
VALIDACIÓ DE MÈTODES ANALÍTICS SEGONS ESTÀNDARDS DE FARMÀCIA

ANNA VENTURA ARGELAGA

Entitat col·laboradora: Clariant Ibérica Producción S.A.

Tutor acadèmic: Dr. Joan Carles Ronda Bargalló

Tutora professional: Dra. Ariadna Campos Carrasco

Treball de Fi de Grau

Grau de Química

Continguts

1.	ABSTRACT	1
2.	ABAST	2
3.	OBJECTIU.....	2
4.	INTRODUCCIÓ	3
4.1.	Planta AMPS	3
4.2.	Procediment de la síntesi a planta	3
4.3.	Matèries primes.....	3
5.	ANÀLISI DE PRODUCTES COSMÈTICS	5
6.	VALIDACIÓ	5
6.1.	Definició	5
6.2.	Casos en que s'ha de validar	5
6.3.	Normes de validació	5
6.4.	Requisits analítics	6
6.5.	Paràmetres de validació.....	7
a)	Linealitat	7
b)	Límits	9
c)	Precisió	9
d)	Exactitud	11
e)	Robustesa	12
7.	MÈTODE ANALÍTIC.....	13
7.1.	Objectiu i camp d'aplicació	13
7.2.	Fonament	13
7.3.	Instrumental	13
7.4.	Reactius	13
7.5.	Condicions cromatogràfiques.....	14
7.6.	Procediment analític	14
7.7.	Observacions	16
8.	PART EXPERIMENTAL	16
8.1.	Linealitat del mètode	16
8.2.	Límit de detecció i quantificació del mètode	16
8.3.	Precisió	17

8.4.	Precisió intermèdia del mètode	17
8.5.	Exactitud del mètode	18
8.6.	Robustesa del mètode	18
9.	RESULTATS I DISCUSSIÓ DE RESULTATS	19
9.1.	Linealitat del mètode	19
9.2.	Límit de detecció i quantificació del mètode	22
9.3.	Precisió	24
9.4.	Precisió intermèdia del mètode	26
9.5.	Exactitud del mètode	29
9.6.	Robustesa del mètode	31
10.	MILLORA DEL MÈTODE	36
10.1.	Estudi de l'efecte de l'addició de NaOH en la preparació de la mostra.....	36
11.	CONCLUSIONS	39
12.	ANNEXOS	41
12.1.	Criteri per considerar una mostra apta per ser punxada en l'HPLC	41
12.2.	Cromatograma obtingut d'una mostra real	41
12.3.	Taula de <i>Youden Steiner</i>	42
12.4.	Perillositat dels reactius utilitzats	43
13.	BIBLIOGRAFIA.....	45

1. ABSTRACT

English

The main objective of this project is the AC-TH501 method validation, an analytical method which the presence of free ATBS is determined in personal care products, made in the AMPS plant of the company Clariant Ibérica S.A.

The validation was done considering that it is a non-normalized established method, so different parameters were studied. These are the linearity, the limits of detection and quantification, accuracy and robustness.

Each of these parameters was validated with statistical tests and studies, some of which were complemented by visual evidence, such as robustness. The acceptance criteria used in each case was established by the company's quality supervisor, knowing which was the main purpose of the method.

The AC-TH501 method, looking at the results obtained during the validation process and the established acceptance criteria, is considered valid to be used in the analysis of these same products but for pharmacological purposes, as excipients.

Català

L'objectiu principal d'aquest projecte consisteix en la validació del mètode AC-TH501, mètode analític amb el qual s'estudia la presència d'ATBS lliure en productes de *personal care*, fabricats a la planta AMPS de la companyia Clariant Ibérica S.A.

La validació es va fer tenint en compte que es tracta d'un mètode establert no normalitzat, de manera que es van estudiar diferents paràmetres. Aquests són la linealitat, els límits de detecció i quantificació, la precisió, l'exactitud i la robustesa.

Cadascun dels paràmetres es va validar amb testos i estudis estadístics, alguns dels quals es van complementar amb evidències visuals, com n'és el cas de la robustesa. El criteri d'acceptació que es va utilitzar en cada cas va ser establert per la responsable de qualitat de l'empresa, tenint en compte la finalitat principal del mètode.

El mètode AC-TH501, observant els resultats obtinguts al llarg del procés de validació i els criteris d'acceptació establerts, es considera vàlid per ser utilitzat en l'anàlisi d'aquests mateixos productes però amb finalitats farmacològiques, com a excipients.

2. ABAST

Validació del mètode AC-TH501.

3. OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquest projecte és la validació d'un mètode analític per cromatografia de líquids segons estàndards de farmàcia.

Actualment el mètode en estudi, l'AC-TH501, és utilitzat per a la determinació d'ATBS lliure, àcid 2-acrilamido-2-metil-1-propansulfònic, en productes de la família dels *Aristoflex*[®] i *Hostacerin*[®] en un rang d'1 – 900ppm d'ATBS.

Aquests productes són modificadors reològics destinats a la fabricació de productes de cosmètica com a excipients, els quals es volen, també, comercialitzar com a excipients en productes farmacològics.

4. INTRODUCCIÓ

4.1. Planta AMPS

La planta AMPS consta de dues línies de producció, una destinada a productes amb finalitats petrolíferes, i l'altra destinada a productes de cosmètica.

El disseny de la planta permet la producció d'ambdós línies sense cap risc d'entrecreuament de l'una amb l'altra, fet que elimina la possible contaminació dels productes per efectes externs.

Els productes d'interès que s'analitzen amb el mètode en estudi són tots els que es produeixen en la línia de cosmètica. S'han escollit tres dels productes, d'entre tots els produïts, com a representació del total per a la validació, ja que són els que es produeixen en major quantitat a la planta. Aquests pertanyen a les famílies *Aristoflex*® i *Hostacerin*® i són els següents:

- *Aristoflex AVC*®
- *Aristoflex AVS*®
- *Hostacerin AMPS*®

4.2. Procediment de la síntesi a planta

El procés d'obtenció del producte a la planta consta de dues etapes diferenciades, les quals es caracteritzen per ser reaccions en suspensió. En la primera etapa es dona una reacció de neutralització de l'ATBS, monòmer de partença. En la segona etapa es du a terme una reacció de co-polimerització entre l'ATBS i altres monòmers vinílics.

4.3. Matèries primes

Per tal d'obtenir el producte final intervenen diferents matèries primes amb la seva funció corresponent en la cadena de producció.

a) Monòmer de partença – ATBS

L'àcid 2-acrilamido-2-metil-propansulfònic és un monòmer d'àcid acrílic sulfònic, el qual presenta, en la seva estructura, un doble enllaç terminal que li proporciona la capacitat de formar cadenes polimèriques; un grup sulfònic, el qual aporta estabilitat en un ampli rang de pHs i un grup amida secundària, que està unida a un carboni terciari essent metils dos dels substituents, els quals li aporten estabilitat a la hidròlisi al grup amida.

b) Dissolvent

Es tracta d'un alcohol, el qual és soluble amb aigua (100% miscibles), fet que permet que la reacció desitjada es dugui a terme correctament.

c) Iniciador

El paper d'iniciador de la reacció de polimerització el du a terme un compost de tipus peròxid, que pertany al grup dels peròxids diacils, els quals presenten la propietat de descompondre tant fotoquímicament com tèrmicament. És important tenir en compte que es tracta d'un compost poc estable en medi alcalí i amb la temperatura, fets que cal tenir en compte a l'hora d'escollir les condicions de reacció.

d) Agent entrecreuant

L'agent entrecreuant, el qual s'utilitza per augmentar la propietat d'hidrogel, és a dir, la viscositat del producte, es caracteritza per ser un monòmer de tipus vinílic, el qual presenta varis dobles enllaços terminals que permeten l'entrecreuament de les cadenes polimèriques.

e) Monòmer co-polimeritzant amb l'ATBS

Es tracta d'un monòmer vinílic, és a dir, presenta un doble enllaç terminal, el qual li confereix la propietat de poder polimeritzar amb facilitat amb l'ATBS.

f) Aigua

La presència d'aigua en un baix percentatge permet la formació d'espècies necessàries per a que es doni la reacció de forma favorable i, també, actua com a regulador de la llargada de la cadena polimèrica.

g) Agents neutralitzants

Aquests s'afegeixen per tal d'obtenir una sal amònica o sòdica en funció del producte final que es vol obtenir, tenint en compte les propietats que aquests li confereixen al producte.

5. ANÀLISI DE PRODUCTES COSMÈTICS

Els cosmètics són un tipus de productes molt importants en l'economia mundial. Per controlar la seva seguretat i eficàcia s'han desenvolupat normatives legals en els principals països del món (Unió Europea, Estats Units, Japó, Austràlia, etc.), cadascun d'ells amb la seva pròpia legislació, fet que fa que la venda d'un mateix cosmètic en tots els països sigui pràcticament impossible.

Un dels principals aspectes a considerar en el control de qualitat d'aquests productes és l'anàlisi dels seus ingredients. Les diferents legislacions estableixen quins són els compostos permesos i les concentracions dels mateixos depenent del producte. La Unió Europea disposa de diferents directrius on s'inclouen mètodes oficials d'anàlisi, en les quals s'inclou el mètode d'anàlisi. Tot i així, els mètodes oficials no permeten l'anàlisi de totes les substàncies regulades, d'aquí que la indústria hagi desenvolupat els seus propis mètodes.

Els principals tipus d'analits són substàncies colorants, conservants, fragàncies, surfactants, elements metàl·lics, anions inorgànics i altres compostos com amines, ceramides, fenols, etc.^[13]

6. VALIDACIÓ

6.1. Definició

Validar un mètode d'anàlisi consisteix en verificar i documentar la seva validesa, és a dir, la seva adequació a uns determinats requisits prèviament establerts^[1].

"Confirmació, a través de l'aportació d'evidència objectiva, de que s'han complit els requisits per a un ús o aplicació específic previst" ISO 9000^[2].

"Confirmació, a través de l'examen i aportació d'evidències objectives, de que es compleixen els requisits particulars per a un ús específic previst" ISO/IEC 17025^[3].

6.2. Casos en que s'ha de validar

- a) Mètodes no normalitzats. Corresponen a mètodes desenvolupats pel laboratori o a mètodes nous, o bé, a mètodes que tradicionalment s'han utilitzat al laboratori però no estan normalitzats.
- b) Mètode normalitzat amb una modificació significativa^[4].

6.3. Normes de validació

- a) S'ha de validar el procediment complet. S'han de tenir en compte tant les etapes de mesura instrumental com les etapes prèvies, ja que la intervenció humana és susceptible d'incorporar majors errors.
- b) Cal validar en tot l'interval de concentracions. La precisió del mètode varia en funció de la concentració dels analits en estudi.

- c) A l'hora de validar s'han de tenir en compte la varietat de matrius. Cal saber molt bé quina és la composició de les mostres que s'estan analitzant^[1].

