captura electrónica consiste en una cavidad que contienen dos electrodos y una fuente de radiación. Las colisiones entre los electrones (emisión B) emitidos por la fuente de ^{63}Ni o ^{3}H y el gas portador (metano más argón o más nitrógeno), producen un plasma que contienen electrones e iones positivos y estos electrones son atraídos hacia el ánodo. Cuando pasa por el detector un compuesto que contiene átomos electronegativos, algunos de los electrones serán capturados, produciendo iones negativos y la corriente de electrones hacia el ánodo disminuirá, figura 5. Los factores de respuesta de un detector de captura electrónica son función del tipo y del número de átomos electronegativos que existen en una molécula determinada.

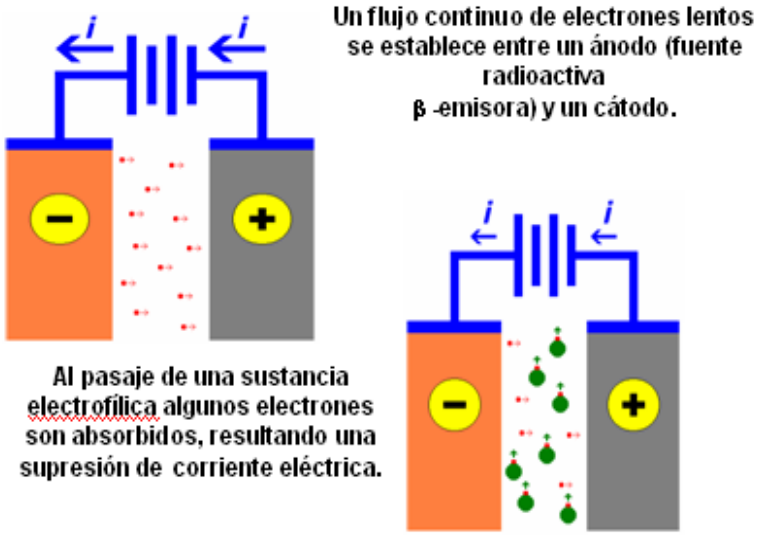

Figura 4. Principio de funcionamiento del detector de captura electrónica

2.3. VALIDACIÓN [Regulación No 41, 2007 del CECMED; Regulación No 37, 2012 (anexo 1)]

El concepto de validación en la fabricación de productos farmacéuticos surgió hace más de 20 años, fue cuando la *Food and Drug Administration* (FDA) revisó las normas relativas al control de la fabricación de los productos farmacéuticos, dichas normas son conocidas como Buenas Prácticas de Fabricación (BPP) y en 1978, la palabra validación apareció por vez primera en algunas de sus secciones.

La validación es el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad, de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificado. [Regulación No 41, 2007 del CECMED; Ramos, T, 2008; Regulación No 37, 2012 (anexo 1)]

Existen varias definiciones en la literatura para el término *validación*, pero todas tienen el mismo fundamento [Aromí,D.P. et al, 2001; Aguirre Ortega,L. y col 2001; Castiñeira Díaz, M., & González San Miguel, H.M., 2002; ICH, 2005; ISO 9000, 2005; Alonso, H., 2006; NC ISO/IEC 17025, 2006; NC: TS-368, 2010; http://www.fda.gov]

En la Regulación No 37, 2012 (anexo 1) del CECMED se define como validación: el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad, de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificado.

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En general, se establece que el laboratorio **DEBE** validar:

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.
2. Método normalizado con una modificación significativa.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una **Validación Retrospectiva**, es decir, en base a los datos

experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizara 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 técnica son aceptables.

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 datos experimentales.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como validación menor o **verificación.**

La **verificación**, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente.

[http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/ Guía técnica de validación]

En fin, el objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado. En relación a los parámetros de validación o verificación estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. [Regulación No. 41-2007; 37, 2012 (anexo1) del CECMED; http://www.laboratoriometrologico.com]

2.3.1. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos

Existen características de funcionamiento que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina. Dichas características son las siguientes.

Características de practicabilidad: Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Características de idoneidad: Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La

idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.

Características de fiabilidad: Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, veracidad, precisión, límite de detección y cuantificación y selectividad o especificidad. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Eurachem, 2000; ICH, 2005]

La validación está determinada por el propósito del método. Según la Regulación 41:2007 y 37, 2012, (anexo 1) del CECMED los métodos desarrollados en el laboratorio requieren una validación exhaustiva.

Los parámetros a evaluar para un método desarrollado por el laboratorio son:

- ✓ Linealidad.
- ✓ Precisión: repetibilidad, reproducibilidad (siempre que proceda) y precisión intermedia.
- ✓ Exactitud. (Veracidad)
- ✓ Especificidad. (Selectividad)
- ✓ Límites de detección y cuantificación.
- ✓ Robustez.

2.3.1.1. Linealidad [ICH., 2005; Regulación 41, 2007 del CECMED; NC TS 368, 2010; Regulación 37, 2012, (anexo 1)]

La linealidad de un procedimiento analítico, es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (la cantidad) de analito en la muestra, puede expresarse como la pendiente de la línea de regresión y su varianza o como el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R).

En ensayos químico–físicos el estudio de linealidad se puede efectuar tanto con material de referencia del analito, como con muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de analito que cubran el intervalo del método. Cuando se trata de la valoración de una materia prima se analizan de 3 a 5 soluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 80 % y 120 % de la concentración teórica para el IFA o producto terminado y desde el nivel reportado hasta el 120 % de la especificación para la impureza.

Para verificar la linealidad y la proporcionalidad se evaluarán los datos estadísticamente de la siguiente forma:

- Significación de la regresión: Los resultados se presentan gráficamente y se informa la ecuación de regresión lineal, así como el coeficiente de correlación y el de determinación. Si la correlación no es lineal, pueden estimarse los parámetros en la curva pertinente, ya sea utilizando el método de los mínimos cuadrados, o por medio de métodos numéricos si el problema no puede resolverse analíticamente.

- Verificación de linealidad: Se realiza por diferentes procedimientos.

  ❖ Determinación del coeficiente de variación de los factores respuesta, CV_f.

  ❖ Evaluación de la significación estadística de la varianza de la pendiente o *coeficiente de regresión*, S_b^2.

  ❖ La desviación estándar o error estándar de la pendiente, S_b, y la desviación estándar relativa, S_b rel. %.

  ❖ Los límites de confianza de la pendiente y el grado de significación.

- Verificación de proporcionalidad: La intercepción con el eje de ordenadas (*intercepto*) da el error sistemático del método.

  ❖ Límites de confianza del término independiente.

  ❖ Significación estadística del intercepto (a).

2.3.1.2. Precisión [Regulación 41, 2007 del CECMED; Regulación 37, 2012 (anexo 1)]

La precisión es el grado de concordancia de los valores de una serie repetida de ensayos analíticos, efectuados sobre una muestra homogénea. Es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media y se expresa como el coeficiente de variación (CV).

La precisión de un análisis sólo depende de la distribución de los errores aleatorios del análisis, y no debe confundirse con la veracidad. Normalmente se expresa la precisión como la desviación típica de los resultados analíticos. Una desviación típica pequeña equivale a una elevada (*o buena*) precisión, y una desviación típica grande equivale a una baja (*o pobre*) precisión. El concepto de precisión sólo es apropiado para los análisis cuantitativos. La precisión es un concepto relativo, totalmente dependiente de las "condiciones específicas"

mencionadas anteriormente en la definición: los extremos son las condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad [Castro, 1989; NC TS 368, 2010]

La determinación de la precisión se puede realizar a 3 niveles de concentración, siempre que proceda: intraensayo (repetibilidad), interensayo (precisión intermedia) e interlaboratorios (reproducibilidad). Las muestras a incluir en este estudio serán lotes de producción, es decir muestras reales.

La *repetibilidad* es la medida de la precisión de un método llevada a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto, en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio con los mismos equipos y reactivos; generalmente en un corto intervalo de tiempo, por lo cual evalúa la variabilidad intrínseca del proceso.

La *precisión intermedia* es la medida de la precisión dentro de un laboratorio cuando se emplea una muestra homogénea y se analiza en condiciones diferentes, es decir analista diferente y día diferente en equipo diferente. Refleja las condiciones reales dentro del laboratorio.

La reproducibilidad es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico que se efectúa sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes: analistas, laboratorios, equipos y días, entre otras. Es decir, evalúa la variabilidad debida a un factor intrínseco al método. Es la precisión interlaboratorio que se evalúa en el marco de estudios colaborativos.

En ensayos químico–físicos la evaluación de la precisión se puede realizar de la siguiente manera:

- Repetibilidad:
  - Preparando muestras de 3 concentraciones diferentes, inferior, media y superior del intervalo especificado y realizar 3 réplicas de cada una, o,
  - Realizando un mínimo de 6 determinaciones a la concentración del 100 %.
- Precisión intermedia:
  - Evaluando 3 concentraciones de una muestra (como mínimo), o,
  - Realizando 3 réplicas de la concentración al 100 %,

Por triplicado en días diferentes por al menos 2 analistas. Pueden emplearse instrumentos diferentes.

- Reproducibilidad: Esta puede ser evaluada por medio de ensayos interlaboratorios. Este parámetro no es obligatorio a menos que se quiera estandarizar el procedimiento analítico, por ejemplo, para su inclusión en farmacopeas.

En cada caso se evaluará la media (X_m), la desviación estándar típica (S) y el coeficiente de variación, CV (%); además se implementarán pruebas de significación adecuadas para medias y varianzas, siempre que proceda. Los resultados de los estudios de precisión se expresarán en términos de CV, el cual no excederá el 5% de variabilidad total en ensayos físico–químicos. Generalmente se aceptarán variabilidades menores para algunos métodos como los cromatográficos ($\leq 2\%$) y los espectrofotométricos ($\leq 3\%$). La variabilidad aceptada en estudios de repetibilidad será menor para análisis de IFA que para determinación de impurezas o de producto terminado, por la influencia de la concentración de analito.

2.3.1.3. Exactitud (Veracidad) [Regulación 41: 2007 del CECMED; Regulación 37: 2012 anexo 1]

Es el grado de concordancia entre el valor hallado experimentalmente (*observado*) en el análisis con el valor verdadero (*esperado*) e indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el verdadero es pequeña la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse.

Estadísticamente suele efectuarse un test de *student* para la determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

La evaluación de la exactitud se puede realizar calculando el porcentaje de recuperación en todo el intervalo de la valoración o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales.

Para la determinación de este parámetro en ensayos químico-físicos se pueden usar varios métodos:

Para la cuantificación de IFA se pueden realizar análisis repetidos de muestras de concentraciones conocidas diferentes, utilizando 3 concentraciones como mínimo (*intervalo alto, medio y bajo*) y realizando los análisis por triplicado. Para la cuantificación de impurezas se pueden analizar muestras (IFA o producto terminado) a las que se adicionan cantidades conocidas de impurezas o productos de degradación.

En este tipo de estudio, se evaluará la influencia del factor concentración.

2.3.1.4. Especificidad [Regulación 41, 2007 del CECMED; Regulación 37, 2012 (anexo 1)]

La especificidad (*o selectividad*) es la capacidad de un método analítico de detectar inequívocamente el analito en presencia de compuestos que pueden estar presentes en la muestra (impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.). [ICH., 2005] También se expresa como el desvío o error porcentual entre el valor medido y conocido.

La evaluación de la especificidad dependerá de las características del método de ensayo, del uso propuesto y del tipo de muestra que se vaya a analizar.

En función de las características del método de ensayo la evaluación de la especificidad debe estar dirigida a:

- Identidad: el método es capaz de identificar el principio activo en presencia de otras sustancias.
- Pureza: el método permite una evaluación cualitativa o cuantitativa de las impurezas específicas.
- Determinación cuantitativa de un componente (o para ensayos de actividad): la señal medida por el método analítico corresponde exclusivamente al analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

En ensayos químico-físicos la evaluación de la especificidad se puede hacer de la siguiente forma:

Para determinación en IFA

- Evaluación de impurezas: Comparando un patrón contra la misma muestra cargada con contaminantes potenciales a concentraciones no inferiores a los límites establecidos, o en una proporción no superior al 1% de cada contaminante. Las muestras se analizan en

paralelo como mínimo en 3 ensayos diferentes. Se determina el porciento de recuperación y su significación estadística.

- Evaluación de productos de degradación: Se procederá de forma similar a la anterior. En caso de que no se disponga de productos de degradación, se comparará el patrón contra un lote de IFA envejecido y/o sometido a condiciones de estrés previamente evaluadas.
- Se desconoce la estructura de un contaminante o no existe disponibilidad del mismo: Analizando el patrón y el lote de IFA envejecido y/o sometido a condiciones de estrés por el método en cuestión y por un método complementario de mayor especificidad. La especificidad estará determinada por el grado de coincidencia entre ellos.

2.3.1.5. Límites de detección y cuantificación [Regulación 41, 2007 del CECMED; Regulación 37, 2012 (anexo 1)]

El *límite de detección* es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, como una concentración o cantidad exacta.

El *límite de cuantificación* es la cantidad más baja de analito que puede medirse cuantitativamente en una muestra con exactitud y precisión aceptables.

Es un parámetro de ensayo cuantitativo para niveles bajos de compuestos en la muestra y se usa, particularmente, para la determinación de impurezas y/o productos de degradación. [ICH., 2005]

Pueden utilizarse diferentes procedimientos para realizar la determinación del límite de detección y cuantificación:

- Relación señal / ruido.
- Estudio de la menor cantidad detectable.
- Estimación del límite de detección mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración.
- Análisis repetido del blanco de la muestra.
- Extrapolación a concentración cero de muestras que contienen baja concentración de analito.

2.3.1.6. Robustez [Regulación 41, 2007 del CECMED; Regulación 37, 2012 (anexo 1)]

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento. Debe determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. Capacidad del procedimiento de producir resultados analíticos con exactitud y precisión aceptables bajo variadas condiciones.

[Díaz de Armas, M. (1998); http://www.usac.edu.gt/archivos/econtCurso_Validacion_de_Metodos_Analiticos_con_formulas.pdf; http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf; http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/ Guía técnica de validación; http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/GuíaTécnicadevalidacióndeMétodosydeterminacióndelaincertidumbredelamedición_1.pdf.]

2.4. INCERTIDUMBRE [Elizabeth Prichard, 1997; Eurachem, 2000; Colectivo de autores, Folleto 2003; NC TS 367,2008; GUM, 2008; NC ISO/TS 21748, 2008]

2.4.1. Incertidumbre de las mediciones analíticas

La incertidumbre es un concepto ya introducido en el campo de las mediciones químicas y ha tenido una profunda repercusión en los conceptos y prácticas de la Química Analítica.

