



---

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA  
DE INTERCAMBIO DE LIGANDO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
LOS ISÓMEROS DE LACTATO.**

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCION DE TITULACIÓN  
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

**ESTANCIA INDUSTRIAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO.**

PRESENTA:

**MARLEM GARCÍA BORGES.**

DIRIGIDA POR:

**M. EN C LETICIA ROMERO PONCE.**

**M. EN C MÓNICA RIOS LOZANO.**

**I.F JESUS MOISES MERCADO SANCHEZ.**

**I.F ISRAEL OCAMPO OCAMPO.**

**Mexico, D.F Julio 2015**



---

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA

**CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 03 de Julio del 2015, el que suscribe, Marlem García Borges, alumno del Programa Académico Ingeniería Biotecnológica con número de boleta 2010620035 , de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo escrito bajo la Dirección de M. en C Leticia Romero Ponce, M. en C Mónica Ríos Lozano, I.F Jesús Moisés Mercado Sánchez y el I.F Israel Ocampo Ocampo, cede los derechos del trabajo titulado Validación de un método analítico por cromatografía de intercambio de ligando para la cuantificación de los isómeros de lactato al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con los fines académicos que desarrolla.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser solicitado en la siguiente dirección de correo electrónico: [marlem.g@labcitec.mx](mailto:marlem.g@labcitec.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá citar la fuente y dar el agradecimiento correspondiente.

---

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

---



**SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**ACTA DE TRABAJO ESCRITO**

En la Ciudad de México el día 3 de Julio del 2015, siendo las 11:00 a.m. se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: Validación de un método analítico por cromatografía de intercambio de ligando para la cuantificación de los isómeros de lactato que presenta el alumno Marlem García Borges con número de boleta 2010620035, aspirante a Ingeniero Biotecnólogo.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

**COMISIÓN REVISORA.**

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma (Director Externo )

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma (Director Externo)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma (Director interno)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma (Evaluador)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma  
Presidente (Jefe de carrera)

## Autorización de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional**

**P r e s e n t e**

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Marlem García Borges, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada ***Validación de un método analítico por cromatografía de intercambio de ligando para la cuantificación de los isómeros de lactato.***, en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales ***para uso exclusivamente académicos y/o divulgación científica,*** “La Tesis” por un periodo de **5 años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 3 de Julio del 2015.

**Atentamente**

## **Dedicatoria.**

Aunque la higuera no florezca,  
Ni en las vides haya frutos,  
Aunque falte el producto del olivo,  
Y los labrados  
no den mantenimiento,  
Y las ovejas sean quitadas de la majada,  
Y no haya vacas en los corrales;  
Con todo, yo me alegraré en Jehová,  
Y me gozaré en el Elohim de mi salvación.  
El Señor es mi fortaleza,  
El cual hace mis pies como de ciervas,  
Y en mis alturas me hace andar.

## **Agradecimientos.**

Gracias a Elohim que me sustenta todos los días de mi vida. Gracias a mi familia que me comprende en todos los momentos. Gracias a mis amigas y amigos que me inspiraron con sus propios esfuerzos .Gracias a cada uno de mis asesores que me apoyaron con su paciencia y experiencia, especialmente a Lety y Moni que a lo largo de este trabajo fueron un apoyo fundamental.

Muchas gracias a todo el equipo Labcitec S.A de C.V que me ha dado la oportunidad de desarrollar mis competencias laborales y sobre todo gracias por que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

## Índice.

1	Introducción.	2
1.1	Descripción de la empresa.	2
1.1.1	Ubicación de la empresa.	2
1.2	Validación.	3
1.2.1	Parámetros de validación a evaluar en función del método.	3
1.2.2	Criterios de aceptación.	6
1.3	Isómeros D y L – Lactato.	8
1.4	Método validado en Labcitec S.A de C.V.	9
2	Justificación.	11
3	Objetivos.	11
4	Metodología.	12
4.1	Creación del plan de validación.	12
4.2	Ejecución del plan de validación.	13
4.3	Elaboración de informe de validación.	19
5	Resultados y análisis.	20
6	Conclusiones.	35
7	Recomendaciones.	35
8	Referencias.	36