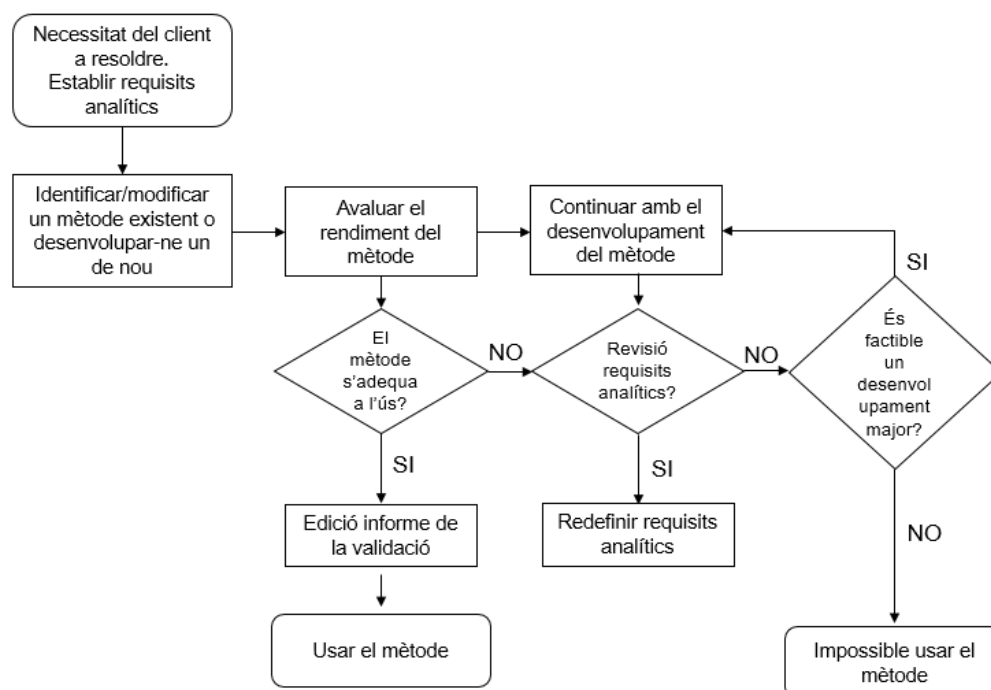
6.4. Requisits analítics

Els requisits analítics per a un ús determinat marquen els paràmetres o criteris de qualitat del mètode a utilitzar per a resoldre el problema plantejat. Aquests poden ser tant de tipus estadístic com econòmic. Aquests criteris queden exposats en la Taula-1^[1]:

Taula-1. Paràmetres de qualitat d'un mètode

Tipus matemàtic – estadístic	Tipus operatiu - econòmic
• Exactitud, traçabilitat • Precisió, incertesa • Representativitat • Sensibilitat • Selectivitat • Límits • Robustesa	• Inversió • Manteniment • Rapidesa • Facilitat d'ús • Simplicitat • Despeses directes • Despeses indirectes

En la Il·lustració-1 es mostra l'esquema que s'ha de seguir en el procés de validació d'un mètode analític.



Il·lustració-1. Procés de validació d'un mètode analític^[5]

6.5. Paràmetres de validació

A l'hora de validar un mètode s'han de tenir en compte un seguit de paràmetres, els quals s'estudiaran, o no, sabent quin tipus de mètode s'està validant. En la Taula-2 es mostren els paràmetres de validació i si han de ser determinats o no segons el tipus de mètode.

Taula-2. Paràmetres a avaluar en la validació segons el tipus de mètode

PARÀMETRE A AVALUAR	CARACTERÍSTIQUE(S)	M. QUALITATIU	M. QUANTITATIU		
			NORMALITZAT	MODIFICAT	NOU
SELECTIVITAT	Identificació analit Interferència de matriu	Si	No	Si	Si
LINEALITAT	Rang lineal	No	Si	Si	Si
SENSIBILITAT	Pendent	No	Si o No	Si	Si
LÍMITS	Crític (LC) Detecció (LOD) Quantificació (LOQ)	Si	Si o No	Si	Si
PRECISIÓ	Repetibilitat Reproductibilitat	No	Si	Si	Si
VERACITAT	Biaix Recuperació	No	Si o No	Si o No	si
ROBUSTESA	Test de <i>Youden Steiner</i>	No	No	Si o No	Si
APLICABILITAT	-	Si	Si	Si	Si

Tenint en compte que el mètode en estudi és un mètode utilitzat en el laboratori però no normalitzat, els paràmetres que s'ha decidit determinar són els següents:

- Linealitat/Recta de calibratge
- Límits
- Precisió
- Exactitud
- Robustesa

A continuació es descriuen cadascun d'ells de forma més extensa.

a) Linealitat

La linealitat és la capacitat d'un mètode d'anàlisi, dintre d'un determinat interval, de donar una resposta o resultats instrumentals que siguin proporcionals a la quantitat d'analit que s'haurà de determinar a la mostra de laboratori^[4].

Amb la finalitat de determinar el rang lineal es pot realitzar mitjançant una recta de calibratge, en la qual es representa la concentració d'analit (x) enfront la seva resposta instrumental (y).

- Calibratge: model de línia recta

La majoria de mètodes analítics incorporen una etapa de calibratge analític. Etapa en la qual es relaciona la resposta instrumental amb la propietat que hom està cercant, generalment la concentració de l'analit o analits d'interès, normalment mitjançant un model de línia recta.

Model de línia recta^[6]: model més emprat en calibratge analític, en part degut al seu suport teòric en algunes aplicacions analítiques, en part degut a la seva simplicitat. Aquest consisteix en trobar la recta de calibratge que millor s'ajusti a una sèrie d' n punts experimentals, on cada un es troba definit per una variable x i una variable y . La recta obtinguda ve definida per una ordenada d'origen (b) i un pendent (m) a través d'una equació de tipus:

$$y = mx + b$$

Per tal de validar la recta de calibratge obtinguda és tenen en compte els següents factors:

- Coeficient de correlació (r)

El coeficient de correlació (r) proporciona la correlació entre les variables x i y , el qual es troba comprès entre -1 i 1. El criteri d'acceptació, és a dir, el mètode es considera lineal quan el coeficient calculat és $r \geq 0.99$ ^[6].

- Coeficient de determinació (r^2)

El coeficient de determinació s'empra per determinar la qualitat de la regressió de la recta, és a dir, representa el percentatge de la variància total explicada pel model. El seu valor oscil·la entre 0 i 1, i com a criteri d'acceptació es considera que $r^2 \geq 0.99$.

- Pendent de la recta

El pendent de la recta indica la sensibilitat del calibratge i s'expressa en unitats de resposta/unitats de concentració. Aquesta relaciona l'aleatorietat de la resposta amb la que és deguda a la variació de la concentració. És inversament proporcional a la capacitat de detectar lleugeres diferències en la concentració d'analit^[7].

- Gràfic de residuals

El gràfic de residuals avalua la distància entre el punt experimental i el valor trobat per la recta de calibratge. D'aquesta manera, per a que el model de línia recta es pugui considerar vàlid s'ha d'observar, en aquest, que el nombre de residuals positius sigui aproximadament igual al dels negatius, que aquests estiguin distribuïts aleatòriament, que tinguin, aproximadament, el mateix valor absolut i que no mostrin tendències.

b) Límits

A l'hora d'estudiar els límits, s'han de tenir en compte els següents paràmetres:

Límit de detecció (LOD): es defineix com el valor mínim de concentració d'analit en la mostra problema que pot ser detectat per l'instrument, és a dir, es rep una resposta però aquesta no té per què ser quantificable^[8].

Límit de quantificació (LOQ): es defineix com la mínima concentració d'analit que pot ser quantificada amb una precisió i exactitud acceptables, tenint en compte les condicions del mètode^[8].

c) Precisió

La precisió és una mesura de quant propers estan els resultats entre si. De norma general, s'expressa mitjançant paràmetres estadístics que descriuen la propagació dels resultats, típicament la desviació estàndard, calculada a partir dels resultats obtinguts mitjançant la realització de mesures repetides amb un material adequat en condicions específiques^[5].

"Grau de concordança entre assajos independents obtinguts sota unes condicions estipulades" ISO 3534-1^[9].

No obstant, la precisió que s'obté quan un laboratori obté els assajos variant tots els factors que poden afectar al resultat s'anomena "precisió intermèdia". Aquesta aporta una idea de la variabilitat que poden tenir els resultats dintre d'un mateix laboratori.

- Càlcul de la precisió

Com s'ha exposat unes línies més amunt, hi ha dos tipus de precisió, la repetibilitat (tant la instrumental com la del mètode) i la reproductibilitat (estudiada com a precisió intermèdia). A continuació s'exposen els càlculs corresponents a cadascuna d'elles.

1) Repetibilitat

La repetibilitat reflexa, com ja s'ha mencionat, la precisió d'un mètode quan es desenvolupa sota unes mateixes condicions, s'usa la mateixa mostra analitzada pel mateix analista, en el mateix laboratori, amb els mateixos equips i reactius i durant una sessió de treball en un període curt.

Tenint en compte que hi ha dos tipus de repetibilitat, es diferenciarien a l'hora d'estudiar-les.

- La *repetibilitat instrumental* és la precisió que correspon a la mesura d'una mateixa mostra o patró mesurada repetides vegades i de forma consecutiva.

La concentració adequada per aquest estudi és la situada al centre de l'interval de linealitat.

- La *repetibilitat del mètode* fa referència a la precisió que correspon a la mesura de mostres o patrons de diferents concentracions analitzades diverses vegades i consecutivament.

Les diferents concentracions que es mesuraran estaran compreses entre els límits superior i inferior de l'interval de linealitat, aquestes seran una propera al límit superior, una altra propera al límit inferior i una última al centre del rang lineal.

Per a cadascuna d'elles es calcularà el següent:

- Concentració mitja experimental (x)
- Desviació estàndard (s)
- Desviació estàndard relativa ($RSD(\%)$)

Essent la desviació estàndard relativa l'expressió que definirà la repetibilitat de cada concentració.

El criteri d'acceptació que es considera en el cas de valors individuals, és a dir, de la repetibilitat instrumental, és el següent:

$$RSD \leq 5\%$$

Altrament, el criteri d'acceptació en el cas de la suma de valors individuals, és a dir, la repetibilitat del mètode, és aquest:

$$RSD \leq 10\%$$

2) Precisió intermèdia

Dintre de la precisió intermèdia es tindran en compte dos factors, el factor temps i el factor analista.

- El *factor temps* s'estudiarà a partir de la mesura per duplicat de tres mostres o patrons (situats als límits superior i inferior i al centre de l'interval lineal) durant un període d'entre 7 i 10 dies.

El valor d'aquesta haurà de ser inferior al doble del valor de la repetibilitat del mètode.

$$RSD(\%) < 2xRSD(\%)_{Rep. mètode}$$

- El *factor analista* s'estudiarà mitjançant la mesura de 7 mostres o patrons preparades per analistes diferents en la mateixa jornada de treball.

El criteri d'acceptació d'aquesta es basarà en un test estadístic (Anàlisi de la variància d'un factor, "Anova") en el qual es compararan les variàncies calculades per a cada conjunt de resultats.

d) Exactitud

L'exactitud es defineix com el grau de concordança entre el resultat d'un assaig i el valor de referència, és a dir, es tracta d'un terme aplicat a un conjunt de resultats d'un assaig i suposa una combinació de components aleatoris i un component comú d'error sistemàtic o biaix^[4].

"Proximitat en la concordança entre un resultat i el valor de referència acceptat" ISO 3534-1^[9].