Esta proporciona una idea de la calidad del resultado ya que indica cuanto puede alejarse un resultado del valor considerado verdadero, por tanto los resultados siempre deben ir acompañados de su incertidumbre para que se puedan tomar decisiones basadas en los mismos. [Sánchez, 2002; Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F.X. ,2002] Hoy en día es cada vez más importante que los resultados analíticos vayan acompañados de su incertidumbre, la NC ISO/IEC 17025, 2006, constituye una base para la gestión de los laboratorios que desean demostrar su competencia técnica y por tanto la confiabilidad de sus resultados. Este documento normativo establece que los laboratorios deben tener y aplicar procedimientos para la estimación de la incertidumbre de la medición. Además al estimarla deben tener en cuenta todos los componentes de la incertidumbre que sean de importancia en una situación dada, utilizando para esto métodos apropiados de análisis. [NC ISO/IEC 17025, 2006; Valdés, T, 2008]

Según el "Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales de Metrología, BIPM, 2012", la incertidumbre de medición es un parámetro, asociado al resultado de una medición,

que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente a la magnitud que se mide. Este parámetro podría ser una desviación estándar o un intervalo que indique un determinado rango de confianza. En este caso la incertidumbre de medición abarca todos los componentes de un ensayo. Algunos se pueden obtener mediante la interpretación de la dispersión estadística de los resultados de una serie de mediciones, y otros se tienen que obtener con métodos complementarios (planes de muestreo, experiencia). [BIPM, 2012]

La evaluación numérica de la incertidumbre en análisis químico no es sencilla debido al elevado número de fuentes de error presentes en un procedimiento analítico, por tanto diversas fuentes de incertidumbre están presentes en la aplicación de un método de ensayo. Prácticamente cada paso analítico tiene asociado una fuente de incertidumbre.

Con respecto a la forma de cálculo a emplear para evaluar la incertidumbre de la medición en análisis químico ha existido una amplia controversia internacional en los últimos años. Actualmente se ha avanzado en este terreno y aunque todavía no existe un consenso definitivo de cuál método de estimación es mejor, ya los profesionales de la química cuentan con varios documentos de reconocimiento internacional que sirven de base para la estimación de la incertidumbre en Química Analítica. Estos documentos se basan en la modelación matemática del proceso de medición o en la estimación experimental de las incertidumbres involucradas. Es apropiado vincular la estimación de la incertidumbre con los procesos de validación de los métodos de ensayo.

2.4.2. Diferencia entre error e incertidumbre de medición

El error es la diferencia entre lo medido y su valor verdadero. La incertidumbre es la variación que resulta de la medición de la concentración del analito en el material de ensayo (muestra). El error es una diferencia mientras que la incertidumbre es un intervalo. Para cuantificar el error de la medición debe conocerse el valor verdadero o el valor convencionalmente verdadero, mientras la estimación de la incertidumbre de la medición no requiere que sea conocido el valor verdadero.

2.4.3. Valor verdadero y convencionalmente verdadero

Se define como valor verdadero al valor compatible con la definición de una magnitud dada. Sería aquel que se obtendría de una medición perfecta lo cual es ideal.

Se define como valor convencionalmente verdadero al valor atribuido a una magnitud particular y aceptada, algunas veces por convenio, que tiene una incertidumbre apropiada para un propósito dado.

Los valores asignados a los patrones de referencia son ejemplos prácticos de valores convencionalmente verdaderos.

2.4.4. Estimación de la incertidumbre de medición

La medición y su incertidumbre son siempre estimadas dependientes, por ejemplo, del método, la matriz y la concentración del analito. Es importante establecer además, como se hicieron los estimados. Debe establecerse cuales materiales fueron estudiados (cuando se estima la incertidumbre). La utilización de soluciones sintéticas puede resultar en bajos estimados, no reales, comparados con aquellos que pueden ser esperados cuando se analizan muestras de ensayo auténticas. Sin embargo, las soluciones sintéticas pueden ser muy útiles en el control de la calidad de los instrumentos.

2.4.5. Metodología para la estimación de la incertidumbre de la medición

En principio la estimación de la incertidumbre de un resultado analítico es un proceso simple, pero se requiere seguir una metodología que incluye las siguientes etapas:

- Especificación del mensurando.
- Establecer el modelo matemático.
- Identificar las fuentes de incertidumbre.
- Cuantificar cada fuente de incertidumbre.
- Combinar las incertidumbres estándar de cada fuente.
- Expandir la incertidumbre. Incertidumbre expandida.
- Resultado de la medición.

Es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

a) Muestreo

b) Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, etc.

c) Sesgos instrumentales: Las debidas a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura.

d) Pureza de reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.

e) Analista: Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje.

f) Condiciones de medición:

- ❖ Las debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de ***k*** determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, etc.
- ❖ Otras condiciones de medición: temperatura, humedad, etc.

g) Otras: Método (por ejemplo al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.

Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico.

2.4.6. Tipos de incertidumbre

Según la Guía del Buró Internacional de Pesos y Medidas y la Organización Internacional de patrones [BIPM, 2012] existen dos formas de evaluar la incertidumbre estándar, evaluación tipo A y evaluación tipo B. La clasificación de la incertidumbre en tipo A o tipo B solo responde a la forma en que es evaluada y no tiene implicaciones en la calidad del reporte final de incertidumbre.

2.4.6.1. Métodos para evaluar la incertidumbre estándar

La incertidumbre asociada con el resultado de una medición es evaluada a partir de varias componentes, debidas a los efectos aleatorios y sistemáticos que ocurren en el proceso de medición, cada una de la cuales puede evaluarse por dos métodos diferentes:

- Evaluación tipo A de la incertidumbre estándar. Evaluadas a partir del resultado de series de mediciones. Se caracteriza por la desviación estándar.
- Evaluación tipo B de la incertidumbre estándar. Evaluadas a partir distribuciones de probabilidad supuestas. Se caracteriza también por la desviación estándar.

2.4.6.2. Evaluación de incertidumbre tipo A [GUM, 2008]

La incertidumbre tipo A es aquella que es obtenida a partir de una serie de mediciones del mensurando y se cuantifica por medio de la desviación estándar.

La incertidumbre tipo A es, por tanto, obtenida a partir de una distribución de probabilidad basada en frecuencia de ocurrencia, de aquí que mientras mayor sea el número de mediciones (n), mejor estimado de la media y de la dispersión de los valores se obtendrán, pero ello está limitado por razones de tiempo y recursos.

No obstante, es necesario tener en cuenta si realmente las mediciones repetidas son totalmente independientes y analizar si las influencias asumidas como aleatorias realmente lo son, pues puede ocurrir que la dispersión varíe con el tiempo en cuyo caso habrá que definir esa dependencia.

Cuando el número de mediciones (n) es pequeño, es necesario multiplicar por un factor para tener más confianza. Un valor de incertidumbre reportado a partir de n pequeña es poco confiable. Si $1 < n < 10$, y si además no se cuenta con alguna estimación basada en la experiencia o datos previos, entonces el resultado de la incertidumbre de tipo A debe calcularse multiplicando el valor de S ($\overline{X}$) por los valores del factor t que están basados en la distribución "t" de Student.

Si $n \geq 10$**,** entonces solamente sería S ($\overline{X}$).

La selección de la incertidumbre Tipo A puede dar buena información de las características del mensurando, pero la calidad de la misma depende del número de observaciones. Al decidir por una evaluación Tipo A hay observar las siguientes reglas:

- Esclarecer si las observaciones repetidas son completamente independientes (para no correr el riesgo de perder información sobre la variabilidad del mensurando).

- ❖ Si el procedimiento de medición plantea ajuste de cero con respecto a un punto de referencia, es necesario hacerlo cada vez que se tome una observación.
- ❖ Comprobar que las influencias asumidas como aleatorias tengan realmente esa característica y que sus medias y varianzas no dependan del tiempo o, en caso afirmativo, definir estas dependencias.

2.4.6.3. Evaluación de incertidumbre tipo B [GUM, 2008]

Una evaluación de tipo B de la incertidumbre estándar se realiza cuando no se dispone de información sobre la magnitud dada para hacer un análisis estadístico. En tal caso, la incertidumbre se evalúa a partir de juicio científico mediante toda la información de que se disponga sobre la posible variabilidad dada.

El conjunto de esta información puede incluir:

- Definición incompleta del mensurando o realización imperfecta de su definición.
- Si el muestreo forma parte del proceso, este aporta incertidumbre.
- Efecto de las condiciones ambientales o medición incorrecta de estas influencias.
- Apreciación o resolución.
- Valores inexactos de patrones y materiales de referencia.
- Valores inexactos de constantes incorporadas al modelo de la medición.
- Variaciones en observaciones repetidas (variabilidad de los resultados).
- La que aportan los instrumentos utilizados (balanzas, volumétricos, etc.).
- Suposiciones incorporadas en los métodos.
- Heterogeneidad entre las muestras (variabilidad).
- Error sistemático en el proceso de toma de muestra.
- Falta de representatividad de la muestra.
- Estado físico de la muestra.
- Efectos de la presión, temperatura, la luz, etc., sobre la muestra.

- Afectación de la muestra por el propio proceso de muestreo y el almacenamiento.
- Contaminación de la muestra.
- Procedimiento de sub-muestreo.
- Disolución, errores de dilución, extracción, contaminación.
- Puesta a punto de los parámetros de los instrumentos.
- Recobrado del analito.
- Efectos del operador (determinación de punto final, etc.)
- Impurezas de los reactivos.
- Estabilidad de la muestra (afectaciones por la humedad, temperatura, etc).
- Contaminaciones entre muestras.
- Efecto Matriz (su composición afecta el recobrado o la respuesta de un instrumento)
- Estequiometría asumida (Desviaciones de la reacción esperada, reacción incompleta, reacciones colaterales).
- Curva de calibración (una de las más importantes).
- Corrección del blanco (importante en el análisis de trazas).

El uso adecuado de la información de que se dispone para una evaluación tipo B de la incertidumbre estándar requiere de una visión basada en la experiencia y el conocimiento que se tenga del proceso de medición (principio, método y los instrumentos de medición). Una evaluación de incertidumbre estándar tipo B puede ser tan confiable como una de tipo A, especialmente cuando una evaluación de tipo A se base en un número pequeño de observaciones. La evaluación de la incertidumbre de tipo B incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución correspondiente, así podemos encontrarnos con diversas situaciones, entre las más frecuentes podemos mencionar:

a) Distribución rectangular

Frecuentemente sucede que sólo es posible establecer que todos los valores de una variable aleatoria están comprendidos en un intervalo entre a_- y a_+, y que cualquiera de los posibles

valores tiene igual probabilidad de ocurrencia. En este caso, se dice que la variable aleatoria cumple una *ley de distribución rectangular o uniforme.*

Ejemplos típicos de aplicación de esta distribución son:

- ✓ Resolución de un instrumento.
- ✓ Información técnica sobre el Error Máximo Permisible (EMP) de un instrumento de medición.

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

En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.

b) Distribución triangular

En el caso que la probabilidad de que la variable aleatoria tome los valores en el intervalo entre a- y a+, tenga un valor máximo en el centro del intervalo y disminuya linealmente hacia los extremos del mismo hasta cero, estamos en presencia de una *ley de distribución triangular*.

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

c) Distribución normal o de Gauss

En la estadística matemática tiene gran importancia la denominada *ley de distribución normal o ley de distribución de Gauss.* Es la piedra angular de la teoría estadística moderna. Tiene

forma simétrica acampanada cuyas colas se extienden indefinidamente en ambas direcciones. Queda completamente determinada si se conoce su media y su desviación estándar.

Ejemplos prácticos de eventos con distribución normal:

- ✓ Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente.
- ✓ La incertidumbre indicada en certificados de calibración.

Teorema del límite central

Si una variable aleatoria X es la suma de un número grande de variables aleatorias mutuamente independientes, y la influencia de cada una de ellas en toda la suma es despreciable, entonces X tiende a una distribución normal.

2.4.7. Cálculo de la incertidumbre

En la práctica, la incertidumbre en el resultado puede provenir de diversas fuentes incluyendo por ejemplo, el muestreo, los efectos de matriz e interferentes, las condiciones ambientales, la incertidumbre procedente de las balanzas y el material volumétrico, los valores de referencia, las aproximaciones incorporadas al método y el procedimiento utilizado, las variaciones aleatorias, etc.

Para estimar la incertidumbre total, es necesario considerar todas las fuentes de incertidumbre que puedan ser significativas y obtener la contribución individual de cada una de ellas (denominada incertidumbre del componente). Las contribuciones deben ser expresadas como desviaciones estándar y combinadas de acuerdo a las reglas apropiadas para dar la incertidumbre combinada estándar. Al expresarla como una desviación estándar, la incertidumbre del componente se denomina “incertidumbre estándar del componente”.

Aunque la incertidumbre combinada puede ser universalmente utilizada para expresar el resultado de una medición, es frecuentemente necesario dar una medida de la incertidumbre de la medición que defina un intervalo alrededor del resultado de la medición en el cual se estima que se encuentre el valor del mensurando con un alto nivel de confianza. La medida adicional que cumple con el requisito de definir un intervalo del tipo indicado, es llamada incertidumbre expandida y se denota por U(y), se obtiene al multiplicar la incertidumbre

estándar combinada $u_c(y)$ por un factor de cobertura k. El valor general de k está en el rango de 2 a 3. La práctica internacional generalmente aceptada recomienda un factor de cobertura k = 2. Este valor de k va a proporcionar un intervalo con un nivel de confianza de aproximadamente el 95 % si se cumplen las condiciones del Teorema de Límite Central y se puede atribuir al mensurando "Y" una distribución normal.

Si la aproximación antes referida es satisfactoria en el caso dado, el resultado de la medición se expresará entonces como: Y = y ± U con k = 2, y se acompañará por la siguiente aclaración:

"La incertidumbre expandida reportada se basa en una incertidumbre estándar multiplicada por un factor de cobertura k, proporcionando un intervalo en el cual debe estar incluido el valor del mensurando con un nivel de confianza de aproximadamente el 95 %".

En la expresión final del resultado de la medición, la incertidumbre debe reportarse con no más de 2 cifras significativas, y el valor del estimado del mensurando debe redondearse de forma que no contenga cifras posteriores a la posición decimal de la última significativa reportada en la incertidumbre asignada al mismo. [Evelyn de F, 2008; http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/VIGENTES_ENERO2013/Guias_Tecnicas/ANALITICA CG CL v02_.pdf; http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/GuíaTécnicadevalidacióndeMétodosydeterminacióndelaincertidumbredelamedición_1.pdf.]

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

3.1.1. Equipos

- Cromatógrafo de gases con detector de captura electrónica DANI / GC1000 con:
  - Software Clarity Chromatografy Station/2.4.1; 2005.
  - Autosampler Hta / HT310A.
  - Detector ASPN – VA / ECD 86.10.
  - Inyector SL / Split – Splitless.
  - Generador de nitrógeno Dominick Hunter / G1001E.
  - Compresor de aire JUN – AIR / OF 301.
- Balanza microanalítica Sartorius / MC5.
- Baño ultrasónico SONOREX / RK 52.
- Campana de extracción.
- Estufa WTB binder / DVE GS.
- Zaranda THYS-2.