## Índice de tablas.

Tabla 1. Parámetros de validación en función del tipo del método.	4
Tabla 2. Criterios de aceptación.	7
Tabla 3. Condiciones de análisis del método.	10
Tabla 4. Soluciones D – Lactato a partir del stock de referencia.	13
Tabla 5. Soluciones D – Lactato a partir de las soluciones obtenidas del stock.	14
Tabla 6. Soluciones L – Lactato a partir del stock de referencia.	14
Tabla 7. Soluciones L – Lactato a partir de las soluciones obtenidas del stock.	14
Tabla 8. Preparación de los niveles del 9 al 18 de la prueba de linealidad del sistema.	15
Tabla 9. Preparación de los niveles del 1 al 8 de la prueba de linealidad del sistema.	15
Tabla 10. Preparación de la solución a 0.7 mg/mL de ambos analitos.	16
Tabla 11. Preparación de solución 0.3 mg/mL L – Lactato y 0.4 mg/mL D – Lactato.	16
Tabla 12. Preparación de muestras adicionadas.	17
Tabla 13. Preparación de la muestra para repetibilidad y precisión intermedia.	18
Tabla 14. Métodos empleados en la robustez.	19
Tabla 15. Estimadores para la evaluación de linealidad D – Lactato.	21
Tabla 16. Estimadores para la evaluación de linealidad D – Lactato.	22
Tabla 17. Relación Señal-Ruido D y L – lactato.	23
Tabla 18. Precisión del límite de cuantificación D-Lactato.	23
Tabla 19. Precisión del límite de cuantificación D-Lactato.	23
Tabla 20. Estimadores de la linealidad del método para D – Lactato.	24
Tabla 21. Estimadores de la linealidad del método para L – Lactato.	25
Tabla 22. Recobro D- Lactato.	26
Tabla 23. Recobro L – Lactato.	27
Tabla 24. Resultados reproducibilidad.	27
Tabla 25. Resultados CV% global D-Lactato, precisión intermedia.	28
Tabla 26. Resultados CV% global L-Lactato, precisión intermedia.	28



Tabla 27. Estabilidad de la muestra en congelación.	29
Tabla 28. Estabilidad de la muestra en refrigeración.	29
Tabla 29. Estabilidad de la muestra en temperatura ambiente.	30
Tabla 30. Criterio de aceptación, robustez.	30
Tabla 31. Resultados robustez.	31
Tabla 32. Resumen de resultados, D - Lactato.	32
Tabla 35. Resumen de resultados, L – Lactato.	34

## Índice de gráficos.

Gráfico 1. Logotipo Labcitec S.A de C.V.	2
Gráfico 2. Ubicación Labcitec S.A de C.V	3
Gráfico 3. Estructura química de los isómeros de lactato.	9
Gráfico 4. Mecanismo de selectividad y retención.	10
Gráfico 5. Diagrama general de la metodología	12
Gráfico 6. Linealidad del sistema D –Lactato	20
Gráfico 7. Linealidad del sistema L –Lactato	21
Gráfico 8. Linealidad del método D- Lactato.	24
Gráfico 9. Linealidad del método L- Lactato.	25
Gráfico 10. Rango de trabajo D-lactato	25
Gráfico 11. Rango de trabajo L-lactato	26
Gráfica 12. Espectro de absorción del estándar de referencia D- Lactato.	31
Gráfico 13. Espectro de absorción D-Lactato en la muestra	32
Gráfico 14. Espectro de absorción del estándar de referencia L- Lactato	32
Gráfico 15. Espectro de absorción de L-Lactato, en la muestra.	33
Gráfico 16. Espectro de absorción 3D de la muestra.	33

## Resumen.

Parte fundamental del sistema de control de calidad en un laboratorio de análisis, es la validación de los métodos analíticos, puesto que genera confianza en los resultados obtenidos en el laboratorio.

En el presente trabajo se realizó la validación de un método analítico, para la identificación y cuantificación de los isómeros de Lactato por cromatografía de intercambio de ligando en HPLC, (cromatografía líquida de alta resolución), desarrollado en Labcitec S.A de C.V.

Los parámetros de validación evaluados fueron: Especificidad, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia), estabilidad de la muestra y robustez del método.

Los resultados correspondientes a cada uno de los parámetros evaluados indican que el método desarrollado es lineal en el intervalo de concentración de 0.02 mg/mL a 2.5 mg/mL para los analitos D y L lactato, con un coeficiente de correlación mayor a 0.999, es exacto ya que se obtuvieron porcentajes de recobro dentro del intervalo especificado, mayor a 98 % y menor a 20%, es preciso por que se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1.5 %, es robusto porque no es sensible a pequeñas modificaciones en temperatura, velocidad de flujo, volumen de inyección y composición de fase móvil, es específico para cada uno de los analitos de interés y se demostró además, que las muestras permanecen estables durante 24 h en congelación.

Por lo que el método desarrollado cumple con los criterios de aceptación propuestos.

## 1. Introducción.

Dentro de un laboratorio de análisis se realizan diversas determinaciones, donde se obtienen datos de concentración, composición y características de una matriz específica. Los valores obtenidos son importantes para diferentes áreas de estudio: farmacéutica, alimenticia, biotecnológica, ambiental, entre otras, pues a partir de estos resultados se toman decisiones sobre un producto o proceso.

Es por eso que los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos deben ser validados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen resultados confiables, ya que sin fiabilidad en los resultados no es posible asegurar que un producto cumpla con las especificaciones previstas.

La validación permite demostrar a los laboratorios que sus métodos de análisis son los adecuados para un compuesto en específico en una determinada matriz.