- Càlcul de l'exactitud^[4]

Per estudiar l'exactitud del mètode es realitzarà mitjançant el càlcul de la recuperació, la qual s'haurà de demostrar en tot el rang de concentracions. Per fer-ho es faran 3 determinacions a 3 nivells de concentració (els propers als límits superior i inferior i l'intermedi). A més a més, per a avaluar la recuperació s'haurà de realitzar un test estadístic, test t-Student, en el que es considerarà $t_{cal} < t_{tab}$ com a criteri d'acceptació.

- La *recuperació* (R%) és la fracció de substància addicionada a la mostra (mostra fortificada) abans de l'anàlisi. Aquesta permet veure el rendiment d'un mètode analític quant al procés d'extracció i la quantitat d'analit existent en la mostra original. Per la qual cosa, la recuperació està intrínsecament relacionada amb les característiques de la matriu de la mostra.

Es calcula de la següent manera:

$$R(\%) = \left(\frac{X_i - X_0}{X_{add}} \right) \times 100$$

On:

R(%) = Recuperació (%)

X_i = concentració de l'analit de la mostra enriquida

X_0 = concentració de l'analit de la mostra sense addicionar

X_{add} = concentració de l'analit addicionat a la mostra enriquida

Altrament, per avaluar la recuperació amb el test estadístic t-Student, la t calculada es calcula de la següent forma:

$$t_{cal} = \frac{[100 - \%R]}{S \times \sqrt{n}}$$

On:

t_{cal} = t calculada

%R = Recuperació(%)

S = Desviació estàndard de les lectures del percentatge de recuperació

n = nº de lectures o valors observats

e) Robustesa

La robustesa es defineix com la influència de petits canvis deliberats en paràmetres del mètode (relacionats en el procediment), com ara operatius, ambientals i de mesura/anàlisi de pic. Normalment es determina mitjançant un enfocament de disseny experimental^[11].

Aquesta proporciona una indicació de la fiabilitat del procediment en un ús normal. En aquest sentit l'objectiu de la prova de robustesa és descriure sota quines condicions analítiques, ambientals, de mesura, etc. es pot veure afectat el funcionament diari del mètode. Altrament, la realització d'aquest estudi pot ajudar a millorar o optimitzar el mètode, sabent quins són els paràmetres que afecten més al funcionament diari d'aquest.

Un mètode d'assaig és més robust com menys afectats es vegin els seus resultats enfront una modificació de les condicions analítiques.

- Càlcul de la robustesa^[4] [12]

Per a la seva determinació s'aplica el Test de *Youden Steiner*, el qual permet avaluar l'efecte de 7 variables* amb només 8 anàlisis d'una sola mostra.

Per a procedir amb l'estudi de la robustesa s'han d'identificar aquells factors del mètode que possiblement afectaran als resultats finals obtinguts a través d'aquest.

A partir dels resultats obtinguts es pot calcular l'efecte de cadascuna de les variables fent la mitjana dels 4 anàlisis que contenen la variable en el seu valor més alt (majúscula) i aquelles que corresponen al valor més baix (minúscula), seguint les fórmules següents:

$$\frac{(s + t + u + v)}{4} = \frac{4A}{4} = A$$

$$\frac{(w + x + y + z)}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

*L'aleatorietat de les diferents variables de valor alt i valor baix ve marcada per la taula de *Youden Steiner* que es troba en l'Annex 12.3.

S'han d'establir les set comparacions possibles, és a dir, les diferències entre la variable major enfront la de menor valor, d'aquesta manera:

$$(A - a), (B - b), (C - c), (D - d), (E - e), (F - f), (G - g)$$

Així es pot conèixer l'efecte de cada variable. En aquest sentit, quant major sigui la diferència entre ambdós valors ($\Delta = X - x$), major influència tindrà la variable sobre el mètode analític.

Com a criteri d'acceptació es considera que la diferència entre valors sigui inferior a $\sqrt{2}$ de la desviació estàndard de la precisió del mètode (s), és a dir:

$$(X - x) < \sqrt{2} s$$

7. MÈTODE ANALÍTIC

7.1. Objectiu i camp d'aplicació

Aquest mètode d'anàlisi s'aplica per a la determinació d'àcid 2-acrilamido-2-metil-1-propansulfònic ("ATBS") en els productes de les famílies *Hostacerin*® i *Aristoflex*® en un rang d'1 – 90ppm d'ATBS. En mostres més concentrades s'ha de fer la dilució corresponent.

7.2. Fonament

L'ATBS extret en la fase aquosa, després de tractar el polímer amb clorur de lantani, es separa, identifica i quantifica mitjançant cromatografia de líquids, utilitzant un estàndard extern (AMPS) per a obtenir una recta de calibratge que relaciona les àrees del pic corresponent al mateix amb la seva concentració.

7.3. Instrumental

- Balança analítica (precisió 0.1mg) i granetari (precisió 0.01g).
- Cromatògraf de líquids (*Agilent sèrie 1100*), proveït de *detector VWD* (longitud d'ona variable) i *d'injector automàtic*.
- Columna de fase inversa per a eluents altament aquosos, *Aquasil C18*, long: 250mm, diàmetre int: 4.6mm, mida partícula: 5µm.
- Kit de filtració per a filtrar el solvent, amb filtres de PTFE o de cel·lulosa regenerada de 0.45µm.
- Filtres de xeringa de PTFE o de cel·lulosa regenerada de 0.45µm.
- pH-metre.
- Vials de 2ml per a l'injector automàtic.
- Centrífuga.

7.4. Reactius*

- Acetonitril grau HPLC.

*La perillositat dels reactius utilitzats es troba en l'Annex 12.4.

- Hidrogensulfat potàssic (KHSO₄) p.a., ≥99.0%.
- Hidròxid potàssic en lleties (KOH), ≥85.0%.
- Solució d'hidròxid potàssic 1M en aigua (KOH).
- ATBS p.s., ≥99.0%.
- Clorur de lantani (III) heptahidratat (LaCl₃·7H₂O) p.a., 98%.
- Aigua desionitzada, filtrada a través d'un filtre de 0.45µm o aigua grau HPLC.

7.5. Condicions cromatogràfiques

En la Taula-3 s'especifiquen les condicions cromatogràfiques de l'equip que s'utilitza en l'anàlisi dels productes de la planta d'AMPS.

Taula-3. Condicions cromatogràfiques

INSTRUMENT	
Setup PUMP	Flux solvent: 1.0ml/min
Setup Heater	Tº de columna: 30ºC
VWD Detector	Longitud d'ona: 200nm, 4nm Bw
Volum injecció	20µl
Temps d'anàlisi	25min

7.6. Procediment analític

1) Preparació de la fase mòbil "solució D/Acetonitril, 98/2 (v/v)"

- Preparació d'1l de solució D

Pesar en un pesafiltres i amb una precisió d'1mg:

0.681g de KHSO₄

Afegir sobre un aforat amb 950ml d'aigua destil·lada i agitar fins a dissolució.

Afegir una lletia de KOH i, un cop dissolta, afegir gota a gota solució de KOH 1M fins a pH=3.

Treure l'imant, enrasar amb aigua destil·lada i agitar fins a homogeneïtat.

- Preparació d'1l de fase mòbil

Pesar en un recipient apropiat, amb una precisió de 0.01g:

975.0g de solució D

15.6g d'Acetonitril

Agitar fins a homogeneïtat i filtrar amb un filtre de 0.45µm.

2) Calibratge

- Solució mare d'ATBS de 5000ppm (p/p)

Pesar en una aforat de 250ml, amb una precisió de 0.1mg:

1.25g d'ATBS

Enrasar amb aigua destil·lada i pesar els grams de solució, amb la mateixa precisió.

Agitar fins a dissolució.

- Preparació de patrons de 100 a 850ppm d'ATBS

Es preparen en dos etapes:

1ª.- Preparació de les solucions A:

Pesar en un aforat de 25ml, amb una precisió de 0.1mg, la quantitat indicada de solució mare d'ATBS, enrasar amb aigua destil·lada i pesar els grams de solució.

Agitar fins a homogeneïtat.

2ª.- Preparació dels patrons a injectar:

Pesar en un vial de 20ml, amb una precisió de 0.1mg, una alíquota de:

0.25g de solució A

9.75g d'aigua (el total ha de ser 10.0g, igual que en la preparació de la mostra), seguint la Taula-4.

Taula-4. Preparació dels patrons de calibratge

Patró	1ª etapa (aforat 25 mL)			2ª etapa (vial 20 mL)	
	g SM ATBS	g Sol. A	ppm ATBS	g Aliq. Sol. A	g Aigua
1	0,50	25	100	0,25	9,75
2	1,25	25	250	0,25	9,75
3	2,00	25	400	0,25	9,75
4	2,75	25	550	0,25	9,75
5	3,50	25	700	0,25	9,75
6	4,25	25	850	0,25	9,75

Agitar fins a homogeneïtat i filtrar amb un filtre de 0.45µm.

Es calcularan els gram d'ATBS en cada patró (nivell) a partir de la fórmula següent:

$$g \text{ ATBS en patró} = g \text{ aliq. sol. A} \times \frac{g \text{ S. M. ATBS}}{g \text{ sol. A}} \times \frac{g \text{ ATBS en S. M.}}{g \text{ sol. de S. M.}} \times \frac{Riq. \text{ ATBS}}{100}$$

La riquesa d'ATBS serà la que figuri en el certificat d'anàlisi del reactiu.

3) Preparació de la mostra

Pesar en un vial de 20ml, amb una precisió de 0.1mg:

0.25g de producte

0.50g de clorur de lantani

10.00g d'aigua destil·lada

Segellar el vial i agitar vigorosament.

Centrifugar a velocitat màxima durant 30min.

Filtrar la fase aquosa superior (ha de ser transparent o lleugerament opaca) a través d'un filtre de xeringa de 0.45µm.

4) Càlculs

El *software* del cromatògraf donarà directament el percentatge (%) d'ATBS que conté la mostra desconeguda, utilitzant la recta de calibratge construïda anteriorment.

Per calcular el contingut d'ATBS en ppm:

$$ppm = \% \text{ en el cromatograma} \times 10^4$$

7.7. Observacions

La solució de la fase mòbil té una caducitat d'una setmana, és a dir, ha de ser recent, si estigués ja preparada s'hauria d'observar el seu aspecte. En cas que hi hagi un lleuger precipitat, caldrà filtrar-la de nou amb un filtre de 0.45µm.

Igualment, l'aigua i l'acetonitril de rentat han de ser transparents i sense cap tipus de precipitat, si l'hi hagués, caldria substituir l'aigua i filtrar l'acetonitril amb un filtre de 0.45µm.

8. PART EXPERIMENTAL

8.1. Linealitat del mètode

Es van preparar la solució mare de 5000ppm i els patrons de concentració entre 100 – 850ppm d'ATBS (seguint les indicacions descrites en la secció 2) de l'apartat 6.6.) i es van analitzar amb l'HPLC.

8.2. Límit de detecció i quantificació del mètode

Per determinar els límits de detecció i quantificació es van realitzar tres estudis diferents. Aquests s'expliquen a continuació.

1) Mesura d'un blanc

Es va preparar un blanc i es va analitzar deu vegades amb l'HPLC, el qual contenia, només, fase mòbil (Solució D/ACN 98/2).

2) Mesura de patrons de concentració baixa coneguda

Es va preparar una bateria de patrons de concentracions baixes conegudes entre 0,04 – 8,00ppm i es va observar a partir de quina concentració es deixava de rebre resposta i si les respostes obtingudes seguien o no la linealitat de la recta.