3.1.2. Reactivos químicos, muestras y materiales de referencia

- Benzoato de bencilo p.a (Panreac; 99+ %).
- n-hexano p.a (Sigma-Aldrich; > 99%).
- Ácido clorhídrico p.a (Quinsa original de Merck).
- Hidróxido de sodio p.a (Panreac).
- G-1 material de referencia (MR) (lote 12-3-2; 99,87 % de pureza).
- MBr material de referencia (MR) (lote 12-MBr-2; 99,64 % de pureza).
- G-1 crudo lote 14-3-1.
- G-1 lote 92-3-39.

- G-1 lote 14-3-1.

3.1.3. Material de laboratorio

- Columna cromatográfica y precolumna HP – 5, 30 m; 0,32 mm; 0,25μm; US6595554H, J&W Scientific.
- Cristalería de uso común en laboratorio.

3.2. DESARROLLO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

La técnica desarrollada se basa en la separación por cromatografía de gases del G-1 y de su principal impureza MBr y su detección para la cuantificación mediante detector de captura electrónica. Se empleó el método del estándar interno. Para el desarrollo de esta se partió de otras técnicas utilizadas en el laboratorio de control de la calidad, en la determinación del contenido de G-1 por cromatografía de gases, por lo que solo fue necesario cambiar algunos de los parámetros.

3.2.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos para determinar el contenido de G-1 y MBr en lotes de IFA G-1 por GC-ECD

3.2.1.1 Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector

Se utilizaron las temperaturas descritas en el trabajo: Validación de la técnica de determinación por cromatografía gaseosa del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control: temperatura del horno 200° C, del inyector 230° C y del detector, 280° C. [Bravo, L. y Col., 1999; Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S., 2007 II]

3.2.1.2. Selección del flujo de fase móvil

Se utilizó flujo de fase móvil (Nitrógeno) 0,7 mL/min; flujo de hidrógeno 0,5 mL/min y flujo de aire 0,5 mL/min descrito en el trabajo: Procedimientos analíticos para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano. [Calvo, A. y Morales, S., 2007]

3.2.1.3. Selección del Tiempo de corrida

Se mantuvo el tiempo de corrida de 10 min descrito en el trabajo: Procedimientos analíticos para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano. [Calvo, A. y Morales, S., 2007]

3.2.1.4. Volumen de inyección

Se mantuvo un volumen de inyección de 1 µL, para ello se utilizó el autosampler acoplado al equipo.

3.2.1.5. Selección del estándar interno

Se utilizó el benzoato de bencilo. Estándar interno empleado siempre para analizar G-1 por cromatografía de gases porque tiene propiedades semejantes a este (temperatura de volatilización y solubilidad) que le confieren un comportamiento cromatográfico similar al G-1 en las condiciones descritas.

3.2.1.6. Selección del disolvente utilizado

Para la selección del disolvente se tuvieron en cuenta dos factores, la solubilidad del G-1 y la sensibilidad del detector de captura electrónica, por lo que se escogió el n-hexano, en el cual el G-1 es soluble y para el cual el detector de captura electrónica no es sensible por ser un hidrocarburo saturado y por lo tanto la señal no interfiere en el resultado.

3.2.1.7. Concentración de la muestra

Se escogió una concentración que permita determinar en la misma inyección el contenido de G-1 y su impureza MBr, teniendo en cuenta que esta última puede estar en una concentración de hasta un 1 % de la concentración de G-1, según especificación de calidad. Además, se tuvo en cuenta que el área del pico cromatográfico correspondiente al MBr fuera tal que pudiera ser integrada por el software del equipo para eliminar posibles errores.

3.2.2. Preparación de las disoluciones

Las disoluciones de trabajo para aplicar la técnica a la hora de analizar un lote de IFA G-1 se prepararon de la siguiente forma:

3.2.2.1. Preparación de la disolución de estándar interno (SI)

Se transfirió 1 mL de benzoato de bencilo a un matraz de 100 mL y se enrasó con n-hexano. (Disolución SI; 0,05 mol/L).

3.2.2.2. Preparación de la disolución de G-1 (MR)

Se pesó alrededor de 10 mg de G-1 (MR). Se transfirió a un matraz de 10 mL y se enrasó con n-hexano (1000 mg/L). De esta disolución se tomó 0,1 mL y se transfirió a un matraz de 10 mL, se

añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI) y se enrasó con n-hexano (Disolución A, 10 mg/L).

3.2.2.3. Preparación de la disolución de MBr (MR)

Se pesó alrededor de 10 mg de MBr (MR). Se transfirió a un matraz de 10 mL y se enrasó con n-hexano (1000 mg/L). De esta disolución se tomó 0,1 mL, se transfirió a un matraz de 10 mL, se añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI) y se enrasó con n-hexano (Disolución B, 10 mg/L).

3.2.2.4. Preparación de la disolución de G-1 muestra de ensayo

La muestra de ensayo se prepara de la misma manera que la disolución del material de referencia de G-1, (acápite 3.2.2.2).

3.3. DESARROLLO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

Todos los métodos analíticos que se realizan para el control de la calidad del IFA G-1 deben cumplir con determinadas características de fiabilidad, practicabilidad y de idoneidad; por lo que para cumplimentar los objetivos de la presente investigación se hizo necesario realizar la validación del procedimiento desarrollado.

En este caso se realizó una validación completa o exhaustiva según anexo 1 de la Regulación 37/2012 del CECMED, donde los parámetros a evaluar fueron:

- Pruebas de adecuación del sistema.
- Especificidad. (Selectividad).
- Linealidad.
- Precisión: repetibilidad y precisión intermedia.
- Exactitud. (Veracidad).
- Límite de detección y límite de cuantificación (para el MBr).

3.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo para el proceso de validación

Para la validación de la técnica las disoluciones de trabajo se prepararon como se explica a continuación.

Disolución de estándar interno: se preparó como se explica en acápite 3.2.2.1.

Disolución de G-1 (MR): se preparó como se explica en acápite 3.2.2.2.

Disolución de MBr (MR): se utilizaron disoluciones a una concentración de 0,1 mg/L, para representar el 1 % que puede contener como máximo una muestra de G-1 de esta impureza. Se prepararon de la siguiente forma:

Se pesó alrededor de 4 mg de MBr MR. Se transfirió a un matraz de 10 mL y se enrasó con n-hexano (400 mg/L). Se tomó 1 mL de esta disolución, se transfirió a un matraz de 10 mL y se enrasó con n-hexano (40 mg/L). De esta disolución se tomó, una alícuota de 25 µL se transfirió a un matraz de 10 mL, se añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI) y se enrasó con n-hexano (Disolución B 0,1 mg/L).

3.3.2. Pruebas de Adecuación del sistema

3.3.2.1. Repetibilidad de los tiempos de retención

Se preparó una disolución de G-1 en n-hexano a 10 mg/L de concentración según acápite 3.2.2.2 y una disolución de MBr en n-hexano a 0,1mg/L de concentración según acápite 3.3.1. Se realizaron 6 inyecciones de cada disolución en el sistema cromatográfico. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos de G-1 y MBr. La repetibilidad de los tiempos de retención debe ser menor que 1 %.

3.3.2.2. Eficacia de la columna o número de platos teóricos

Se realizaron 6 inyecciones de cada disolución del punto 3.3.2.1 en el sistema cromatográfico. Se calculó el número de platos teóricos a través de la siguiente fórmula:

$$N = 5{,}54 \cdot \left[\frac{T_R}{W_{1/2}} \right]^2 \quad (1)$$

Donde:

N: nº de platos teóricos

T_R: tiempo de retención del pico en minutos (dato brindado por el software utilizado)

$W_{1/2}$: anchura del pico a media altura en minutos (dato brindado por el software utilizado)

La eficacia de la columna se recomienda que sea superior a 5 000.

3.3.2.3. Simetría del pico de G-1 y MBr

Se realizaron 3 inyecciones cada disolución del punto 3.3.2.1 en el sistema cromatográfico. El dato del factor de simetría es brindado por el software utilizado. La simetría del pico debe estar entre 0,8 y 1,5.

3.3.2.4. Resolución entre el pico de G-1 y el de MBr

Se utilizó una disolución de G-1 (MR) en n-hexano contaminada con MBr al 1 % que se preparó de la siguiente forma:

Se preparó una disolución de G-1 (MR) en n-hexano a 1000 mg/L de concentración (Disolución A). Se preparó una disolución de MBr (MR) en n-hexano a 40 mg/L de concentración (Disolución B). Se tomó 0,1 mL de la Disolución A, y 25 µL de la Disolución B, se transfirieron a un matraz de 10 mL, se le añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI, 0,05 mol/L) y se enrasó con n-hexano. Se inyectó 5 veces en el sistema cromatográfico. Se calculó la resolución entre los picos correspondientes a ambos analitos a través de la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2\left[(T_R)_B - (T_R)_A\right]}{W_A + W_B} \quad (2)$$

Donde:

R_S: resolución de la columna cromatográfica

T_{RA}: tiempo de retención del pico A, en minutos

T_{RB}: tiempo de retención del pico B, en minutos

W_A: anchura del pico A en su base, en minutos. $W_A = 1.698\ W_{A_{1/2}}$

W_B: anchura del pico B en su base, en minutos. $W_B = 1.698\ W_{B_{1/2}}$

La resolución entre el pico de G-1 y MBr debe ser mayor o igual que 1,5.

3.3.3. Especificidad

Se registraron los cromatogramas de diferentes disoluciones de G-1en n-hexano, todas a 10 mg/L y en presencia del estándar interno.

a) Disolución del estándar interno, se preparó según acápite según acápite 3.2.2.1, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

b) Disolución de G-1 (MR) recién preparada según acápite 3.2.2.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

c) Disolución de G-1 (MR) contaminada con MBr al 1%. Se preparó según acápite 3.3.2.4, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

d) Disolución de G-1 sin purificar, del lote 14-3-1, se preparó según acápite 3.2.2.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

e) Disolución de G-1 de 20 años de producido (Lote 92-3-39), se preparó según acápite 3.2.2.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

f) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2 y después de 4h expuesta a la luz del laboratorio, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

g) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2 y después de 4h expuesta a la luz indirecta del sol, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

h) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2 y después de 4h protegida de la luz se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

i) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2, a la que se le añadió 1:10 de una disolución de ácido clorhídrico (HCL) 1 N y se puso en una zaranda 4 h protegida de la luz, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

j) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2, a la que se le añadió 1:10 de una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y se puso en una zaranda 4 h protegida de la luz, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

k) Disolución de G-1, se preparó según acápite 3.2.2.2 con un G-1 que fue sometido a 70 $^{\circ}$C en estufa durante 1 h, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

En todos los casos se observó si aparece algún pico adicional no suficientemente resuelto de los picos correspondientes al G-1 y al MBr.

3.3.4. Linealidad

Linealidad para el G-1:

Para realizar la evaluación de la linealidad se prepararon tres curvas de calibración en tres días diferentes, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 80 % y 120 % de la concentración teórica, es decir desde 8 mg/L hasta 12 mg/L de G-1 (MR). Las disoluciones se prepararon como se describe a continuación:

Disolución de estándar interno: se preparó como se describe en el acápite 3.2.2.1.

Disolución de G-1 MR: se preparó una disolución de G-1 (MR) de 1000 mg/L de concentración en n-hexano, de esta disolución se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL respectivamente, se añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI) a cada uno y se enrasó con n-hexano, (tabla 1). Se inyectaron 2 veces en el sistema cromatográfico.

Tabla 1. Curva de calibración de la linealidad para G-1.

Alícuota de disolución B (mL)	**Concentración mg/L**
0,08	8
0,09	9
0,1	10
0,11	11
0,12	12

Linealidad para el MBr:

Para realizar la evaluación de la linealidad se prepararon tres curvas de calibración en tres días diferentes cada una, donde el punto medio corresponde al límite de especificación para el contenido de MBr en el G-1 y se abarcó un intervalo que incluye el nivel reportado hasta el 120 % de la especificación, según anexo 1 de la regulación 37, 2012 del CECMED, es decir desde 0,06 mg/L hasta 0,14 mg/L de MBr (MR). Las disoluciones se prepararon como se describe a continuación:

La disolución de estándar interno se preparó como se describe en el acápite 3.2.2.1.

Para la disolución de MBr se preparó una disolución de MBr (MR) de 40 mg/L de concentración en n-hexano y de esta disolución se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL, se añadió 5 mL de la disolución del estándar interno (Disolución SI) a cada uno y se enrasó con n-hexano (tabla 2). Se inyectaron 2 veces cada una en el sistema cromatográfico.

Tabla 2. Curva de calibración de la linealidad para MBr.

Alícuota de disolución C (µL)	**Concentración mg/L**
15	0,06
20	0,08
25	0,10
30	0,12
35	0,14

Para evaluar la linealidad en ambos casos se siguieron los siguientes criterios (según la regulación 37, 2012 del CECMED, (anexo 1):

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se determinó para ambos casos (G-1 y MBr) la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (≥ 0,990) y el coeficiente de determinación (≥ 0,98), el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f) (cociente de respuesta (R) / concentración), el cual no será superior al 5 %. Se evaluó además, la varianza de la pendiente de la línea de regresión, desviación estándar, desviación estándar relativa, limites de confianza de la pendiente y el grado de significación; y se verificó la proporcionalidad (los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para un nivel de confianza de 95 %).

3.3.5. Precisión

La precisión del método se obtuvo mediante el análisis de la *repetibilidad* y *la precisión intermedia,* para ambos analitos (G-1 y MBr). En todos los casos debe cumplirse que los coeficientes de variación deben ser menores o iguales que el 2 % (*anexo 1- Regulación 37:2012 del CECMED*).

3.3.5.1. Repetibilidad instrumental

Para G-1 se preparó una disolución de 10 mg/L como se describe en 3.2.2.2 y para MBr se preparó una disolución de 0,1 mg/L según se describe en 3.3.1. En ambos casos se inyectó 6 veces en el sistema cromatográfico. Se calculó la media de los cocientes de respuesta (R_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV %).

3.3.5.2. Repetibilidad del método

Para el G-1: Se realizó a tres niveles diferentes de concentraciones (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración, 8 mg/L, 10 mg/L y 12 mg/L) que se obtuvieron a partir de una disolución de G-1 (MR) de 1000 mg/L de concentración en n-hexano de la cual se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL, se les adicionó 5 mL de estándar interno y se enrasaron con n-hexano, se realizó un mínimo de tres determinaciones para cada una. Se calculó la concentración media de los resultados (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación de la repetibilidad ($CV\ \%$).