3) Comparació de l'altura del blanc amb l'altura de patrons de concentració baixa

Per fer aquesta comparació es van preparar i analitzar deu blancs i patrons preparats a diferents concentracions, dels quals se'n va mesurar i comparar l'altura dels pics.

8.3. Precisió

Com ja s'ha exposat en la secció c) de l'apartat 5.5, per estudiar la precisió es van realitzar diferents experiments en els quals es miraven diferents factors.

Aquests s'analitzen per separat a continuació:

1) Repetibilitat instrumental

En aquest cas, es va preparar un patró de concentració coneguda (situada al centre de l'interval de linealitat) i es va mesurar deu vegades consecutives, per tal de determinar la repetibilitat de l'anàlisi en funció de l'equip.

2) Repetibilitat del mètode

Com ja s'ha explicat, per determinar la repetibilitat del mètode es van analitzar tres patrons de concentració coneguda, corresponents als límits superior, inferior i centre de l'interval de linealitat, preparats deu vegades cadascun i, cadascun d'ells mesurats una vegada, és a dir, un total de 30 patrons, 10 de cada concentració. Aquests es van analitzar durant la mateixa jornada de treball.

La preparació dels patrons, en ambdós casos, es va fer seguint les indicacions mencionades en la secció 2) de l'apartat 6.6.

8.4. Precisió intermèdia del mètode

Per estudiar la precisió intermèdia del mètode, tal i com ja s'ha explicat, es van valorar dos factors diferents, el factor temps i el factor analista.

1) Factor temps

Per determinar quina és la precisió intermèdia del mètode sota les condicions d'aquest factor, es van analitzar durant 10 dies dues rèpliques de patrons de 3 concentracions diferents (corresponents als límits superior i inferior i al centre del rang de linealitat).

El procediment que es va seguir cada dia durant els deu dies d'estudi va constar de la preparació de les dues rèpliques de cada patró (seguint les indicacions mencionades en la secció 2) de l'apartat 6.6.) i el seu posterior anàlisi amb l'HPLC.

2) Factor analista

Per estudiar la influència d'aquest factor sobre el mètode es van preparar set rèpliques d'un patró (seguint les indicacions mencionades en la secció 2) de l'apartat 6.6.), de concentració intermèdia, per dos analistes diferents, és a dir, un total de catorze rèpliques.

8.5. Exactitud del mètode

Per estudiar l'exactitud del mètode es va determinar la recuperació d'una mostra fortificada amb patrons de diferents concentracions (concentració alta, baixa i intermèdia).

Es va agafar una mostra de producte d'*Aristoflex AVC*®, una d'*Aristoflex AVS*® i una d'*Hostacerin AMPS*® i es van fortificar, per triplicat, amb els patrons 1, 3 i 5, és a dir, un total de 9 mostres fortificades, per cada producte.

8.6. Robustesa del mètode

Per determinar la robustesa del mètode es va fer un test estadístic, test de *Youden Steiner*, el qual consisteix, tal i com ja s'ha exposat en la secció e) de l'apartat 5.5, en portar a terme vuit experiments en els quals es varien set variables de forma aleatòria per estudiar la seva influència sobre el mètode.

Aquestes set variables van ser escollides tenint en compte el procediment de preparació de la mostra del mètode AC-TH501, especificat en la secció 6. Aquestes són els següents:

- Quantitat de clorur de lantani heptahidratat ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – (A,a)
- Temps de centrifugació – (B,b)
- Tipus d'agitació – (C,c)
- Temps d'agitació – (D,d)
- Ordre dels reactius i producte en la preparació de la mostra – (E,e)
- Temps d'espera abans de posar la mostra a centrifugació – (F,f)
- Addició de NaOH 50% en la preparació de la mostra –(G,g)

En la Taula-5 es mostren els valors alts i baixos escollits en funció dels valors especificats en el mètode AC-TH501.

Taula-5. Valors alta, baixa i del mètode de les variables en estudi

Variable	Valor baix (x)	Valor del mètode	Valor alt (X)
$\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A,a)	0.3000g	0.5000g	0.7000g
Temps centrifugació (B,b)	15min	30min	45min
Tipus agitació (C,c)	Imant	Manual	Manual
Temps agitació (D,d)	1min	-	3min
Ordre preparació (E,e)	Normal	Normal	Invers
Temps espera pre centrifugació (F,f)	0min	-	15min
Addició NaOH (G,g)	-	-	0.2000g

Els experiments es van realitzar seguits, en una mateixa jornada de treball i es van utilitzar una mostra d'*Aristoflex AVC*[®], una d'*Aristoflex AVS*[®] i una d'*Hostacerin AMPS*[®] com a mostres problema, ja que en tractar-se de productes lleugerament diferents, els paràmetres en estudi podrien afectar de formes diferents en el mètode segons el tipus de matriu.

9. RESULTATS I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

9.1. Linealitat del mètode

En aquest cas, com la linealitat del mètode ja havia estat estudiada quan es va establir el mètode, per tal de corroborar que aquest era lineal es va realitzar el calibratge seguint el model de línia recta.

D'aquesta manera, com el rang de concentracions de la recta ja estava determinat (0 – 850ppm), no es van haver de determinar les concentracions de la recta de treball.

A continuació, en la Taula-6, es mostren les dades i càlculs que es van realitzar per a obtenir els resultats corresponents.

Taula-6. Dades i càlculs de la preparació de la solució mare i els patrons

Puresa ATBS	Solució Mare ATBS	
100.1%	1.2510g ATBS	249.3760g S.M. ATBS

Patró	1ª etapa (aforat 25 ml)			2ª etapa (vial 20 ml)		
	g SM ATBS	g Sol. A	ppm patró	g Aliq. Sol A	g Aigua	g ATBS en patró
1	0,5052	25,3690	100,00	0,2545	9,7500	2,5450E-05
2	1,2567	25,2641	249,78	0,2559	9,7535	6,3920E-05
3	2,0040	24,7967	405,83	0,2566	9,7558	1,0414E-04
4	2,7653	24,8085	559,73	0,2509	9,7551	1,4044E-04
5	3,5029	24,8324	708,35	0,2566	9,7548	1,8176E-04
6	4,2599	24,8074	862,29	0,2564	9,7554	2,2109E-04

- Càlcul de la concentració de la solució mare

$$1.2510g \text{ ATBS} \times \frac{1000mg}{1g} \times \frac{100.1}{100} \times \frac{1}{250ml} \times \frac{1000ml}{1l} = 5009.004ppm$$

- Càlcul de la concentració del patró 1

$$0.5052g \text{ S.M. ATBS} \times \frac{1.2510g \text{ ATBS}}{249.3760g \text{ S.M. ATBS}} \times 100.1 \times \frac{1}{25.3690g \text{ sol. A}} \times \frac{1}{10^6} = 100ppm$$

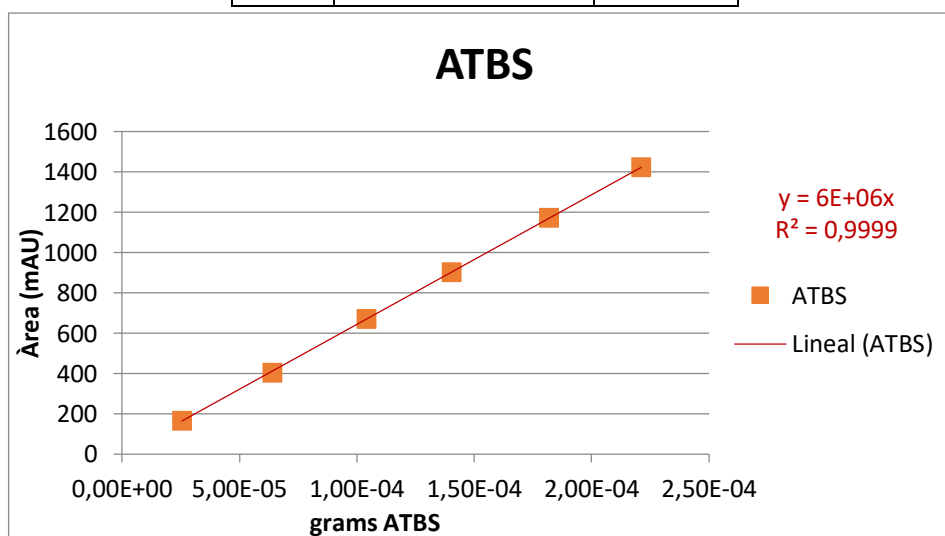
- Càlcul dels grams d'ATBS en el patró 1

$$0.2545g \text{ aliq. sol. A} \times \frac{0.5052g \text{ S.M. ATBS}}{25.3690g \text{ sol. A}} \times \frac{1.2510g \text{ ATBS}}{249.3760g \text{ S.M. ATBS}} \times 100.1 = 2.54 \cdot 10^{-5}g \text{ ATBS}$$

Per construir la recta es va fer a partir dels grams d'ATBS de cada patró i la seva corresponent àrea obtinguda en la lectura del cromatògraf, il·lustrats en la Taula-7.

Taula-7. Valors de les variables x(g ATBS) i y(àrea pic) de la recta de calibratge

Patró	Àrea ATBS (mAU)	g ATBS
1	164,13	2,54E-05
2	403,29	6,39E-05
3	670,77	1,04E-04
4	903,63	1,40E-04
5	1172,14	1,81E-04
6	1423,67	2,21E-04



Il·lustració-2. Recta de calibratge del mètode AC-TH501

A part, en introduir els valors obtinguts de la recta de calibratge a l'equip, el *software* aporta els valors de l'ordenada a l'origen, pendent i coeficient de correlació, aquests es mostren en la Taula-8.

Taula-8. Dades del calibratge obtingudes a partir del software de l'equip

Coeficient de correlació (r)	Ordenada a l'origen (b)	Pendent (m)
0.99998	-2.12	6.45

✓ Discussió de resultats

1) Coeficient de correlació (r)

Com es pot observar, el coeficient de correlació obtingut presenta quatre nous després de la coma, per tant, tenint en compte que el criteri d'acceptació és $r^2 \geq 0.99$, es pot afirmar que la correlació entre les variables x i y és adequada.

2) Coeficient de determinació (r^2)

El coeficient de determinació calculat és de 0.9999, el qual també presenta quatre nous després de la coma, fet que el fa molt proper al valor de 1, és a dir, es considera que els valors de la recta estan quasi completament ajustats.

3) Pendent de la recta (m)

El pendent de la recta és un paràmetre molt característic de cada recta de calibratge, una manera de comprovar que el calibratge s'ha fet correctament és mitjançant la comparació dels pendents de la recta de calibratge, les dades de les quals es mostren en la Taula-9.

Taula-9. Comparació de pendents

Dia	Pendent
21/03/2019	6,45E+06
07/03/2019	6,47E+06
13/02/2019	6,25E+06
31/08/2018	6,47E+06
20/06/2018	6,23E+06

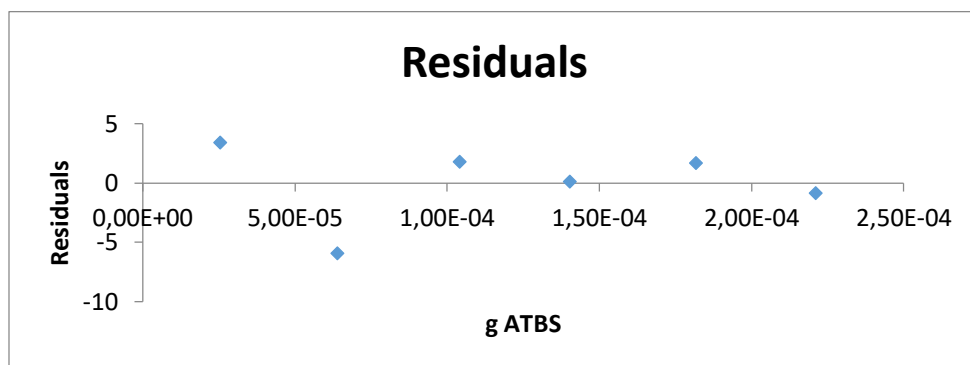
Com es pot observar, tots els pendents són del mateix ordre. A més, també es va realitzar un test t-Student per comprovar, de forma estadística, si hi havia diferències significatives entre el pendent obtingut en l'últim calibratge i els calibratges anteriors.

$$F_{cal} = 1.43 \quad F_{tab(\alpha=0.5, 2cues)} = 3.18 \quad \rightarrow \quad F_{cal} < F_{tab}$$

Per tant, el pendent, que és un paràmetre característic de la recta de calibratge, no mostra diferències significatives amb els pendents obtinguts amb els calibratges anteriors, fet que evidencia que el calibratge s'ha dut a terme correctament.

4) Gràfic de residuals

Tal i com ja s'ha exposat en la secció a) de l'apartat 5.5, el gràfic de residuals ha de complir un seguit de requisits per tal de considerar vàlida la recta de calibratge. Com es pot observar en la Il·lustració-3, el gràfic de residuals compleix amb tots els requisits especificats, per tant, es considera que el model de línia recta és vàlid.



Il·lustració-3. Gràfic de residuals de la recta de calibratge del mètode

9.2. Límit de detecció i quantificació del mètode

Com per a determinar el LOD i el LOQ es va fer mitjançant tres mètodes diferents, els resultats i la seva discussió s'exposaran per separat a continuació:

1) Mesura d'un blanc

Les fórmules aplicades per determinar els límits es mostren a continuació:

$$LOD = y_b + 3S_b \quad LOQ = y_b + 10S_b$$

Amb aquestes es van obtenir els resultats i càlculs que es mostren en la Taula-10.

Taula-10. Determinació del límit de detecció i quantificació a partir d'un blanc

Mesura	y _i	(y _i – y _b) ²
1	-	-
2	15,92	7,81E-02
3	17,83	2,67E+00
4	15,14	1,12E+00
5	22,43	3,88E+01
6	13,48	7,38E+00
7	-	-
8	14,79	1,98E+00
9	16,45	6,52E-02
10	13,54	7,07E+00

n	10
Y _b	16,19
S _b	59,20
Ordenada (a)	-2,12156
Pendent (b)	6,45E+06

LOD	LOQ
3,04ppm	9,46ppm

2) Mesura de patrons de concentració baixa coneguda

En la Taula-11 es mostren els resultats experimentals obtinguts a partir de la concentració mínima, de la qual s'obtenia resposta.

Taula-11. Resultats obtinguts amb els patrons de concentració coneguda

ppm ATBS teòrics	ppm ATBS experimentals
0,04	-
0,06	0,13

0,10	0,18
0,20	0,25
0,30	0,37
0,51	0,55
1,02	1,06
1,54	1,57
2,04	2,09
3,06	1,57
4,08	4,13
8,17	8,22

A partir d'aquests es va realitzar un test estadístic, test t-Student per comprovar si hi havia diferències significatives entre els resultats teòrics i els resultats experimentals.

$$t_{cal} = 0.09 \quad t_{tab(\alpha=0.5, 2cues)} = 2.09 \quad \rightarrow \quad t_{cal} < t_{tab}$$

3) Comparació de l'altura del blanc amb l'altura de patrons de concentració baixa

Amb aquest mètode, segons si es volia determinar el límit de detecció o el límit de quantificació, es va multiplicar l'altura obtinguda per 3 o per 10, respectivament i, per comparació amb l'altura obtinguda dels patrons de concentració baixa coneguda (corresponents a l'apartat anterior), es va determinar en quina concentració es trobaven els límits, el LOD i el LOQ.

A continuació, en la Taula-12, es mostren els valors obtinguts i calculats per als blancs i per als patrons:

Taula-12. Resultats obtinguts a partir de l'altura del pic dels blancs

Blanc	h(cm)	Patró	h(cm)	ppm ATBS	LOD	LOQ
1	0,32	2	0,25	0,13	1,08cm	3,60cm
2	0,40	3	0,31	0,18	0,37-0,55ppm	1,06-1,57ppm
3	0,35	4	0,50	0,25		
4	0,39	5	0,75	0,37		
5	0,39	6	1,30	0,55		
6	0,38	7	2,66	1,06		
7	0,32	8	3,68	1,57		
8	0,40	Escala: -5.0 – 5.0 mAU				
9	0,35					
10	0,30					
h_m	0,36					

✓ Discussió de resultats

Com es pot observar en la Taula-13, els valors dels límits obtinguts amb els diferents mètodes són diferents entre ells, tot i així són vàlids pel procediment seguit en cada cas. Per tant, els valors s'escolliran en funció de les característiques del mètode.

Taula-13. Resultats obtinguts a partir dels diferents mètodes per determinar el LOD i el LOQ

Mètode	LOD	LOQ
1) A partir de la mesura d'un blanc	3,04ppm	9,46ppm
2) A partir de patrons de concentració coneguda	0,06ppm	0,06ppm
3) Per comparació de l'altura dels blancs amb els patrons de concentració coneguda	0,37ppm-0,55ppm	1,06ppm-1,57ppm

És important tenir en compte que l'especificació està en màxim 500ppm d'ATBS en el producte, de manera que es troba molt per sobre del LOD i el LOQ, per tant, no hi haurà problema a l'hora de quantificar l'ATBS lliure present en les mostres reals.

9.3. Precisió

Dintre d'aquest paràmetre de validació es van estudiar diferents factors, els quals s'analitzaran per separat a continuació.

1) Repetibilitat instrumental

Com bé s'ha explicat en l'apartat 1) de la secció 7.3, es va preparar un patró, la concentració del qual es trobava al centre de l'interval de linealitat. Els càlculs que es van seguir per determinar la seva concentració es mostren en la Taula-14.

Taula-14. Dades de la preparació dl patró 2

Patró	1ª etapa (aforat 25 ml)			2ª etapa (vial 20 ml)		
	g SM ATBS	g Sol. A	ppm ATBS	g Aliq. Sol. A	g Agua	g ATBS patró
2	1,2545	24,8349	253,66	0,2572	9,7524	6,5240E-05

D'aquesta manera, el paràmetre que és va estudiar va ser la desviació estàndard relativa produïda per l'HPLC. Per tant, el resultat només vindrà condicionat per la precisió de l'instrument.

La desviació estàndard relativa ($RSD(\%)$) es calcula seguint la fórmula següent:

$$RSD(\%) = \frac{\text{Desviació } (s)}{\text{Mitjana } (x)} \times 100$$

En la Taula-15 es mostren les 10 mesures realitzades del patró i la resposta (àrea del pic (mAU)) que es va obtenir de cadascuna d'elles. A partir d'aquestes es va calcular la desviació estàndard i la mitjana, que corresponen al dividend i al divisor, respectivament, del càlcul de la RSD(%).

Taula-15. Resultats i càlculs de la repetibilitat instrumental

Patró	Àrea (X_i)	$(X_i - X_m)$	$(X_i - X_m)^2$
P2-1	419,06	31,79	1010,81
P2-2	421,85	34,59	1196,15
P2-3	424,34	37,08	1375,06
P2-4	426,18	38,92	1514,51
P2-5	425,14	37,87	1434,44
P2-6	421,75	34,49	1189,61
P2-7	426,95	39,69	1574,99
P2-8	425,67	38,40	1474,85
P2-9	431,04	43,78	1916,58
P2-10	427,92	40,65	1652,63
n	10		
X_m	387,26		
S	3,45		
RSD(%)	0,89		

✓ Discussió de resultats

Per considerar acceptable la $RSD(\%)$ per a valors individuals, aquesta ha de ser inferior o igual al 5%. Per tant, tal i com es pot observar en la Taula-16, la $RSD(\%)$ té un valor del 0,89%, molt inferior al 5%. Aquest valor assegura que la precisió instrumental és molt bona.

2) Repetibilitat del mètode

A partir dels resultats obtinguts es va calcular la $RSD(\%)$ corresponent a cada concentració i a la total, que és la suma de les $RSD(\%)$ de cada concentració. Els resultats obtinguts es mostren en la Taula-16.

Taula-16. Resultats i càlculs de la repetibilitat del mètode

Patró	Àrea (y_i)	g ATBS (X_i)	$(X_i - X_m)^2$		
P1-1	158,94	2,45E-05	5,93E-14		
P1-2	155,87	2,41E-05	6,13E-14	n_{P1}	10
P1-3	151,39	2,33E-05	9,29E-13	n_{P3}	10
P1-4	157,44	2,43E-05	8,18E-18	n_{P5}	10

P1-5	162,92	2,52E-05	7,74E-13	n_{Ptot}	30
P1-6	154,61	2,39E-05	2,02E-13	X_{P1}	2,43E-05
P1-7	154,87	2,39E-05	1,66E-13	X_{P3}	1,03E-04
P1-8	159,72	2,47E-05	1,36E-13	X_{P5}	1,85E-04
P1-9	156,17	2,41E-05	4,01E-14	X_{T}	3,12E-04
P1-10	162,26	2,51E-05	5,99E-13	S_{P1}	5,74E-07
P3-1	651,02	1,03E-04	4,06E-14	S_{P3}	2,48E-06
P3-2	655,34	1,04E-04	2,40E-13	S_{P5}	3,33E-06
P3-3	664,60	1,05E-04	3,88E-12	S_{T}	6,38E-06
P3-4	650,46	1,03E-04	8,43E-14	$RSD_{\text{P1}} (\%)$	2,36
P3-5	666,81	1,06E-04	5,40E-12	$RSD_{\text{P3}} (\%)$	2,40
P3-6	623,19	9,88E-05	2,17E-11	$RSD_{\text{P5}} (\%)$	1,80
P3-7	652,06	1,03E-04	1,26E-15	$RSD_{\text{T}} (\%)$	6,56
P3-8	660,90	1,05E-04	1,90E-12		
P3-9	628,62	9,97E-05	1,43E-11		
P3-10	669,80	1,06E-04	7,85E-12		
P5-1	1125,08	1,79E-04	2,94E-11		
P5-2	1153,91	1,84E-04	6,54E-13		
P5-3	1184,32	1,89E-04	1,65E-11		
P5-4	1133,74	1,80E-04	1,63E-11		
P5-5	1161,58	1,85E-04	1,76E-13		
P5-6	1144,62	1,82E-04	5,27E-12		
P5-7	1153,35	1,84E-04	8,06E-13		
P5-8	1186,65	1,89E-04	1,96E-11		
P5-9	1176,34	1,87E-04	7,73E-12		
P5-10	1170,03	1,86E-04	3,13E-12		

✓ *Discussió de resultats*

Per considerar acceptable el valor de la $RSD(\%)$ obtinguda a partir de la suma de valors individuals, aquesta ha de ser inferior o igual a un 10%. Com s'observa, el valor obtingut és de 6.56%, és a dir, per sota del 10% establert com a criteri d'acceptació. Per tant, tenint en compte els resultats, es pot considerar que la repetibilitat del mètode és adequada.