Para el MBr: Se realizó a tres niveles diferentes de concentraciones (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración, 0,06 mg/L, 0,10 mg/L y 0,14 mg/L) que se obtuvieron a partir de una disolución de MBr (MR) de 40 mg/L de concentración en n-hexano de la cual se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL, se les adicionó 5 mL de estándar interno y se enrasaron con n-hexano, con un mínimo de tres determinaciones para cada una. Se calculó la media de las concentraciones (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación de la repetibilidad ($CV\ \%$).

3.3.5.3. Precisión intermedia

En ambos casos (G-1 y MBr), se realizó a tres niveles diferentes de concentraciones (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración, es decir, para G-1 8 mg/L, 10 mg/L y 12 mg/L y para MBr 0,06 mg/L, 0,10 mg/L y 0,14 mg/L). El análisis se hizo por duplicado en tres días diferentes, con dos analistas, en el mismo equipo y el mismo laboratorio. Las disoluciones de trabajo se prepararon como se describe en 3.3.5.2

Se calculó la media de las concentraciones (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV %) para cada grupo de análisis y para el total. El CV de la precisión intermedia debe ser inferior al doble del CV de la repetibilidad del método.

Además, se realizó un análisis de varianza multifactorial para analizar la influencia de los factores concentración, analista y día en la variabilidad de los resultados, para ello se utilizó un estimador que es el $\ln R^2$ (donde R son los residuales), con un nivel de confianza de 95 %.

Para los cálculos y el análisis estadístico se utilizó los programas Statgraphics Plus for Windows 4.1, Professional Version, 1999 y Microsoft® Office Excel 2010.

3.3.6. Exactitud (Veracidad)

Para G-1: Se realizó a tres niveles diferentes de concentraciones: (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración, 8 mg/L, 10 mg/L y 12 mg/L), las disoluciones de G-1 que se utilizaron se prepararon como se describe en 3.3.5.2. El análisis se realizó por triplicado.

Para MBr: Se prepararon disoluciones de G-1 (MR) (10 mg/L) en n-hexano con estándar interno a las que se les añadió concentraciones conocidas de MBr a tres niveles de concentración diferentes, es decir, 0,06 mg/L, 0,10 mg/L, 0,14 mg/L y se enrasó con n-hexano. El análisis se realizó por triplicado.

Se efectuó un test de t de student para determinar si los valores medios hallados a cada nivel de concentración y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un nivel de confianza de 95 %.

Se calcularon los por cientos de recuperación los cuales deben estar entre 98 % y 102 %. Se evaluó la influencia del factor concentración mediante un análisis de varianza unifactorial con un nivel de confianza de 95 %.

Para los cálculos y el análisis estadístico se utilizaron los programas Statgraphics Plus for Windows 4.1, Professional Version, 1999 y Microsoft® Office Excel 2010.

3.3.7. Límites de detección y cuantificación (solo para MBr)

El límite de detección y el límite de cuantificación se determinaron mediante el diseño de relación señal ruido, para lo cual se procedió al análisis repetido del estándar interno. Se inyectó el estándar interno, preparado según 3.2.2.1, en el sistema cromatográfico y una vez obtenido el cromatograma se delimitó dentro de la línea base, un período de tiempo 20 veces la anchura en la base del pico de MBr.

Para el cálculo se utilizó la fórmula:

$$LD\ o\ LQ = \frac{\overline{X}_{SI} + K \cdot S_{SI}}{b} (3)$$

Donde:

LD: límite de detección

LQ: límite de cuantificación.

K: constante ≥ 3 (K = 3 para límite de detección y K = 10 para límite de cuantificación).

S_{SI}: desviación estándar de los cocientes de respuesta de los n estándar interno.

b: pendiente de la recta de calibración.

$\overline{X}_{SI}$: Media de la respuesta de los n estándar interno.

3.4. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DEL RESULTADO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

Para el cálculo de la incertidumbre del resultado de esta técnica, se analizó un lote de IFA G-1. El desarrollo de la técnica se describe a continuación:

Se prepararon disoluciones de trabajo de G-1 (MR), MBr (MR) y dos réplicas de la muestra de ensayo de G-1, todas como se describe en 3.2.2. Se realizaron las inyecciones a través del inyector del cromatógrafo de gases y según la secuencia programada en el autoinyector:

- Tres inyecciones de G-1 (MR).
- Tres inyecciones de MBr (MR).
- Dos inyecciones por cada una de las réplicas de la muestra de ensayo de G-1.

Obteniéndose los cromatogramas correspondientes a cada una de las muestras.

A partir de los datos obtenidos y utilizando hoja de cálculo en Excel se obtuvo el contenido de G-1 (pureza) y de MBr (impureza) en la muestra del lote analizado, utilizando la fórmula:

$$\%\ X_i = \frac{Rm_i \cdot Mp_i \cdot Pp_i}{Rp_i \cdot Mm_i} \cdot Fpd \quad (4)$$

Donde:

El subíndice "i" se refiere al contenido de G-1 o de MBr en la muestra, según sea el caso.

% Xi: Por ciento de G-1 obtenido o de MBr en la muestra, según corresponda.

Rmi: Cociente de respuesta de la muestra de ensayo.

Rpi: Cociente de respuesta del material de referencia.

Mm: Masa de la muestra de ensayo en mg.

Mpi: Masa del material de referencia en mg.

Ppi: Pureza del material de referencia en %.

F: Factor para expresar el % Xi en base a materia seca, teniendo en cuenta el porciento de pérdidas por desecación (Ppd) de G-1. F se determina de la manera siguiente:

$$F = \left(\frac{100}{100 - \%Ppd} \right)$$

3.4.1. Pasos para el cálculo de la incertidumbre del resultado

A continuación se describen los pasos para determinar la incertidumbre del resultado:

1. Escribir la expresión matemática de la magnitud que se mide. Modelo matemático.
2. Identificar las diferentes fuentes de incertidumbre y analizar su influencia en el mensurando (diagrama causa-efecto).
3. Medir o estimar la **incertidumbre individual** del componente asociado a cada una de las potenciales fuentes de incertidumbre consideradas.
4. Combinar las componentes de incertidumbre para determinar la **"incertidumbre estándar combinada".**
5. Calcular la **incertidumbre Expandida**.
6. Resultado de la medición.

3.4.1.1. Expresión matemática de la magnitud que se mide. Modelo matemático

El modelo matemático empleado, es la ecuación matemática (4) descrita en 3.4.

3.4.1.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre. Diagrama de causa - efecto (Espina de Pescado)

Para identificar las fuentes de incertidumbre que afectan los términos de la expresión utilizada para calcular el contenido de G-1 y MBr en la muestra analizada (modelo matemático) se desarrolló una

tormenta de ideas con criterios de diferentes expertos y se confeccionó un diagrama de *causa-efecto.*

3.4.1.3. Determinación y evaluación de los componentes de incertidumbres

Después de haber identificado todas las posibles fuentes que pueden aportar incertidumbre al resultado de la técnica según el acápite 3.4.1.2, se determinan aquellas que verdaderamente se pueden calcular. Para esto se analizaron las causas de todos los posibles errores de medición de la técnica.

Las fuentes de incertidumbre se calcularon según los criterios *Tipo A y Tipo B* (acápites 2.4.6.1. y 2.4.6.3.):

Incertidumbres "Tipo A"

Para determinar estas incertidumbres, se utilizó una "t de student" con α = 0,05 y n-1 grados de libertad, las expresiones matemáticas se describen a continuación:

Las incertidumbres "Tipo A" se hallaron mediante la fórmula:

$$u(x) = S(\overline{X}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n(n-1)}} \qquad (5)$$

Obtenida al combinar (6) y (7):

$$S(\overline{X}) = \frac{S(X)}{\sqrt{n}} \quad (6) \qquad\qquad S(X) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{(n-1)}} \qquad (7)$$

Como el número de mediciones (n) está entre 2 y 9, entonces se multiplicó por la "t de student":

$$u(x_i) = S(\overline{X}) \cdot t \quad (8)$$

Incefrtidumbres "Tipo B"

Estas se determinaron mediante dos vías o distribuciones diferentes, las cuales fueron:

- Rectangular o uniforme: $u(x_i) = a/\sqrt{3}$ (9)
- Normal o de Gauss: $u(x_i) = U/k$ ó $\sigma(x_i) = a/3$ (10)

Donde "a" es obtenida de diversas fuentes debido a que no se dispone de información sobre la magnitud dada para hacer un análisis estadístico.

- Especificaciones de los fabricantes.
- Datos proporcionados en los certificados de calibración y otros reportes.
- Incertidumbres asignadas a datos de referencia tomados de manuales.

3.4.1.4 Cálculo de la incertidumbre estándar combinada

El cálculo de la incertidumbre estándar combinada se realizó por el modelo de multiplicación y división ($z = x \cdot y$), según las reglas para combinar las Incertidumbres Típicas.

La ecuación general para el cálculo de la incertidumbre combinada se presenta a continuación:

$$u_c(y) = z\sqrt{\left(\frac{u(x)}{x}\right)^2 + \left(\frac{u(y)}{y}\right)^2} \qquad (11)$$

3.4.1.5 Cálculo de la incertidumbre expandida

Se obtuvo al multiplicar la incertidumbre estándar combinada u_c % X_{ims} por un factor de cobertura k, en este caso el factor de cobertura k = 2, y corresponde al 95 % de confianza, por tanto sería:

$$U(y) = k \cdot u_c(y) \quad (12)$$

3.4.1.6 Expresión del resultado de la medición

Para expresar la incertidumbre del resultado, etapa final de este proceso, se tomó el resultado o la media de una serie de mediciones reales (y) y se expresó de la siguiente manera:

$$Y = y \pm U \quad \text{con } k = 2 \text{ para un 95 \% de confianza.}$$

Donde:

Y: resultado final.

y: resultado de las mediciones.

U: incertidumbre expandida.

k: factor de cobertura.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

Las condiciones de la técnica para determinar G-1 y MBr en lotes de IFA G-1 son:

- Temperatura:
  - ✓ Horno: 200 °C.
  - ✓ Inyector: 230 °C.
  - ✓ Detector: 280 °C.
- Gases:
  - ✓ Flujo de Nitrógeno: 0,7 mL/min.
  - ✓ Flujo de Hidrógeno: 0,5 mL/min.
  - ✓ Flujo de aire: 0,5 mL/min.
- Tiempo de corrida: 10 min.
- Volumen de inyección 1 µL.
- Concentración de SI: 0,025 mlo/L.
- Concentración del G-1 MR: 10 mg/L.
- Concentración del MBr MR: 10 mg/L.

En estas condiciones el G-1 presenta un tiempo de retención a los 6,4 minutos, el (MBr) presenta un tiempo de retención a los 4,4 minutos y el estándar interno presenta un tiempo de retención a los 7,2 minutos, como se observa en la figura 5.

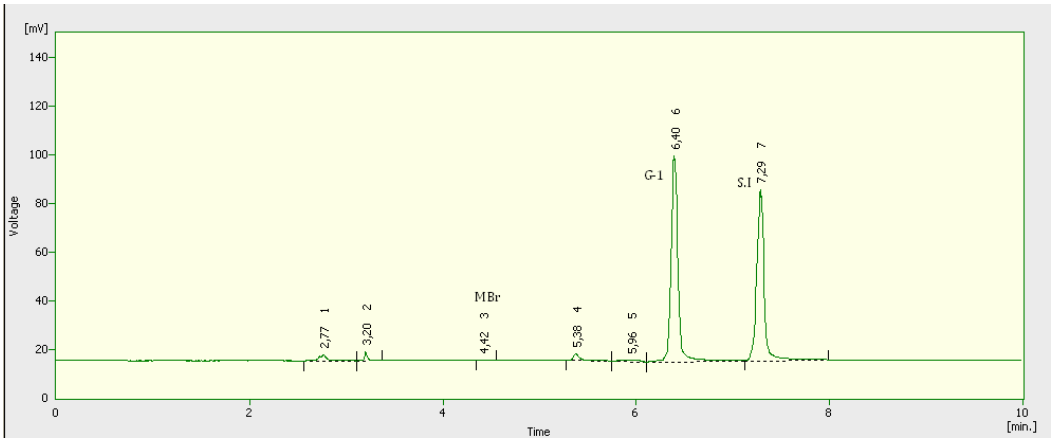

Figura5. Cromatograma de G-1 material de referencia (10 mg/L)

4.2 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

En la técnica analítica utilizada para la determinación del contenido de G-1 y de MBr por CG-ECD, fue necesario evaluar todos los parámetros de desempeño establecidos por la Regulación No 37, 2012 (anexo 1) del CECMED, es decir, se realizó una validación completa o exhaustiva ya que se trata de un método desarrollado en el laboratorio de cromatografía del departamento de control de la calidad del CBQ.

La validación del método de ensayo se realizó utilizando disoluciones de G-1 MR de 10 mg/L de concentración. Las disoluciones de MBr que se utilizaron fueron de 0,1 mg/L de concentración, para representar el 1 % de esta impureza que puede contener como máximo una muestra de G-1.

4.2.1. Pruebas de adecuación del sistema

Para G-1

- La repetibilidad de los tiempos de retención de 6 inyecciones repetidas de una disolución de G-1 de 10 mg/L de concentración tiene un coeficiente de variación de 0,053 %, menor que 1 %.

- El número de platos teóricos de la columna utilizada es de 33 780,5655; mucho mayor que 5 000.
- La simetría del pico de G-1 es de 1,033; se encuentra en el intervalo entre 0,8 y 1,5.

Para MBr

- La repetibilidad de los tiempos de retención de 6 inyecciones repetidas de una disolución de MBr de 0,1 mg/L tiene un coeficiente de variación de 0,057 %, menor que 1 %.
- El número de platos teóricos de la columna utilizada es de 66 133,1164; mucho mayor que 5 000.
- La simetría del pico de MBr es de 1,235; se encuentra en el intervalo entre 0,8 y 1,5.

Para G-1 y MBr

- La resolución entre el pico de G-1 y MBr es 18,127, mucho mayor que 1,5.

Por tanto, el sistema cromatográfico a emplear es adecuado para su utilización en este método de ensayo.

4.2.2. Especificidad

A continuación se exponen los cromatogramas (de la Figura 6 a la 16) registrados durante el estudio de la especificidad de diferentes disoluciones de G-1, todas a 10 mg/L y en presencia del estándar interno.