9.4. Precisió intermèdia del mètode

En aquest cas, també es van analitzar diferents factors, el factor temps i el factor analista, els quals es discuteixen per separat, a continuació.

1) Factor temps

En la Taula-17 es mostren els resultats i els càlculs corresponents al patró 3, és a dir, el de concentració intermèdia.

Taula-17. Resultats de la precisió intermèdia (factor temps)

Dia	Patró	y_i	Grubbs	X_i	x_m	$(x_i - x_m)^2$
1	P3-1	643,45	✓	9,94E-05	9,88E-05	3,41E-13
	P3-2	635,88	✓	9,82E-05		3,41E-13
2	P3-3	649,26	✓	1,03E-04	1,02E-04	1,12E-12
	P3-4	636,04	✓	1,01E-04		1,12E-12
3	P3-5	633,83	✓	1,01E-04	1,02E-04	3,12E-12
	P3-6	655,92	✓	1,04E-04		3,12E-12
4	P3-7	651,02	✓	1,03E-04	1,04E-04	1,19E-13
	P3-8	655,34	✓	1,04E-04		1,19E-13
5	P3-9	637,88	✓	1,01E-04	1,03E-04	2,83E-12
	P3-10	658,93	✓	1,05E-04		2,83E-12
6	P3-11	645,76	✓	1,02E-04	1,03E-04	2,06E-14
	P3-12	647,55	✓	1,03E-04		2,06E-14
7	P3-13	656,80	✓	1,04E-04	1,05E-04	2,33E-13
	P3-14	662,84	✓	1,05E-04		2,33E-13
8	P3-15	727,24	3,82	1,15E-04	1,10E-04	3,53E-11
	P3-16	653,01	✓	1,04E-04		3,53E-11
9	P3-17	647,54	✓	1,03E-04	1,03E-04	2,22E-13
	P3-18	653,43	✓	1,04E-04		2,22E-13
10	P3-19	648,00	✓	1,05E-04	1,07E-04	1,24E-12
	P3-20	661,84	✓	1,08E-04		1,24E-12

X_m	653,08
S_t	19,43
G_{tab}	2,56

Abans de calcular la $RSD(\%)$ corresponent a cada dia d'anàlisi es va fer un test de *Grubbs* per a prescindir dels valors discrepats en els càlculs. Com es pot observar en la Taula-18, només hi ha un valor discrepant, corresponent a l'anàlisi del patró P3-15 del dia 8.

Per calcular la $RSD(\%)$ total del patró es va prescindir del valor corresponent al dia 8, tal i com mostra la Taula-18.

Taula-18. Càlcul de la $RSD(\%)$ de la precisió intermèdia (factor temps)

Dia	n _{p3}	S _{p3}	RSD _{p3} (%)
1	2	8,26E-07	0,84
2	2	1,49E-06	1,47
3	2	2,50E-06	2,44
4	2	4,89E-07	0,47
5	2	2,38E-06	2,31
6	2	2,03E-07	0,20
7	2	6,83E-07	0,65
9	2	6,67E-07	0,65
10	2	1,57E-06	1,48
18		1,08E-05	10,51

✓ Discussió de resultats

El valor de la precisió intermèdia (factor temps) ha de ser inferior al doble dels valors de la repetibilitat del mètode, segons el criteri establert.

Taula-19. Resultats precisió intermèdia (factor temps)

Patró	RSD (%)
P1	22,90
P3	10,51
P5	9,54

$$2 \times RSD(\%)_{Rep.mètode} = 13.12\%$$

Com es pot observar en la Taula-19, els valors de $RSD(\%)$ corresponents als patrons 3 i 5 sí que compleixen amb el criteri d'acceptació, en canvi, el patró 1 no. Aquest resultat ens porta a pensar que la precisió intermèdia del mètode empitjora a mesura que disminueix la concentració de l'analit. Per tant, els resultats obtinguts pel mètode es poden veure afectats pel factor temps (dia en que s'analitzen) quan es mesuren en concentracions molt baixes.

Tot i així, cal remarcar que aquest empitjorament de la precisió intermèdia a nivells de concentració molt baixos no influeix en l'obtenció de resultats a l'hora d'analitzar mostres reals, ja que l'especificació és de màxim 500ppm d'ATBS, és a dir, les concentracions situades al rang superior són les que requereixen una millor precisió.

2) Factor analista

En la Taula-20 es mostren els resultats obtinguts a partir de les mesures dels patrons preparats pels dos analistes.

Taula-20. Resultats de l'anàlisi del patró preparat per 2 analistes diferents

ANNA			DAVID		
Patró	y _i	x _i	Patró	y _i	x _i
P3-1	672,02	1,05E-04	P3-1	660,65	1,03E-04
P3-2	689,66	1,07E-04	P3-2	692,07	1,08E-04
P3-3	657,04	1,02E-04	P3-3	658,36	1,03E-04
P3-4	660,84	1,03E-04	P3-4	646,18	1,01E-04
P3-5	656,42	1,02E-04	P3-5	670,77	1,04E-04
P3-6	666,03	1,04E-04	P3-6	676,40	1,05E-04
P3-7	656,97	1,02E-04	P3-7	675,40	1,05E-04
7	665,57	1,04E-04	7	668,55	1,04E-04

n _{p3}	S _{p3}	RSD _{p3} (%)	n _{p3}	S _{p3}	RSD _{p3} (%)
7	12,08	1,81	7	14,90	2,23

✓ *Discussió de resultats*

Per comprovar la influència d'aquest factor sobre el mètode i veure si els resultats obtinguts per ambdós analistes, exposats en la Taula-20, eren comparables es va fer un anàlisi de la variància d'un factor (Anova).

Els resultats obtinguts amb el test estadístic són els següents:

$$t_{cal} = 0.17 \quad t_{tab(\alpha=0.5, 2cues)} = 4.75 \quad \rightarrow \quad t_{cal} < t_{tab}$$

Per tant, es pot afirmar que el factor analista no influeix en la precisió intermèdia del mètode.

9.5. Exactitud del mètode

Les fórmules usades, tant de la recuperació com del test estadístic t-Student, en el càlcul de la recuperació estan especificades en la secció d) de l'apartat 5.5.

Els resultats i els càlculs es mostren en la Taula-21.

Taula-21. Resultats de la recuperació de la mostra d'Hostacerin AMPS fortificada

Hostacerin AMPS®											
MOSTRA	y ₀	ppm M	g pols	g alic. Sol A	X ₀	X _{add}	y _i	X _i	(X _i - X ₀)/X _{add}	R(%)	X _R (%)
M+P1	43,82	28,00	0,2544	0,2513	7,12E-06	2,55E-05	211,58	3,31E-05	1,02E+00	102,07	104,00
	44,13	28,00	0,2561	0,2500	7,17E-06	2,53E-05	214,27	3,35E-05	1,04E+00	104,06	
	43,95	28,00	0,2551	0,2532	7,14E-06	2,57E-05	219,25	3,43E-05	1,06E+00	105,86	
M+P3	40,50	28,00	0,2504	0,2695	7,01E-06	1,10E-04	753,04	1,17E-04	1,00E+00	100,32	100,61
	40,72	28,00	0,2516	0,2547	7,04E-06	1,04E-04	716,44	1,12E-04	1,01E+00	100,66	
	41,80	28,00	0,2576	0,2555	7,21E-06	1,04E-04	720,92	1,12E-04	1,01E+00	100,85	
M+P5	41,28	28,00	0,2547	0,2575	7,13E-06	1,82E-04	1189,12	1,85E-04	9,77E-01	97,65	99,28
	40,53	28,00	0,2506	0,2577	7,02E-06	1,82E-04	1220,20	1,89E-04	1,00E+00	100,28	
	40,77	28,00	0,2519	0,2600	7,05E-06	1,84E-04	1226,57	1,90E-04	9,99E-01	99,91	
											101,30

Test t-Student					
s	n	t _{cal}	g. Llibertat	α	t _{tab} (α=0.5,2cues)
2,47	9	-0,175	8	0,05	2,306
t _{cal} < t _{tab}					

✓ Discussió de resultats

La recuperació obtinguda per a l'*Hostacerin AMPS*[®] és de 101,30%, la qual ha estat valorada amb un test t-Student per determinar si és comparable amb el 100% de la recuperació o significativament diferent. Com s'observa en els valors obtinguts, la recuperació no mostra una diferència significativa al 100%, per tant, es considera acceptada.

Veient aquests resultats i els obtinguts en la precisió intermèdia (factor temps), es conclou que l'estudi a concentracions baixes d'analit afecten més significativament al valor dels paràmetres estudiats, ja que el valor de recuperació obtingut en la mostra fortificada amb patró 1, difereix lleugerament al de les mostres fortificades amb els patrons 3 i 5, és a dir, és la raó per la qual la recuperació és major al 100%.

Taula-22. Comparació de la recuperació amb i sense Patró 1

Recuperació(%) amb Patró 1	Recuperació(%) sense Patró 1
101,30	99,95

Taula-23. Recuperació obtinguda de cada producte

Producte	Recuperació(%)
Hostacerin AMPS [®]	101,29
Aristoflex AVC [®]	97,64
Aristoflex AVS [®]	101,92

Pel que fa als productes *Aristoflex AVC*[®] i *AVS*[®], la variació dels resultats també es veu influenciada pel mateix factor, és a dir, per la mostra fortificada amb patró 1.

A més, també s'observa que la variació de la recuperació també es veu afectada segons el tipus de producte en estudi. Els productes *Hostacerin AMPS*[®] i *Aristoflex AVS*[®] tenen, gairebé, el mateix valor, en canvi, l'*Aristoflex AVC*[®] presenta una recuperació inferior. Aquesta diferència pot ser deguda al tipus de matriu que presenta aquest últim.

9.6. Robustesa del mètode

Els càlculs i resultats obtinguts en els experiments realitzats amb la mostra d'*Aristoflex AVS*[®] es mostren en la Taula-24.

Taula-24. Recuperació obtinguda de cada producte

ARISTOFLEX AVS®											
CONDICIÓ VARIABLE				ANÀLISIS							
Tipus	Clau	Valor alt X	Valor baix x	1	2	3	4	5	6	7	8
LaCl ₃ ·7H ₂ O	A,a	0,7000g	0,3000g	0,7000g	0,7000g	0,7000g	0,7000g	0,3000g	0,3000g	0,3000g	0,3000g
Temps centrifugació	B,b	45min	15min	45'	45'	45'	15'	45'	15'	15'	15'
Tipus d'agitació	C,c	mà	imant	mà	imant	mà	imant	mà	imant	mà	imant
Temps d'agitació	D,d	3min	1min	3'	3'	1'	1'	1'	1'	3'	3'
Ordre preparació	E,e	invers	normal	invers	normal	invers	normal	normal	invers	normal	invers
Temps espera pre- centrifugació	F,f	15'	0'	15'	0'	0'	15'	15'	0'	0'	15'
Addició NaOH 50%	G,g	Si	No	0,2000g	-	-	0,2000g	-	0,2000g	0,2000g	-
			g pols	0,2594	0,2527	0,2673	0,2592	0,2527	0,2612	0,2598	0,2689
			g H ₂ O	10,0117	10,0106	10,2492	10,0185	10,4598	10,0039	10,0527	10,0457
RESULTAT (ppm)				s	t	u	v	w	x	y	z
				5,41E-05	2,24E-05	4,59E-05	9,54E-06	4,57E-05	1,14E-05	3,90E-05	3,12E-05

CONDICIÓ VARIABLE		RESULTATS		DIFERÈNCIA	COMPARACIÓ
Valor alt X	Valor baix x	Mitjana X	Mitjana x	$\Delta(X-x)$	$\Delta < \sqrt{2} s$
A	a	3,30E-05	3,19E-05	1,14E-06	No sensible a variable
B	b	4,20E-05	2,28E-05	1,92E-05	Sensible a variable
C	c	4,62E-05	1,87E-05	2,75E-05	Sensible a variable
D	d	3,67E-05	2,82E-05	8,54E-06	No sensible a variable
E	e	3,57E-05	2,92E-05	6,47E-06	No sensible a variable
F	f	3,51E-05	2,97E-05	5,45E-06	No sensible a variable
G	g	2,85E-05	3,63E-05	7,78E-06	No sensible a variable

$S_{mètode}$	$\sqrt{2} S_{mètode}$
6,38E-06	9,02E-06

Un cop fets els vuit experiments, es van fotografiar les mostres, exposades en la Taula-25, abans de ser punxades a l'HPLC, per tal de veure els efectes de les variables de forma visual i poder comparar-ho després amb els resultats obtinguts de forma numèrica.

Taula-25. Experiments del test de Youden Steiner

ANÀLISI 1	ANÀLISI 2	ANÀLISI 3	ANÀLISI 4
			
ANÀLISI 5	ANÀLISI 6	ANÀLISI 7	ANÀLISI 8
			

✓ *Discussió de resultats*

Per fer la discussió de resultats, en aquest apartat, s'exposaran variable per variable, tenint en compte tant els valors obtinguts amb el test estadístic com els resultats visuals.

1) Quantitat de clorur de lantani heptahidratat ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

El clorur de lantani s'utilitza per fer precipitar el polímer en la preparació de la mostra i que aquest, posteriorment, no sigui injectat a l'HPLC evitant la contaminació de la columna amb restes polimèriques.

Com es pot observar en el test de *Youden Steiner*, el mètode no és sensible a la modificació de la quantitat de clorur de lantani addicionat sobre la mostra durant la seva preparació. Visualment, es va comprovar que aquesta variable no afectava en la preparació de la mostra.

2) Temps de centrifugació

La centrifugació de la mostra facilita la precipitació del polímer i la separació en dues fases diferenciades, el líquid sobrenedant (que és el que es filtra i s'injecta a l'HPLC) i el polímer precipitat.

Pel que fa als resultats estadístics, aquesta variable si que afecta a la robustesa del mètode i, visualment, també s'evidencia la mateixa conclusió en dos dels quatre experiments que contenen aquesta variable en el seu valor més baix (experiments 4 i 7), ja que presenten una mala separació de les fases, fet que dificulta la filtració del líquid sobrenedant.

3) Tipus d'agitació

La finalitat de l'agitació en la preparació de la mostra es basa en una reacció adequada entre el producte i el clorur de lantani per garantir una bona precipitació del polímer.

Observant els resultats estadístics, es comprova que el mètode si que és sensible a la modificació d'aquesta variable. Visualment es va observar que amb l'agitació amb imant no s'aconseguia una total homogeneïtat de la mostra, és a dir, tot i que l'agitació magnètica és una bona forma de controlar les revolucions de l'agitació, aquesta no tenia prou potència per afavorir una reacció total entre ambdós substàncies i s'observaven, en el precipitat, dues fases sòlides en les que es podia diferenciar el clorur de lantani i el producte no reaccionats (anàlisis 2, 4, 6 i 8).

4) Temps d'agitació

El temps d'agitació té la mateixa finalitat que el tipus d'agitació. Tot i així, cal remarcar que, tot i tenir la mateixa finalitat, aquests no afecten de la mateixa forma a la preparació de la mostra. És a dir, el tipus d'agitació correspon a la forma en que interactuen els diferents reactius entre si per aconseguir una bona precipitació del

polímer, en canvi, el temps d'agitació fa referència al temps necessari per a que es doni completament la interacció entre reactius.

En aquest cas, tant estadísticament com visualment s'observa que aquesta variable no té cap tipus d'influència en la robustesa del mètode.

5) Ordre de preparació

En l'estudi de la influència d'aquesta variable es va observar, de forma estadística i visual, que la preparació de la mostra, ja sigui seguint les indicacions del mètode o de forma inversa, no afecta en la robustesa del mètode.

6) Temps d'espera abans de la centrifugació

Igual que en les dos variables anteriors, aquesta variable no té efectes sobre la robustesa del mètode. L'única diferència visual que es va poder observar va ser que en les mostres amb un temps d'espera major, el polímer anava precipitant de forma natural durant el període de repòs abans de la centrifugació (anàlisis 1, 4, 5 i 8).

7) Addició de NaOH 50%

L'addició de NaOH en la preparació de mostra es va comprovar, amb un dels productes de la família dels *Hostacerin*[®], que podia afavorir a la precipitació d'una major quantitat de polímer, de manera que s'aconseguia un líquid sobrenedant amb una concentració menor de polímer, fet que afavoreix a una menor contaminació de la columna augmentant, així, el seu temps de vida.

Estadísticament es va demostrar que no afectava a la robustesa del mètode. Visualment, es va observar que, efectivament, s'aconseguia una major quantitat de polímer precipitat (anàlisis 1, 4, 6 i 7).

*Observació: en l'anàlisi 4 es veu que el líquid sobrenedant és més tèrbol que la resta d'experiments, aquest fet podria deure's a que s'hagués trencat el polímer (donant lloc a un polímer de menor pes molecular) i a un temps de centrifugació menor, fet que va provocar que no es veiés un precipitat clar sinó una líquid sobrenedant tèrbol. Tot i així, es va poder filtrar correctament.

- Resultat final de la robustesa

Per tant, en base als resultats obtinguts per a l'*Aristoflex AVS*[®] el mètode presenta una robustesa força acceptable ja que dels set paràmetres estudiats només n'hi ha dos als quals el mètode és sensible.

Pel que fa als experiments amb *Hostacerin AMPS®* i *Aristoflex AVC®*, no es poden interpretar els seus resultats ja que en ambdós casos un dels vuit experiments no es va poder avaluar perquè no complia amb el criteri d'un mostra apta per ser injectada a l'equip (especificat en l'Annex 12.1). D'aquesta manera, el nombre de variables i experiments no concordava i els resultats es van considerar no precisos per poder treure conclusions vàlides.

10. MILLORA DEL MÈTODE

10.1. Estudi de l'efecte de l'addició de NaOH en la preparació de la mostra

Durant l'estudi de la robustesa es va comprovar que el fet d'addicionar NaOH en la preparació de la mostra augmentava la quantitat de polímer precipitat, fet que afavoria a l'obtenció d'un líquid sobrenedant amb una menor concentració de polímer, és a dir, menys contaminant per a l'equip. Per comprovar que aquest canvi en el mètode no afectava a l'obtenció dels resultats es va fer l'estudi següent:

Es van preparar un total de 20 mostres constituïdes pels diferents productes, *Hostacerin AMPS®*, *Aristoflex AVC®* i *Aristoflex AVS®*, de manera que fossin representatives del total de mostres.

L'estudi es va realitzar durant la mateixa jornada de treball per a evitar la introducció de més variables al resultat, de manera que aquest vingués determinat, només, per l'efecte de l'addició de NaOH i la seva proporció.

Cadascuna d'aquestes es va preparar sense addició de NaOH, amb addició de 0,2000g de NaOH i amb addició de 0,1000g de NaOH. La mostra sense addició es va fer per comprovar que els resultats amb addició no diferien d'aquesta, i les variacions amb la quantitat d'addició es van fer per comprovar quina quantitat era més favorable per a obtenir més polímer precipitat i obtenir un resultat òptim.

En la Taula-26 es mostren els resultats obtinguts.

Taula-26. Resultats de l'estudi de l'addició de NaOH en la preparació de mostra

Producte	Sense addició de NaOH		Amb addició de NaOH			
			0,1g NaOH		0,2g NaOH	
	Àrea (mAU)	ppm ATBS	Àrea (mAU)	ppm ATBS	Àrea (mAU)	ppm ATBS
Aristoflex AVC®	224,72	139	213,19	133	216,21	132
	41,69	27	57,50	36	56,12	36
	69,56	44	72,37	46	69,48	44
	63,02	40	42,88	28	-	-

	77,68	48	73,75	47	72,69	46
	1199,38	744	1219,51	755	1178,88	726
	2481,35	1527	2334,35	1421	2355,17	1468
Hostacerin AMPS®	115,03	72	113,90	71	4325,67	266
	130,98	82	133,03	83	214,48	138
	65,45	42	64,32	41	59,95	38
	76,88	48	150,70	95	131,53	80
	227,69	138	114,85	72	119,69	76
	66,90	42	66,60	43	65,54	41
	57,72	36	61,54	39	57,65	36
Aristoflex AVS®	382,63	232	412,65	254	376,13	231
	289,89	179	246,68	155	202,79	125
	240,41	149	265,55	163	241,26	151
	348,68	218	264,84	165	243,14	151
	288,43	182	356,77	221	338,10	214
	1109,27	683	640,32	405	600,43	372

*Observació. Tenint en compte el criteri d'acceptació per considerar una mostra apta per ser punxada a l'HPLC, tal i com s'ha descrit en l'Annex 12.1., la quarta mostra d'Aristoflex AVC® preparada amb addició de 0,2000g de NaOH no es va poder punxar.

Pel que fa a la resta de mostres, es va realitzar un test estadístic, test t-Student considerant dues mostres emparellades, per tal de comprovar si la modificació en la preparació de la mostra influïa significativament en el resultat.

✓ *Discussió de resultats*

Tant estadísticament, resultats exposats en la Taula-27, com visualment (Il·lustració-4), s'observa que una addició de 0,1000g de NaOH afavoreix a una precipitació més compacta evitant que hi hagi més polímer en suspensió deixant una fase líquida sobrenedant òptima per ser succionada amb una xeringa d'1ml i, posteriorment, ser filtrada en un vial de cromatografia i injectada a l'HPLC.

Per tant, tenint en compte que s'ha agafat un nombre de mostres representatives i els resultats obtinguts, l'addició d'aquesta modificació en el mètode afavoriria al manteniment de l'equip, més concretament, de la columna, fet que podria incrementar el seu temps de vida.

Taula-27. Resultats del test t-Student

Producte	+0,1g NaOH		+0,2gNaOH	
	t _{cal}	t _{tab} ($\alpha=0.5, 2\text{cues}$)	t _{cal}	t _{tab} ($\alpha=0.5, 2\text{cues}$)
<i>Aristoflex AVC</i> [®]	0.95	2.45	1.29	2.57
<i>Hostacerin AMPS</i> [®]	0.18	2.45	-1.01	2.45
<i>Aristoflex AVS</i> [®]	0.97	2.57	1.30	2.57
Conjunt	1.23	2.10	-0.81	2.10



Il·lustració-4. Mostres d'Aristofle AVS preparades sense, amb 0,1g i 0,2g de NaOH

11. CONCLUSIONS

English

By analyzing each of the results obtained from the different validation parameters, it is observed, first of all, that the linearity of the method provides favorable lines when quantifying the analyte of interest.