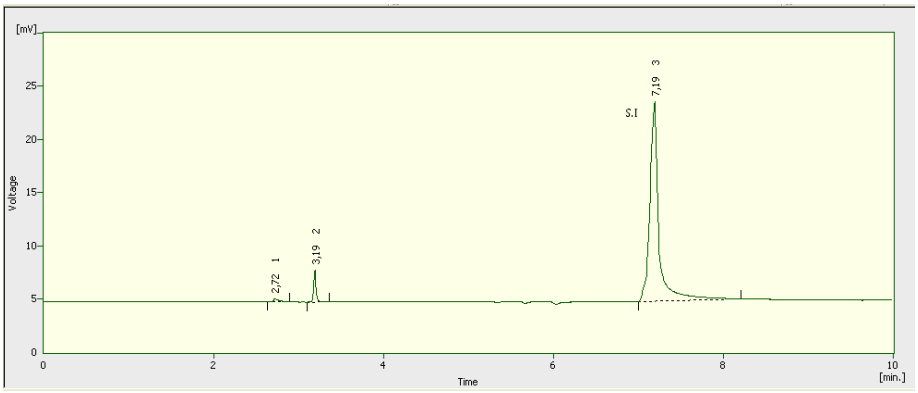

Figura 6. Cromatograma del Estandar Interno (S.I)

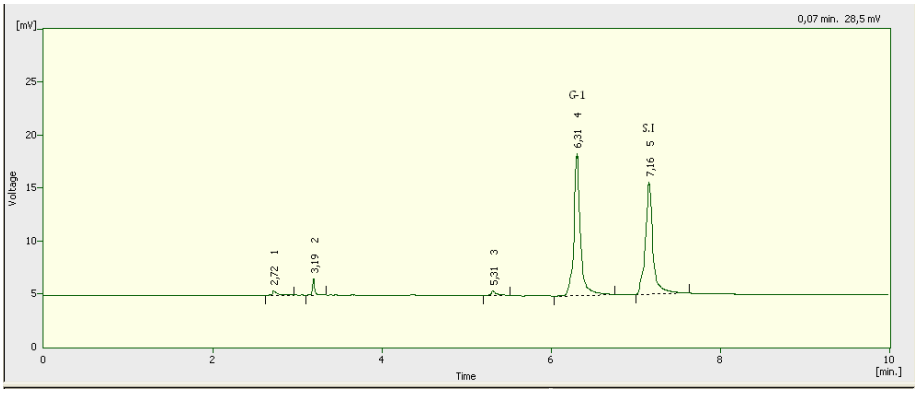

Figura 7. Cromatograma de disolución de G-1 Material de Referencia (10 mg/L) recién preparada

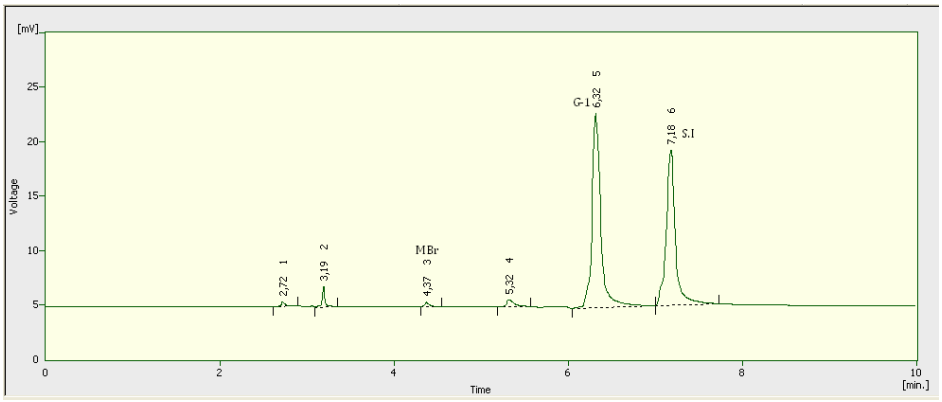

Figura 8. Cromatograma de una disolución de G-1 material de referencia (10 mg/L) contaminada con MBr al 1% recién preparada

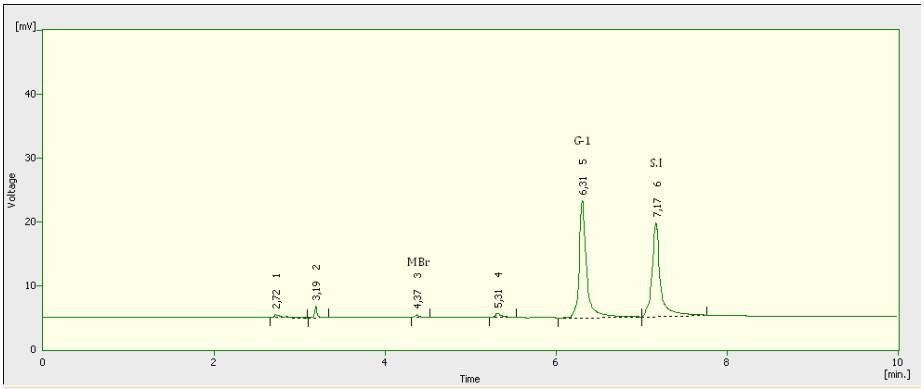

Figura 9. Cromatograma de una disolución de G-1 sin purificar

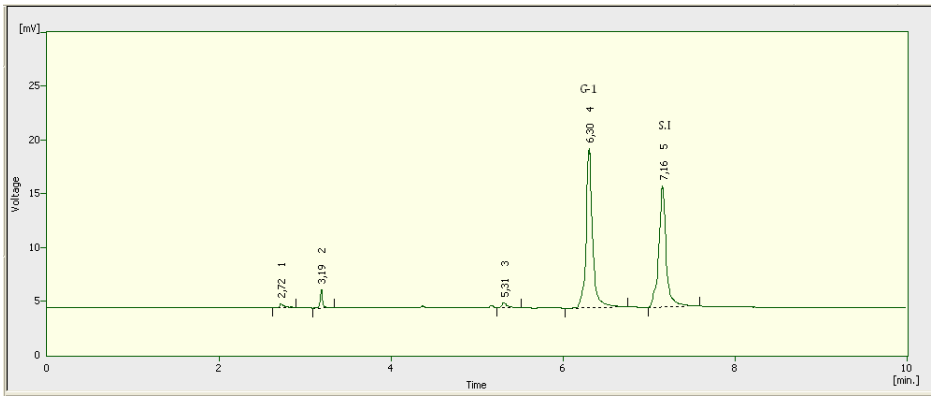

Figura 10. Cromatograma de una disolución de G-1 10 mg/L de veinte años de producido

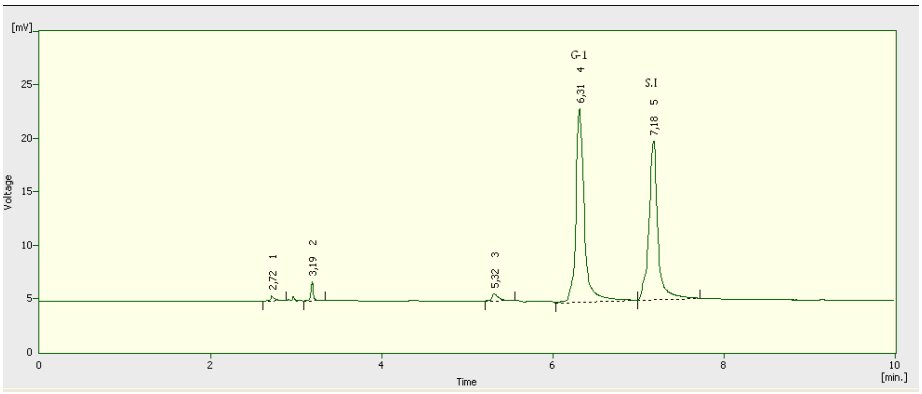

Figura 11. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), después de 4h expuesta a la luz del laboratorio

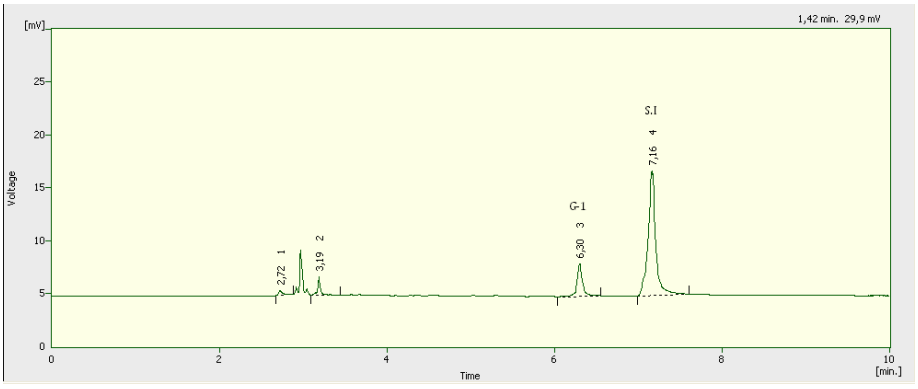

Figura 12. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), después de 4h expuesta a la luz indirecta del sol

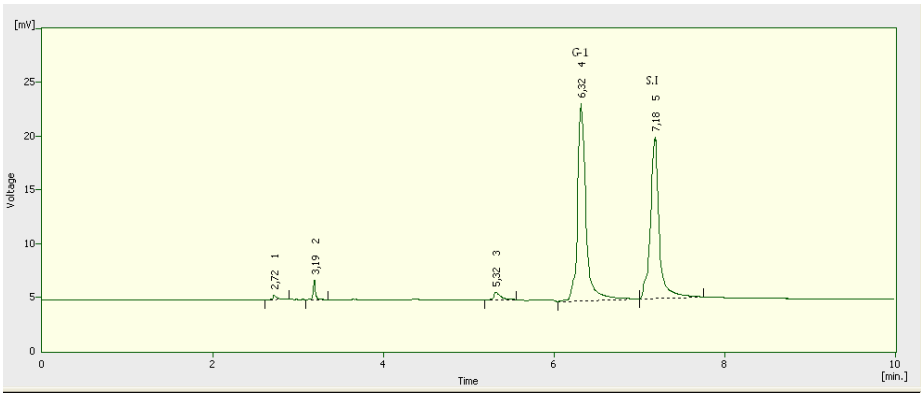

Figura 13. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), después de 4 h protegida de la luz

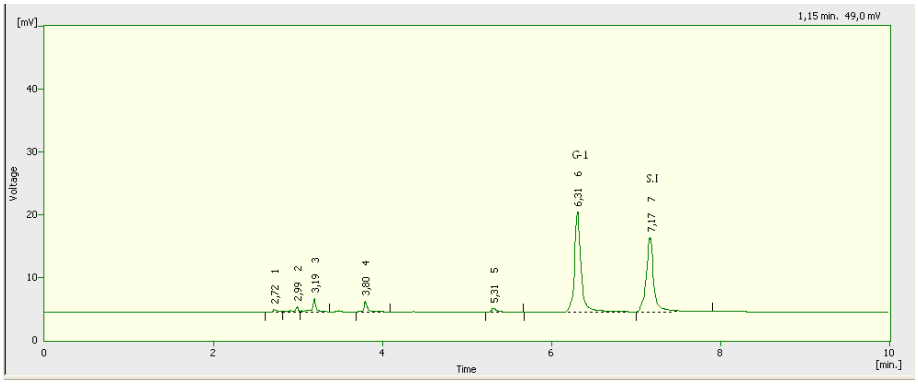

Figura 14. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), a la que se le añadió 1:10 de una disolución de HCL 1 N, después de 4 h protegida de la luz

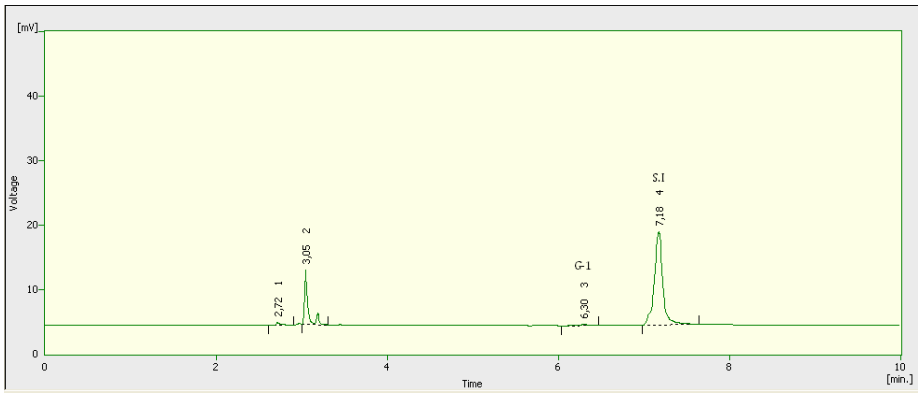

Figura 15. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), a la que se le añadió 1:10 de una disolución de NaOH 0,1 N, después de 4 h protegida de la luz

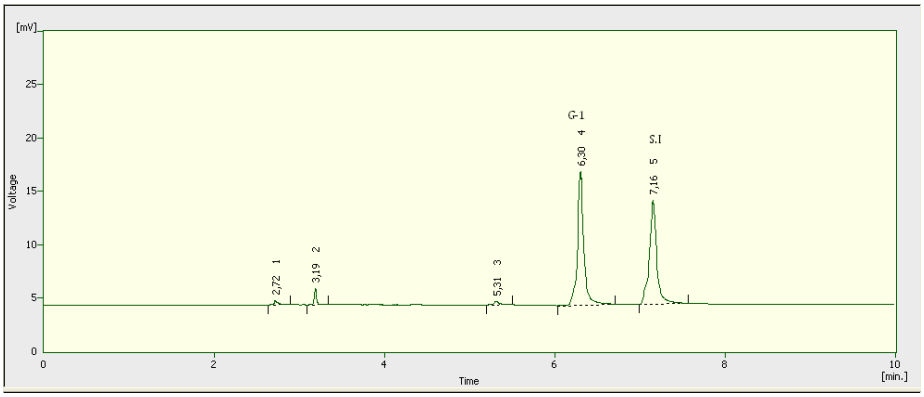

Figura 16. Cromatograma de una disolución de G-1 (10 mg/L), después de ser sometido a 70°C en estufa durante 1h

En todos los casos se observa que no hay ningún pico cromatográfico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al G-1 y al MBr, por lo que se concluye que el método en las condiciones estudiadas es específico.

4.2.3. Linealidad

Linealidad para el G-1

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración para G-1 se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de G-1 por CG-ECD.

Conc. (mg/L)	R_1	R_2	R_3
8	0,94924	0,96036	0,95659
9	1,07325	1,07195	1,07376
10	1,18476	1,19745	1,19474
11	1,31815	1,31867	1,31613
12	1,42692	1,42446	1,42275

Leyenda:

R: cociente de respuesta

En la Figura 17 se aprecia la curva de calibración para los valores antes mencionados.