Concerning precision, it is concluded that at low levels of concentration the results can be affected but, nevertheless, the method is considered accepted because the levels of free ATBS in the products are in the middle of the calibration range.

Regarding the accuracy of the method, this is considered acceptable because in the case of low concentrations it is slightly higher than 100% and it does not present significant differences with it. In addition, knowing the above-mentioned lines, quantification at low levels of analyte is not interesting when analyzing real samples.

Finally, in reference to the robustness, the method is considered robust due to showing low alteration of the results for the case of Aristoflex family and no alteration for the case of Hostagel family, depending on the type of product, compared with the variation of the different parameters

In conclusion, the AC-TH501 method is considered valid to be used in quality control analyzes of products (as excipients) destined for the pharmaceutical sector.

Català

Analitzant cadascun dels resultats obtinguts dels diferents paràmetres de validació, s'observa, en primer lloc, que la linealitat del mètode aporta rectes favorables a l'hora de quantificar l'analit d'interès.

Pel que fa a la precisió, es conclou que a nivells baixos de concentració els resultats es poden veure afectats però, tot i així, el mètode es considera acceptat ja que l'especificació d'ATBS lliure en els productes es troba al centre del calibratge.

Quant a l'exactitud del mètode, aquesta es considera acceptable ja que tot i ser lleugerament superior al 100% (en el cas de concentracions baixes) no presenta diferències significatives amb aquest. A més, tenint en compte el que s'ha exposat unes línies més amunt, l'error relatiu a nivells baixos de concentració no afecta substancialment al resultat obtingut, ja que es molt inferior al valor màxim d'especificació acceptada per a aquest analit.

Finalment, en referència a la robustesa del mètode, es considera que el mètode és força robust en el cas del producte d' *Aristoflex AVS®* ja que mostra una alteració dels resultats

molt baixa enfront la modificació de les diferents variables. Pel que fa als altres dos productes, no s'han pogut treure conclusions vàlides.

Per tant, tenint en compte quin era l'objectiu principal, el mètode AC-TH501 es considera vàlid per ser utilitzat en anàlisis de control de qualitat de productes destinats al sector farmacèutic.

12. ANNEXOS

12.1. Criteri per considerar una mostra apta per ser punxada en l'HPLC

Com bé es sap, l'HPLC és un aparell molt sensible a ser contaminat amb restes polimèriques del producte en qüestió. A l'hora de fer els estudis, es va haver de proposar un criteri per seleccionar aquelles mostres que eren aptes o no per ser punxades a l'equip. Aquelles que mostraven terbolesa després de ser filtrades, no podien ser injectades ja que danyaven considerablement tot el circuit de l'aparell, a més de la columna cromatogràfica.

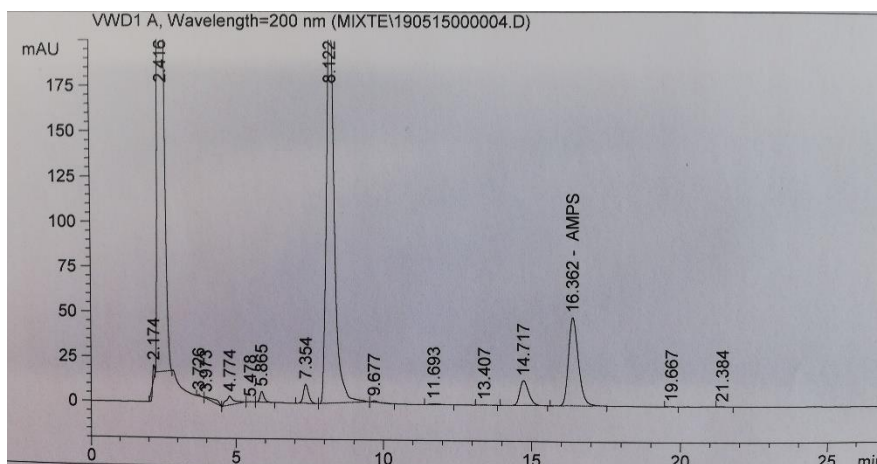
En la Il·lustració-5 es pot observar la diferència entre una mostra apta i una mostra no apta:



Il·lustració-5. Mostra apta per ser punxada en l'HPLC (esquerra) i mostra no apta per ser punxada en l'HPLC (dreta)

12.2. Cromatograma obtingut d'una mostra real

En la Il·lustració-6 es mostra un cromatograma obtingut d'una mostra real d'Aristoflex AVS®, en el que s'observa clarament el pic de l'ATBS a un temps de retenció de 16,36min.



Il·lustració-6. Cromatograma d'un mostra real d'Aristoflex AVS®

12.3. Taula de Youden Steiner

CONDICIÓ VARIABLE				ANÀLISIS							
Tipus	Clau	Valor alt X	Valor baix x	1	2	3	4	5	6	7	8
LaCl ₃	A,a	A	a	A	A	A	A	a	a	a	a
Temps centirfugació	B,b	B	b	B	B	B	b	B	b	b	b
Tipus d'agitació	C,c	C	c	C	c	C	c	C	c	C	c
Temps d'agitació	D,d	D	d	D	D	d	d	d	d	D	D
Ordre preparació	E,e	E	e	E	e	E	e	e	E	e	E
Temps espera pre centrifug.	F,f	F	f	F	f	f	F	F	f	f	F
Addició NaOH 50%	G,g	G	g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTAT (ppm)				s	t	u	v	w	x	y	z

12.4. Perillositat dels reactius utilitzats

Reactius	Perillositat	Precaucions	EPIs	Pictograma de perill
ATBS sòlid	Nociu en cas d'ingestió. Provoca lesions oculars greus. Pot irritar les vies respiratòries.	En cas de contacte amb els ulls aclarir amb aigua durant uns minuts.	Guants, ulleres, bata, mascareta.	
LaCl₃·7H₂O	Pot provocar al·lèrgies en contacte amb la pell. Provoca lesions oculars greus. Tòxic per als organismes aquàtics, amb efectes nocius duradors.	En cas de contacte amb la pell netejar amb aigua i sabó abundants. En cas de contacte amb els ulls netejar amb aigua durant uns minuts.	Guants, ulleres, bata.	
NaOH	Pot provocar irritació i/o cremades en contacte amb la pell. Provoca tos, dolor de coll i sensació de cremada per inhalació. En contacte amb els ulls provoca cremades greus. Per ingesta provoca cremades, vòmits, nàusees, dolor abdominal i <i>shock</i> o col·lapse.	En cas de contacte amb la pell, netejar amb abundant aigua. En cas d'inhalació respirar aire no contaminat i buscar assistència mèdica. En cas de contacte amb els ulls, netejar amb abundant aigua. En cas d'ingesta netejar la boca amb aigua, no provocar el vòmit, beure aigua i buscar assistència mèdica.	Guants, ulleres, bata, mascareta.	
KHSO₄	Per inhalació pot provocar tos i dolor de coll. En contacte amb la pell pot provocar vermellors i cremades. En contacte amb els ulls pot generar vermellors i cremades profundes greus. Per ingesta ocasiona dolor de coll i	En cas d'inhalació respirar aire pur i fer repòs. En cas de contacte amb la pell netejar bé amb aigua i enretirar la roba contaminada. En cas de contacte amb els ulls netejar amb abundant aigua i proporcionar assistència mèdica.	Extracció localitzada o mascareta, guants, ulleres, bata.	

	abdominal, sensació de cremada i <i>shock</i> o col·lapse.	En cas d'ingesta no provocar el vòmit, beure aigua i proporcionar assistència mèdica.		
KOH en lleties	Provoca cremades en l'estómac per ingestió. En contacte amb la pell pot provocar cremades greus. En cas de contacte amb el ulls pot provocar lesions oculars greus.	En cas d'inhalació respirar aire pur i fer repòs. En cas d'ingesta netejar la boca amb aigua i no provocar el vòmit. En cas de contacte amb la pell netejar bé amb aigua. En cas de contacte amb els ulls netejar amb abundant aigua.	Guants, ulleres, bata.	
KOH en solució 1M	Provoca cremades en l'estómac per ingestió. En contacte amb la pell pot provocar cremades greus. En cas de contacte amb el ulls pot provocar lesions oculars greus.	En cas d'inhalació respirar aire pur i fer repòs. En cas d'ingesta netejar la boca amb aigua i no provocar el vòmit. En cas de contacte amb la pell netejar bé amb aigua. En cas de contacte amb els ulls netejar amb abundant aigua.	Guants, ulleres, bata.	
ACN	Per inhalació provoca dolor de coll, debilitat, opresió de pit, vèrtig, nàusees i dificultat respiratòria. És d'absorció fàcil en contacte amb la pell. En contacte amb els ulls provoca dolor i enrogiment. Per ingestió provoca vòmits, nàusees, dolor abdominal i convulsions.	En cas d'inhalació respirar aire pur i fer repòs. En cas de contacte amb la pell i/o els ulls netejar amb abundant aigua. En cas d'ingesta, netejar la boca amb aigua, no provocar el vòmit i proporcionar assistència mèdica.	Guants, ulleres, bata i sistema de ventilació.	

13. BIBLIOGRAFIA

- [1] F.X. Rius, A. Maroto, R. Boqué, J. Riu; “La validación de métodos analíticos”. *Articles de divulgació*: Tarragona, 27 de març de 2019.
<www.quimica.urv.cat/quimio>
- [2] ISO 9000:2005 Quality management Systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva.
- [3] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.
- [4] B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, M. Aguilera, S. Sandoval; “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos”, Guía Técnica nº 1: Santiago, Diciembre de 2010.
- [5] Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una guía para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016).
<www.eurachem.org>
- [6] J. Riu, R. Boqué. “Calibratge Lineal”. *Articles de divulgació*. 28 de març de 2019
<www.quimica.urv.cat/quimio>
- [7] Castillo Aguilar, Beatriz y González Hernández, Ronaldo. “Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos”. *Rev Cubana Farm*, ene-abr. 1996, vol 30, nº 1, p.0-0. ISSN 0034-7515.
- [8] Swart, Michael E., Ira S. Krull. “Analytical Method Development and Validation”. Marcel Dekker, Inc. New York. 1997.
- [9] ISO 3534-1 Statistics – Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO, Ginebra, 1993.
- [10] A. Maroto, R.Boqué, J. Riu, F.X. Rius. “Incertidumbre y precisión”. *Articles de divulgació*. 28 de març de 2019.
<www.quimica.urv.cat/quimio>
- [11] B. Dejaegher, Y.V. Heyden. “Ruggedness and robustness testing”. *Review. Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 138-157.
<www.elsevier.com/locate/chroma>

[12] P. Bedregal, B. Torres, M. Ubillús, P. Mnedoza. "Aplicación de la prueba de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez del método de determinación multielemental en sedimento marino usando el análisis por activación neutrónica instrumental". Instituto Peruano de Energía Nuclear. Departamento de Química, Av. Canadá 1470, San Borja, Lima, Perú.

[13] "Anàlisis de productos cosméticos". Universitat de València. 27 de maig de 2019.
<https://www.uv.es/gidprl/multimedia%20medioambiente_industrial/analisis%20farmaceutico/anlisis_de_productos_cosmticos.html>