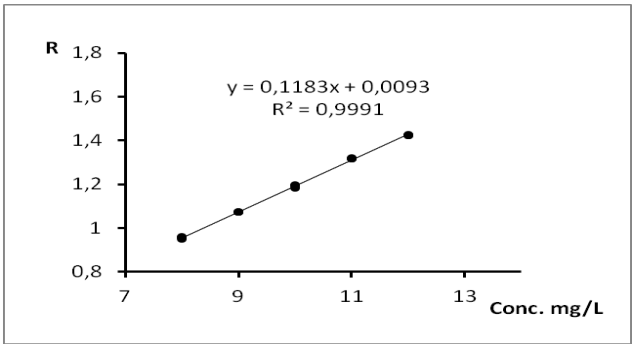

Figura 17. Curva de calibración y ecuación de la recta de G-1 por CG-ECD

Del análisis de la ***regresión y la linealidad***, para G-1, se obtiene que:

- El coeficiente de correlación es de 0,9995 con un coeficiente de determinación igual a 0,9991, por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y el cociente de respuesta determinado superior al 99,9 %.
- El CV_f = 0,44 %, por tanto, se cumple que $CV_f \leq 5$ %, lo que significa que existe linealidad en los datos obtenidos.
- La pendiente (*b*) es de 0,1183 y la varianza de la pendiente (S_b^2) es de $9{,}70196*10^{-7}$, por lo que el método posee una buena sensibilidad.
- La desviación estándar de la pendiente (S_b) es de 0,00098 y la desviación estándar relativa (S_b rel. %) es igual a 0,83 % ($\leq$ 2 %).
- Los límites de confianza para t_{tab} = 2,16, con n-2 grados de libertad y α = 0,05, están entre 0,12043 y 0,11617.
- Para determinar el grado de significación la t_{exp} = 120,10, de esta manera se acepta H_1: b≠0, por lo que existe regresión, la probabilidad de que b ≠ 0 es superior al 95 %.

Del análisis de la ***proporcionalidad*** se obtiene que:

- Los límites de confianza del intercepto (a) para ttab = 2,16 (n-2; α = 0,05), se encuentran entre -0,01219 y 0,03079, por tanto, incluyen al 0 y cumplen la condición de proporcionalidad.
- Para determinar el grado de significación la texp = 0,93, de esta manera se acepta H0: a=0.

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado para el G-1.

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración para MBr se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de MBr por CG-ECD.

Conc. (mg/L)	R_1	R_2	R_3
0,06	0,00586	0,00593	0,00594
0,08	0,00778	0,00776	0,00783
0,1	0,00983	0,00978	0,00987
0,12	0,01169	0,01174	0,01179
0,14	0,01386	0,01377	0,01391

Leyenda:

R: cociente de respuesta

En la figura 18 se aprecia la curva de calibración para los valores antes mencionados.

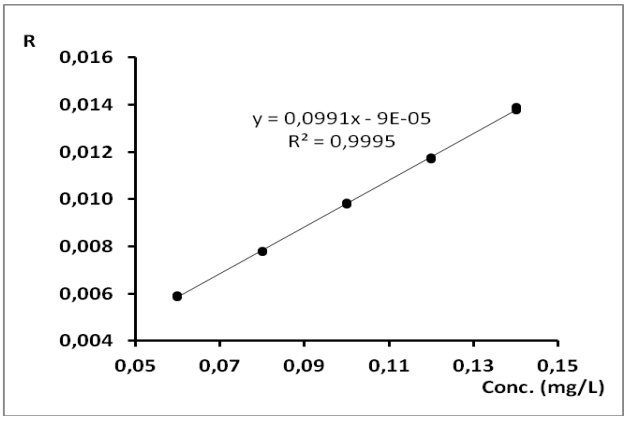

Figura 18. Curva de calibración y ecuación de la recta de MBr por CG-ECD

Del análisis de la *regresión y la linealidad*, se obtiene que:

- El coeficiente de correlación es de 0,9997 con un coeficiente de determinación igual a 0,9995, por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y el cociente de respuesta determinada superior al 99,9 %.
- El CVf = 0,71 %, por tanto, se cumple que CVf ≤ 5 %, lo que significa que existe linealidad en los datos obtenidos.
- La pendiente (b) es de 0,0991 y la varianza de la pendiente (Sb2) es de 3,78206*10-7, por lo que el método posee una buena sensibilidad.
- La desviación estándar de la pendiente (Sb) es de 0,00061 y la desviación estándar relativa (Sb rel. %) es igual a 0,62 % (≤ 2 %).
- Los límites de confianza para ttab = 2,16, con n-2 grados de libertad y α = 0,05, están entre 0,097772 y 0,100428.
- Para determinar el grado de significación la texp = 161,14, de esta manera se acepta H1: b≠0, por lo que existe regresión, la probabilidad de que b ≠ 0 es superior al 95 %.

Del análisis de la *proporcionalidad*, se obtiene que:

- Los límites de confianza del intercepto (a) para ttab = 2,16 (n-2; α = 0,05), están entre -0,00023 y 0,00005, por tanto, incluyen al 0 y cumplen la condición de proporcionalidad.
- Para determinar el grado de significación la texp = 1,40821, de esta manera se acepta H0: a=0.

Los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado para el MBr.

4.2.4. Precisión

4.2.4.1. Repetibilidad instrumental

Los resultados obtenidos al inyectar 6 veces de manera consecutiva la disolución con 10 mg/L de G-1 y una disolución con 0,1 mg/L de MBr se encuentran en la tabla 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de la repetibilidad instrumental para G-1.

Inyecciones	**Cociente de Respuesta**	**Parámetros estadísticos**
1	1,17596	
2	1,17600	
3	1,17680	**R_m** = 1,17615
4	1,17826	**S** = 0,00218
5	1,17778	**CV(%)** = 0,19
6	1,17212	

Tabla 6. Resultados de la repetibilidad instrumental para MBr.

Inyecciones	**Cociente de Respuesta**	**Parámetros estadísticos**
1	0,00999	
2	0,01002	
3	0,01003	**R_m =** 0,01004
4	0,01004	**S =** $3{,}873*10^{-5}$
5	0,01008	**CV(%)** = 0,39
6	0,01010	

La variabilidad de la respuesta, expresada como coeficiente de variación es menor del 1 % en ambos casos, con una adecuada correspondencia entre las respuestas obtenidas para las inyecciones repetidas. Dicho resultado demostró que con este procedimiento es posible

minimizar los errores potenciales asociados a la inyección de las muestras y con ello conseguir la precisión instrumental requerida. En consecuencia, para todas las determinaciones realizadas en este trabajo, se sigue el procedimiento de inyectar cada muestra por duplicado y utilizar para los cálculos el valor medio de la respuesta para ambas inyecciones.

4.2.4.2. Repetibilidad del método

Los valores experimentales obtenidos en el estudio de repetibilidad del método para G-1 y MBr se muestran en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7. Resultados de la repetibilidad del método para G-1.

Concentración: 8 mg/L		
Cociente de respuesta (R)	**Concentración de G-1 (mg/L) (X)**	**Parámetros estadísticos (X)**
0,96505	8,07901	$\mathbf{X_m}$ = 8,07315
0,97234	8.14062	**S** = 0,07059
0,95568	7,99982	**CV(%)** = 0,87
Concentración: 10 mg/L		
1,20875	10,13903	$\mathbf{X_m}$ = 10,05816
1,18616	9,94812	**S** = 0,09874
1,20263	10,08733	**CV(%)** = 0,98
Concentración: 12 mg/L		
1,42854	11,99694	$\mathbf{X_m}$ = 11,91736
1,42038	11,92802	**S** = 0,08541
1,40845	11,82713	**CV(%)** = 0,72

Tabla 8. Resultados de la repetibilidad del método para MBr.

Concentración: 0,06 mg/L		
Cociente de respuesta (R)	**Concentración de G-1 (mg/L) (X)**	**Parámetros estadísticos (X)**
0,00587	0,06019	$\mathbf{X_m}$ = 0,06020
0,00585	0,05990	**S** = 0,00031
0,00591	0,06052	**CV(%)** = 0,52
Concentración: 0,10 mg/L		
0,00984	0,10023	$\mathbf{X_m}$ = 0,10060
0,00982	0,10004	**S** = 0,00080
0,00987	0,10151	**CV(%)** = 0,80
Concentración: 0,14 mg/L		
0,01388	0,14096	$\mathbf{X_m}$ = 0,14041
0,01384	0,14055	**S** = 0,00063
0,01376	0,13973	**CV(%)** = 0,45

En ambos casos el valor del coeficiente de variación es menor que 2 %, lo cual evidencia que el método de ensayo es repetible.

4.2.4.3. Precisión intermedia

Los valores experimentales obtenidos en el estudio de precisión intermedia así como los resultados del análisis de varianza multifactorial para analizar la influencia de los factores concentración, analista y día en la variabilidad de los resultados para G-1 y MBr se muestran en las tablas 9, 10, 11 y 12.

Tabla 9. Resultados de la precisión intermedia para G-1.

		Analista 1			Analista 2		
		Concentraciones mg/L			Concentraciones mg/L		
Día	Réplica	8	10	12	8	10	12
		Concentraciones Calculadas			Concentraciones Calculadas		
1	1	7,95891	9,91618	12,07203	7,91193	10,14676	11,87781
	2	7,93194	9,95635	11,89443	7,91885	10,08626	12,09196
X_m		7,94543	9,93627	11,98323	7,91539	10,11651	11,98489
S		0,01907	0,02840	0,12559	0,00489	0,04278	0,15143
CV (%)		0,24	0,28	1,05	0,06	0,42	1,26
Día	Réplica	Concentraciones Calculadas			Concentraciones Calculadas		
2	1	7,99982	10,13903	11,99694	7,89120	10,08826	11,92627
	2	8,07901	9,94812	11,92802	7,91367	9,98306	12,00907
X_m		8,03941	10,04357	11,96248	7,90243	10,03566	11,96767
S		0,05600	0,13499	0,04873	0,01589	0,07439	0,05855
CV (%)		0,70	1,34	0,41	0,20	0,74	0,49
Día	Réplica	Concentraciones Calculadas			Concentraciones Calculadas		
3	1	8,09126	9,90390	11,92627	7,94419	10,07835	11,90526
	2	7,92384	10,13740	11,96968	7,85186	9,98177	12,00907
X_m		8,00755	10,02065	11,94797	7,89803	10,03006	11,95717
S		0,11839	0,16511	0,03070	0,06529	0,06829	0,07341
CV (%)		1,48	1,65	0,26	0,83	0,68	0,61
Total							
X_m		7,99746	10,00017	11,96456	7,90528	10,06074	11,96991
S		0,07301	0,10869	0,06379	0,03119	0,06540	0,08066
CV (%)		0,91	1,09	0,53	0,39	0,65	0,67

En todos los casos, tanto en los diferentes días, como a las diferentes concentraciones y en los diferentes analistas se obtienen valores de coeficiente de variación menores de 2 % y el CV total de la precisión intermedia es para cada concentración inferior al doble del CV de la repetibilidad del método.

Tabla 10. Precisión intermedia. Resultado del análisis de varianza para G-1.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
MAIN EFFECTS					
A:analista	0,00614091	1	0,00614091	0,00	0,9725
B:conc	30,4502	2	15,2251	3,04	0,0761
C:día	1,87245	2	0,936227	0,19	0,8314
D:réplica	1,03891	1	1,03891	0,21	0,6550
INTERACTIONS					
AB	9,13953	2	4,56977	0,91	0,4216
AC	8,96864	2	4,48432	0,89	0,4281
AD	0,310653	1	0,310653	0,06	0,8065
BC	30,4485	4	7,61211	1,52	0,2438
BD	8,55424	2	4,27712	0,85	0,4444
CD	0,480784	2	0,240392	0,05	0,9533
RESIDUAL	80,1764	16	5,01103		
TOTAL (CORR.)	171,446	35			

Como los valores de p, de las interacciones, son mayores que 0,05, no existe influencia de los factores concentración, analista y día en la variabilidad de la respuesta en el método de ensayo.

Tabla 11. Resultados de la precisión intermedia para MBr.

		Analista 1			**Analista 2**		
		Concentraciones mg/L			**Concentraciones mg/L**		
Día	**Réplica**	**0,06**	**0,1**	**0,14**	**0,06**	**0,1**	**0,14**
		Concentraciones Calculadas			**Concentraciones Calculadas**		
1	**1**	0,06019	0,10004	0,14055	0,06035	0,09974	0,13984
	2	0,05990	0,10023	0,14096	0,05989	0,09950	0,13982
X_m		0,06004	0,10014	0,14076	0,06012	0,09962	0,13983
S		0,00021	0,00014	0,00029	0,00032	0,00017	0,00001
CV %		0,34	0,14	0,21	0,53	0,17	0,01
Día	**Réplica**	**Concentraciones Calculadas**			**Concentraciones Calculadas**		
2	**1**	0,06081	0,09956	0,13973	0,06072	0,09994	0,14096
	2	0,06059	0,09957	0,14003	0,06097	0,09994	0,14121
X		0,06070	0,09956	0,13988	0,06084	0,09994	0,14108
S		0,00016	0,00001	0,00022	0,00018	0,000003	0,00017
CV %		0,26	0,01	0,15	0,29	0,003	0,12
Día	**Réplica**	**Concentraciones Calculadas**			**Concentraciones Calculadas**		
3	**1**	0,06090	0,10023	0,14121	0,06053	0,09999	0,14057
	2	0,06080	0,10069	0,14137	0,06090	0,09995	0,14017
X_m		0,06085	0,10046	0,14129	0,06072	0,09997	0,14037
S		0,00007	0,00032	0,00011	0,00026	0,00002	0,00028
CV %		0,12	0,32	0,08	0,43	0,02	0,20
Total							
X_m		0,06053	0,10005	0,14064	0,06056	0,09984	0,14043
S		0,00040	0,00044	0,00066	0,00040	0,00019	0,00058
CV %		0,67	0,44	0,47	0,66	0,19	0,41

En todos los casos, tanto en los diferentes días, como a las diferentes concentraciones y en los diferentes analistas se obtienen valores de coeficiente de variación menores de 2 % y el CV total de la precisión intermedia es para cada concentración inferior al doble del CV de la repetibilidad del método.

Tabla 12. Precisión intermedia. Resultado del análisis de varianza para MBr.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
MAIN EFFECTS					
A:analista	0,0473995	1	0,0473995	0,02	0,8976
B:conc	34,7388	2	17,3694	6,27	0,0098
C:dia	5,24278	2	2,62139	0,95	0,4090
D:replica	0,000229486	1	0,00022948	0,00	0,9929
INTERACTIONS					
AB	5,86568	2	2,93284	1,06	0,3701
AC	0,427812	2	0,213906	0,08	0,9261
AD	0,314772	1	0,314772	0,11	0,7405
BC	5,91589	4	1,47897	0,53	0,7130
BD	9,1708	2	4,5854	1,65	0,2222
CD	3,27731	2	1,63865	0,59	0,5653
RESIDUAL	44,3405	16	2,77128		
TOTAL (CORR.)	109,342	35			

Como los valores de p, de las interacciones, son mayores que 0,05, no existe influencia de los factores concentración, analista y día en la variabilidad de la respuesta en el método de ensayo.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores obtenidos para la repetibilidad y precisión intermedia se concluye que este método de ensayo es preciso en las condiciones estudiadas.

4.2.5. Exactitud

Los resultados de la determinación de la exactitud en base al por ciento de recuperación de G-1 y MBr y los resultados del análisis de varianza unifactorial para ambos casos se encuentran en las tablas 13, 14, 15 y 16 y en las figuras 19 y 20.

Tabla 13. Resultados de la exactitud para G-1, a tres niveles de concentración.

Conc. (mg/L)	**8**	**10**	**12**
Cociente de Respuesta	0,965047	1,208747	1,42854
	0,972336	1,186163	1,420385
	0,955678	1,202630	1,408449
Conc. $_{calculada}$ (mg/L)	8,07901	10,13903	11,99694
	8,14062	9,94812	11,92802
	7,99982	10,08733	11,82713
Conc. $_{media\ calculada}$ (mg/L)	8,07315	10,05816	11,91736
S	0,07059	0,09874	0,08541
CV (%)	0,87433	0,98169	0,71665
t_{tab}	4,303		
t_{exp}	1,79498	1,02019	1,67591
% recuperación	100,99	101,39	99,97
	101,76	99,48	99,40
	100,00	100,87	98,56

A los tres niveles de concentración se obtuvieron por cientos de recuperación entre 98 % y 102 % (criterio aceptado para métodos cromatográficos) y en los tres casos las t_{exp} son menores que la t_{tab} para n-1 grados de libertad y p = 0,05, lo cual significa que los valores obtenidos a las tres concentraciones no son estadísticamente diferente de los valores teóricos.

Tabla 14. Exactitud. Análisis de varianza unifactorial para G-1.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
Between groups	4.30762	2	2.15381	2.86	0.1339
Within groups	4.51327	6	0.752211		
Total (Corr.)	8.82089	8			

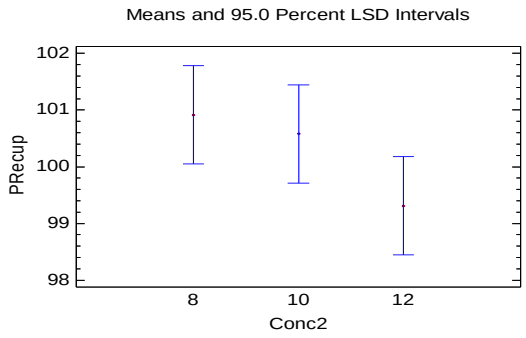

Figura 19. Excatitud. Ploteo de las concentraciones contra los por cientos de recuperación para G-1

Como el valor de p es mayor que 0,05 no existe influencia del factor concentración en los valores de por cientos de recuperación, lo cual se observa tambien en la figura 19 donde el intervalo para el nivel de concentracion esta incluido dentro de los otros dos.

Tabla 15. Resultados de la exactitud para MBr, a tres niveles de concentración.

Conc. (mg/L)	**0,06**	**0,1**	**0,14**
Cociente de Respuesta	0,005875	0,009843	0,013879
	0,005846	0,009824	0,013838
	0,005908	0,009819	0,013757
Conc. $_{calculada}$ (mg/L)	0,06019	0,10023	0,14096
	0,05990	0,10004	0,14055
	0,06052	0,09999	0,13973
Conc. $_{media\ calculada}$ (mg/L)	0,06020	0,10009	0,14041
S	0,00031	0,00013	0,00063
CV (%)	0,52	0,13	0,45
t_{tab}	4,303		
t_{exp}	1,11647	1,11647	1,11647
% recuperación	100,31	100,23	100,69
	99,83	100,04	100,39
	100,87	99,99	99,81

A los tres niveles de concentración se obtuvieron por cientos de recuperación entre 98 % y 102 % (criterio aceptado para métodos cromatográficos) y en los tres casos las t_{exp} son menores que la t_{tab} para n-1 grados de libertad y p = 0,05, lo cual significa que los valores obtenidos a las tres concentraciones no son estadísticamente diferente de los valores teóricos.

Tabla 16. Exactitud. Análisis de varianza unifactorial para MBr.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
Between groups	0,1082	2	0,0541	0,33	0,7291
Within groups	0,9742	6	0,162367		
Total (Corr.)	1,0824	8			

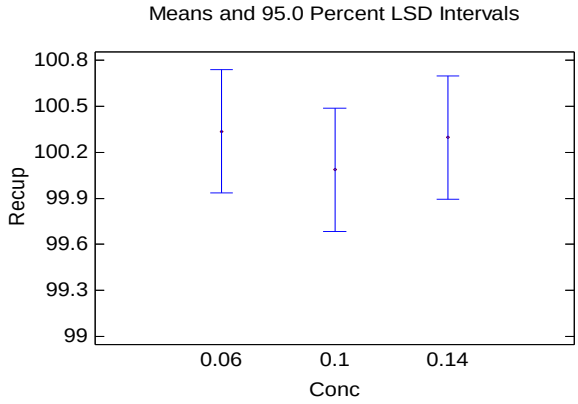

Figura 20. Exatitud. Ploteo de las concentraciones contra los por cientos de recuperación para MBr

Como el valor de p es mayor que 0,05 no existe influencia del factor concentración en los valores de por cientos de recuperación, lo cual se observa tambien en la figura 20 donde el intervalo para el nivel de concentracion está incluido dentro de los otros dos.

Todos los ensayos y análisis estadísticos realizados indican que el método de ensayo tiene la exactitud requerida.

4.2.6 Límites de detección y cuantificación (solo para MBr)

El resultado para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación es el siguiente:

- El límite de detección es 0,0006 mg/L.

- El límite de cuantificación es 0,002 mg/L.

Por lo que se puede cuantificar la impureza MBr en el IFA G-1 cuando se encuentre por encima de un 0,02 %.

4.3 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DEL RESULTADO DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE G-1 Y MBr EN LOTES DE IFA G-1 POR GC-ECD

Para el cálculo de la incertidumbre del resultado de esta técnica se analizó un lote de G-1, en las tablas 15 y 16 se pueden observar los resultados obtenidos para la cuantificación de la pureza de G-1 y para la determinación del contenido de MBr, respectivamente en el lote analizado.

Tabla 17. Resultados para la pureza del G-1.

	Peso	Área del pico		R	R_{media}	%
		Producto	SI			
Material de Referencia	10,057	130,385	123,124	1,05897	1,059	
		133,348	125,874	1,05938		
		133,776	126,325	1,05998		
Muestra	9,793	126,624	123,336	1,02666	1,024	99,18
		125,676	123,013	1,02151		
	9,801	123,195	119,949	1,02706	1,026	99,23
		123,932	121,014	1,02483		
% pureza del Material de Referencia: 99,87 % pérdidas por desecación: 0,01				$\%_{medio}$: 99,21; DS: 0,0409; CV%: 0,04 % pureza en base a materia seca: 99,22		

Tabla 18. Resultados para la determinación del contenido de MBr.

	Peso	Área del pico		R	R_{media}	%
		Producto	SI			
Material de Referencia	10,002	65,738	122,54	0,53646	0,537	
		66,063	123,185	0,53629		
		64,269	119,251	0,53893		
Muestra	9,793	0,095	123,336	0,00077	0,001	0,15
		0,094	123,013	0,00076		
	9,801	0,091	119,949	0,00075	0,001	0,13
		0,079	121,014	0,00065		
% pureza del Material de Referencia: 99,64 % pérdidas por desecación: 0,01				$\%_{medio}$: 0,14; DS: 0.0083; CV%: 5,96 % MBr en base a materia seca: 0,14		

4.3.1 Expresión matemática de la magnitud que se mide. Modelo matemático

El modelo matemático que se utilizó fue la fórmula (4) descrita en el acápite 3.4.

4.3.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre. Diagrama de causa - efecto (Espina de Pescado)

A partir del modelo matemático y con los resultados de la tormenta de ideas, que se desarrolló con el criterio de diferentes expertos, se confeccionó el diagrama *causa-efecto* que se observa en la figura 21, estableciéndose las causas principales, secundarias y hasta terciarias que pueden influir en el resultado del por ciento de G-1 y MBr en base a materia seca en lotes de IFA G-1(% X_{ims}).

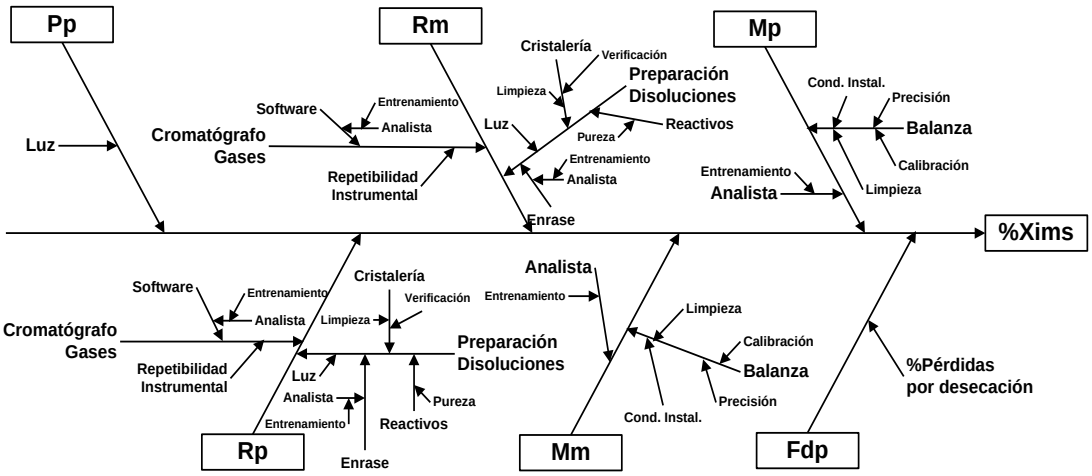

Figura 21. Diagrama Causa-Efecto

Las fuentes que aportan incertidumbre al cociente de respuesta de la muestra (Rm) y al cociente de respuesta de los MR (Rp) son las debidas a la preparación de las disoluciones (enrase, cristalería y reactivos) y al cromatógrafo de gases (repetibilidad instrumental), todas estas se pueden calcular, las demás no se pueden calcular, pero hay que tenerlas identificadas y controladas para minimizar su efecto. Las fuentes de incertidumbre debidas a la preparación de las disoluciones influyen directamente en las inyecciones y estas en la respuesta (Rm y Rp), por tanto, lo que se calcula es la incertidumbre de las inyecciones de la muestra y de los

MR. Después se combina con la incertidumbre del cromatógrafo de gases y se obtiene la incertidumbre de Rm y Rp.

La incertidumbre asociada a la masa de la muestra (Mm) y del MR (Mp) es estimada utilizando los datos aportados en el certificado de calibración de la balanza microanalítica (incertidumbre reportada en la calibración), asumiendo una distribución normal o de Gauss.

La incertidumbre asociada al factor del promedio de pérdidas por desecación (Fdp), se calcula con la desviación estándar de las determinaciones de este parámetro (% pérdidas por desecación) aplicando la ecuación matemática (8) descrita en el acápite 3.4.1.3, utilizando una "t de student" con $\alpha = 0,05$ y n-1 grados de libertad.

La incertidumbre asociada a la pureza de los MR (Pp) es estimada por la pureza reportada en el certificado de cada MR, los dos MR utilizados en este trabajo no se encuentran certificados, por tanto, no se conoce la incertidumbre, esta se calculó asumiendo una distribución rectangular. La influencia de la luz no se puede calcular, pero se minimiza su influencia, ya que los MR se protegen de la luz.

4.3.3. Determinación y evaluación de los componentes de incertidumbres

Las componentes de incertidumbres se determinaron teniendo en cuenta los dos criterios de incertidumbres "Tipo A" y "Tipo B".

Incertidumbres "Tipo A"

Para determinar estas incertidumbres, se utilizó una "t de student" con $\alpha = 0,05$ y n-1 grados de libertad y la expresión matemática (8) descrita en el acápite 3.4.1.3, los resultados se exponen en la tabla 19.

Tabla 19. Valor de las incertidumbres "*tipo A"*.

Componente de incertidumbre	**Criterio para el cálculo**	**Valores de incertidumbre (u_i)**
Inyecciones de la muestra de ensayo de G-1	n = 4	uI_{meG-1} = 0,0041
Inyecciones de la muestra de ensayo de G-1 analizando MBr.		uI_{meMBr} = 0,000089
Inyecciones de G-1 MR	n = 3	uI_{G-1} = 0,0094
Inyecciones de MBr MR		uI_{MBr} =0,0131
Factor del porciento de pérdidas por desecación		u%Fpd = 0,00025
Cromatógrafo de gases para G-1	n = 6	uCG_{G-1} = 0,0023
Cromatógrafo de gases para MBr		uCG_{MBr} = 0,000041

Al combinar las incertidumbres de las inyecciones de la muestra y los MR con las del cromatógrafo de gases utilizando las fórmulas:

$$ucRm_i = \sqrt{(uc\,\mathrm{Im}e_i)^2 + (ucCG_i)^2} \quad (13) \quad \text{y} \quad ucRp_i = \sqrt{(ucIp_i)^2 + (ucCG_i)^2} \quad (14)$$

Donde:

El subíndice "i" se refiere a G-1 o MBr.

ucRm: incertidumbre del cociente de respuesta de la muestra.

ucImei: incertidumbre de las inyecciones de la muestra.

ucCGi: incertidumbre del cromatógrafo de gases.

ucRp: incertidumbre del cociente de respuesta del MR.

ucIp: incertidumbre de las inyecciones del MR.

Se obtuvieron los valores de incertidumbre asociados a Rm y a Rp que se exponen en la tabla 20.

Tabla 20. Valores de las incertidumbres para Rm y Rp.

Componente de incertidumbre	Valores de incertidumbre (u_i)
Cociente de respuesta (Rm) de la muestra de ensayo de G-1	$uR_{meG-1} = 0{,}0047$
Cociente de respuesta (Rm) de la muestra de ensayo de G-1 analizando MBr	$uR_{meMBr} = 0{,}000098$
Cociente de respuesta (Rp) de G-1 MR	$uR_{G-1} = 0{,}0061$
Cociente de respuesta (Rp) de MBr MR	$uR_{MBr} = 0{,}0037$

Incertidumbres "Tipo B"

A continuación, en la tabla 21, se pueden apreciar los valores de incertidumbres evaluados por las distribuciones de probabilidad.

Tabla 21. Valor de las incertidumbres *"Tipo B"*.

Componente de incertidumbre	Criterio para el cálculo	Fórmula	Valores de incertidumbre (u)
G-1 MR	Pureza: 99,87 %	Rectangular	$uP_{G-1} = 0{,}075$ %
MBr MR	Pureza: 99,64 %		$uP_{MBr} = 0{,}208$ %
Balanza microanalítica	U = 0,0002 µg, k = 2	Normal o de Gauss	uBma = 0,0001 µg

4.3.4. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada

Para hallar la incertidumbre estándar combinada se aplicaron las reglas para combinar las Incertidumbres Típicas [Colectivo de autores, Folleto 2003], en este caso el modelo de multiplicación y división y se aplicó en el modelo matemático y se obtuvo la siguiente ecuación general para el cálculo de la incertidumbre combinada:

$$uc\%X_{ims} = \%X_{ims}\sqrt{\left(\frac{uRm_i}{\overline{Rm_i}}\right)^2 + 2\cdot\left(\frac{uMp_i}{Mp_i}\right)^2 + \left(\frac{uPp_i}{Pp_i}\right)^2 + \left(\frac{uRp_i}{\overline{Rp_i}}\right)^2 + \left(\frac{u\%Fpd}{\overline{\%Fpd}}\right)^2} \quad (15)$$

Donde:

El subíndice "i" se refiere a G-1 o MBr.

uc%Xms: incertidumbre combinada del por ciento de G-1 o MBr en base a materia seca, según corresponda.

%Xms: por ciento de G-1 o MBr en base a materia seca, según corresponda.

uRm: incertidumbre que aporta el cociente de respuesta de la muestra.

uMp: incertidumbre que aporta la Masa del MR.

uPp: incertidumbre que aporta la Pureza del MR.

uRp: incertidumbre que aporta el cociente de respuesta del MR.

u%Fpd: incertidumbre que aporta el Factor de por ciento de pérdidas por desecación.

Rm: Cociente de respuesta promedio de la muestra.

Mp: Masa del MR.

Pp: Por ciento de pureza del MR.

Rp: Cociente de respuesta promedio del MR.

% Fpd: Promedio del Factor de por ciento de pérdidas por desecación.

La incertidumbre de la masa del MR se multiplica por dos porque esta fuente de incertidumbre se repite, ya que se utiliza la misma balanza para pesar MR y muestra de ensayo, por tanto, se agrupa.

4.3.4.1. Incertidumbre estándar combinada para G-1 y MBr

La incertidumbre estándar combinada se obtiene sustituyendo las componentes de incertidumbre en (15).

La incertidumbre estándar combinada del G-1 ($uc\%G\text{-}1_{ms}$) es: 0,73 % y la incertidumbre estándar combinada del MBr ($uc\%MBr_{ms}$) es: 0,025 %.

En la tabla 22 se presentan los valores de cada una de las componentes de incertidumbre que dieron lugar a la incertidumbre estándar combinara para G-1 y MBr y en la figura 22 se muestra como contribuye cada una de estas componentes a la incertidumbre estándar combinada para G-1 y MBr.

Tabla 22. Componentes de incertidumbre**.**

	Componentes de incertidumbre	Valores de incertidumbre (G-1)	Valores de incertidumbre (MBr)
uPp	Pureza MR	0,075	0,208
uRp	Cociente de respuesta MR	0,0047	0,0037
uRm	Cociente de respuesta Muestra	0,0061	0,000098
uMp	Masa MR	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$
u%Fpd	Factor de porciento de pérdidas por desecación	0,00025	0,00025
$uc\%X_{ims}$	Incertidumbre estándar combinada	0,73	0,025

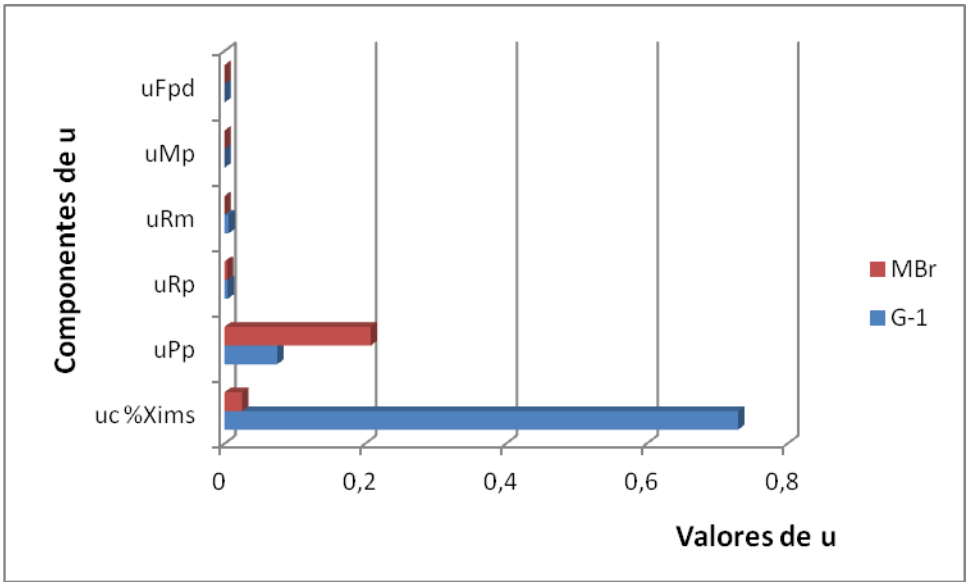

Figura 22. Contribución de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total

Se observa que la incertidumbre debida a la pureza del MR (uPp) es la que tiene mayor contribución a la incertidumbre estándar combinada, tanto para G-1 como para MBr.

Si se requiriese rebajar la incertidumbre de los resultados se debería incidir en el punto que, *a priori*, contribuye más a dicha incertidumbre. En este caso para disminuir la incertidumbre aportada por la pureza de los MR se debería contar con la certificación de estos, la cual consta con el valor de incertidumbre.

4.3.5. Cálculo de la incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida (U) se calculó según la fórmula (10) descrita en 3.4.1.5.

De esta forma se obtiene que la incertidumbre expandida del G-1(U_{G-1}) es: 1,46 % y la incertidumbre expandida del MBr (U_{MBr}) es: 0,05 %, asumiendo un factor de cobertura k = 2 y un 95 % de confianza.

4.3.6. Expresión del resultado de la medición

En el lote de IFA G-1, objeto de estudio, el resultado final de la medición se expresa de la siguiente manera:

- %G-1 = 99,22 ± 1,46 % con k = 2 para un 95 % de confianza.
- %MBr = 0,14 ± 0,05 % con k = 2 para un 95 % de confianza.

5. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica.

La técnica para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica resultó ser específica, lineal en el intervalo de concentraciones de 8 mg/L a 12 mg/L para G-1 y de 0,06 mg/L a 0,14 mg/L para MBr, precisa y exacta; con límite de detección igual a 0,0006 mg/L y límite de cuantificación igual a 0,002 mg/L para MBr.

Se identificaron todas las posibles fuentes de incertidumbre que influyen en la determinación del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 y se agruparon en cinco componentes: pureza del MR, cociente de respuesta del MR, cociente de respuesta de la muestra, masa del MR, factor de por ciento de pérdidas por desecación.

Se calculó la incertidumbre expandida del resultado de la técnica para la determinación simultánea del contenido de G-1 y su impureza MBr en el IFA G-1 por cromatografía de gases con detector de captura electrónica, siendo 1,46 % para G-1 y 0,05 % para MBr, con un factor de cobertura k = 2 y un nivel de confianza de 95 %.

6. RECOMENDACIONES

Certificar los materiales de referencia de G-1 y MBr para contar con el valor de incertidumbre asociado a la pureza de los mismos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre Ortega, L. y col. (2001). Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. España.
2. Alonso, H. (2006). Sistema de Validación para el proceso de Fabricación del Ingrediente Farmacéutico Activo G-1. Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Industrial. Universidad Central de Las Villas.
3. Aromí, D.P., et al. (2001) ICS NC: Guía para la validación de métodos químicos de ensayos. 1ra ed., Tercera Revisión, Oficina Nacional de Normalización, Ciudad de la Habana, Cuba.
4. Arriola Lucrecia, (2012).Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos. (on line). Disponible en URL: http://www.usac.edu.gt/archivos/econtCurso_Validacion_de_Metodos_Analiticos_con_formulas.pdf. (Consultado, 4 de junio 2013).
5. Arvizu R., Valle E., Reyes A. (2008) Estimación de Incertidumbre en la Medición de Impurezas Santiago de Querétaro, México. (on line). Disponible en URL: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M1/SM2008-M114-1076.pdf. (Consultado, 13 de noviembre 2013).
6. Bravo, L. y Col. (1999). Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Revista AFINIDAD, LVI, 479, España.
7. Calpena Campnamy, A.C. (1990). Validación de los métodos analíticos. Barcelona: Universidad de Barcelona
8. Calvo A, Morales S. (2012). Determinación de Furvina en plasma humano utilizando extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida y Cromatografía de Gases. Revista AFINIDAD, LXIX, 560, 278 – 282. España.
9. Castañedo, N.R. y Gaitán, T.E. Información sobre la manufactura del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003. En: Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N^{o} M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2014.

10. Castiñeira Díaz, M. & González San Miguel, H.M. (2002). Centro de medicamentos 2. La Habana. Editorial Félix Varela.
11. Colectivo de autores Folleto de texto (Noviembre 2003). Incertidumbre de las Mediciones Analíticas. OTN. Villa Clara.
12. Castro, M.; Gascón, S; Pujol, M; Sans, J.M. y Vicente, Ll. (1989) Validación de Métodos Analíticos. Monografía. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Hewlett Packard.
13. CECMED, Regulación 16-2012 Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana, Cuba.
14. CECMED, Regulación No.41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana, Cuba.
15. CECMED, Regulación 37-2012 Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. La Habana, Cuba.
16. Dermofural®, (2014). Ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N^{o} M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba.
17. Dierksmeier, G., (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba.
18. Díaz de Armas, M. (1998). Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad Revista Cubana de Farmacia 1998; 32(2):106-12
19. EURACHEM/CITAC. (2000). Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition, Final Draft: April 2000.
20. Elizabeth Prichard, (1997). Quality in the analytical chemistry laboratory.
21. Evelyn de F. (2008).Incertidumbre de Medida en la Determinación de la Pureza de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPAS) por Cromatografía a Gas con Detector por Ionización de Llama. México. (On line). Disponible en URL: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M203-1023.pdf. (Consultado, 11 de noviembre 2013).
22. Food and Drug Administration. (2013). Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. http://www.fda.gov

23. González, O., Ramírez, T., Silveira, E. A., Herrada, N. & Machado, R. (1993) I. Estandarización de la técnica para la evaluación "in vitro" de la actividad antifúngica del producto G-1 frente a los hongos dermatofitos. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.
24. González, O., Ramírez, T., Silveira, E.A., Medina, R., Delgado, M.S., Castañedo, N.R. & Col. (1993) II. Mínima Concentración Inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género Candida. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.
25. González, O., Silveira, E., Castañedo, N., Magariño, O. y Gómez, R. (1993) III. Actividad antimicrobiana del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.
26. González, O., Silveira, E. A., Reyes, T., Hidalgo, P. y Chirino-Trejo, J. (1993) IV. Actividad antifúngica in vitro del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias enteropatógenas. En: Queratofural®, ungüento de uso oftálmico veterinario. Registro Nacional de Medicamentos de Uso Veterinario. N° 211. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba, 1993. Renovación 2001.
27. Guía de validación de métodos analíticos. (On line). Disponible en URL: http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf. (Consultado, 4 de junio 2013).
28. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). (2012). (On line). Disponible en URL: http://www.laboratoriometrologico.com; http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/VIGENTES_ENERO2013/Guias_Tecnicas/ANALITICA CG CL v02_.pdf. (Consultado, 4 de junio 2013)

29. Guía técnica de validación. (On line). Disponible en URL: (http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/ Guía técnica de validación). (Consultado, 4 de junio 2013)
30. GUM (2008) BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML "Guide to the expression of uncertainty in measurement", ISO Geneva
31. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). International conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology.
32. Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S. (1993) I. Validación de la técnica de determinación por cromatografía líquida de alta eficacia del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control En: Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N^{o} M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2007.
33. Jiménez, E.; Bravo. L.; Morales, S. (1993) II. Validación de la técnica de determinación por cromatografía gaseosa del contenido de 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano. Método de control En: Dermofural®, ungüento de uso tópico. Registro de Medicamentos de Uso Humano. N^{o} M-07-020-D01. CECMED. Ministerio de Salud Pública, La Habana, Cuba, 2014.
34. Ministerio de Educación Superior, (2007) Selección de tablas estadísticas. La Habana. Editorial Felix Varela.
35. Maroto, A y col. (2002). Cálculo de incertidumbre en medidas químicas: análisis cromatográfico. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica.Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili. Pl. Imperial Tàrraco, 1. 43005-Tarragona. España. (On line). Disponible en URL: http://rodi.urv.es/quimio/general/incert_met_crom.pdf(Consultado, 28 de octubre 2013)
36. NC TS-368, (2010). Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos. Oficina Nacional de Normalización. La Habana.
37. NC ISO 9000:2005. Sistemas de Gestión de la Calidad. Fundamentos y Vocabulario.

38. NC ISO/IEC 17025:2006 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración.
39. NC ISO/TS 21748:2008 Lineamientos para el uso de los estimados de repetibilidad, reproducibilidad y veracidad en la evaluación de la incertidumbre de la medición.
40. NC TS 367:2008 Guía para la estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en análisis químico.
41. Ramos, T. (2008). Determinación del contenido de G-1 en el Vitrofural: validación de la técnica y mejoramiento de los resultados. Tesis de maestría. Departamento de Licenciatura en Química. Universidad Central de las Villas.
42. Rubinson, K.A. & Rubinson, J.F. (2001). Análisis Instrumental., Madrid. Pearson Educación, S.A.
43. Cromatografía de gases tema 3 (On line). Disponible en URL: http://www. rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf revisado 15-febrero-2012. (Consultado, 6 de junio 2013)
44. Sánchez Maroto Alicia (2002). Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina. Tesis Doctoral, Universitat Rovira I Virgili. Tarragona. (On line). Disponible en URL: http://rodi.urv.es/quimio/general/incert_met_crom.pdf(Consultado, 28 de octubre 2013)
45. Skoog, A.D., (1997) Análisis instrumental. McGrau-Hill 4ta edición.
46. Valdés, T. (2008). Estimación de la Incertidumbre debida al efecto de matriz mediante clasificación de materiales. Tesis de maestría. Departamento de Licenciatura en Química. Universidad Central de las Villas.
47. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" (On line). Disponible en URL: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/GuíaTécnicadevalidacióndeMétodosydeterminacióndelaincertidumbredelamedición_1.pdf. (Consultado, 4 de junio 2013)
48. BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML (2012). The international vocabulary of metrology—basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edn. JCGM 200:2012. http://www.bipm.org/vim

49. Willard, H., (1991) Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo editorial Ibero América.
50. United State Pharmacopoeia 35:2012 NF 30.
51. Zunica Ramajo, L.R.; Romer, R. (1988). Un modelo para el estudio de efectos sobre la dispersión en ausencia de replicaciones. Estadística española, 1 16.