### 1.1 Descripción de la empresa.

Labcitec S.A de C.V, (<http://www.labcitec.mx/>) (1), es una empresa 100% mexicana fundada en el año 2009 dedicada a promover el desarrollo científico y tecnológico, basando su política empresarial en cuatro ejes principales: 1) Investigación, 2) Desarrollo, 3) Cursos y Divulgación y 4) Venta y distribución. El logo de la empresa se muestra en Figura 1.

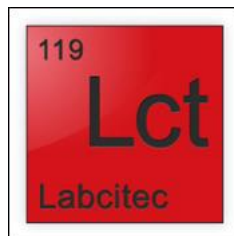


Gráfico 1. Logotipo de la empresa Labcitec S.A de C.V.  
Representa un nuevo elemento indispensable en el desarrollo de la ciencia.

Para realizar las labores de investigación y desarrollo Labcitec S.A de C.V cuenta con laboratorios de investigación en el que actualmente colaboran un grupo de investigadores con grado de Doctores y Maestros en ciencias en las áreas de genética, biología molecular, biotecnología y análisis químico.

### 1.1.1 Ubicación de la empresa.

Labcitec S.A de C.V está ubicada en Atzacocalco # 95 colonia Constitución de La República, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07469, en la ciudad de México, D.F (Figura 2).

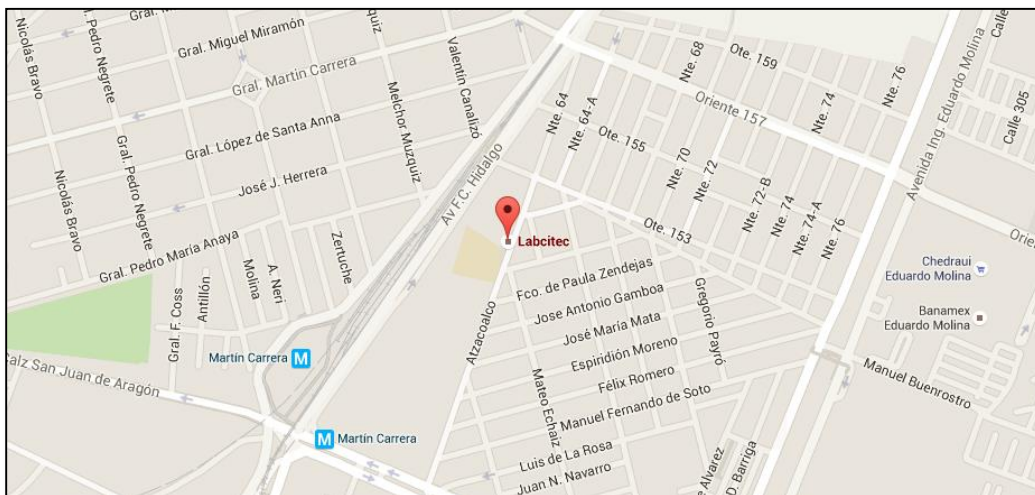


Gráfico 2. Ubicación Labcitec S.A de C.V. Señalada por el indicador, la empresa ha desempeñado en esta locación sus labores desde 2009.

### 1.2 Validación.

Un método analítico es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado. (USP, 30)<sup>(2)</sup>.

La validación de un método analítico garantiza la calidad y confianza de los resultados obtenidos por el método validado.

Según la NMX EC 17025, norma mexicana, la validación es “La confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso propuesto” (NMX EC 17025 IMNC 2006) <sup>(3)</sup>.

También la NOM-164-SSA1-2013, norma oficial mexicana, define a la validación de la siguiente manera: “La evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, basadas en conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y robustez.” (NOM-164-SSA1-2013)<sup>(4)</sup>.

---

UPIBI/IPN Validación de un método analítico por cromatografía líquida de intercambio de ligando para cuantificación de los isómeros de Lactato.

Los parámetros que deben considerarse en la validación de un método analítico son: Exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo de trabajo, robustez y estabilidad de la muestra analítica.

### 1.2.1 Parámetros de validación a evaluar en función del tipo de método.

De acuerdo a la Organización mundial de salud, (OMS) (2), los métodos analíticos tienen la siguiente clasificación:

Clase A: Pruebas de identificación. Se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra.

Clase B: Pruebas para detectar y cuantificar impurezas. Aquí se determinan valores límites para el control de impurezas.

Clase C: Pruebas para determinar cuantitativamente la concentración del analito.

Clase D: Pruebas para evaluar las características del analito en producto terminado.

Cabe mencionar que en función al tipo del método se requiere evaluar diferentes parámetros de validación (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros de validación en función del tipo del método.

<b>Método</b> <b>Parámetro</b>	<b>A</b> <b>identificación</b>	<b>B</b> <b>Cuantitativa</b> <b>(impurezas)</b>	<b>B</b> <b>Cualitativa</b> <b>(impurezas)</b>	<b>C</b> <b>Cuantitativa</b> <b>(producto)</b>	<b>D</b> <b>características</b>
Exactitud	-	x	-	x	x
Precisión	-	x	-	x	x
Robustez	x	x	x	x	x
Linealidad e intervalo	-	x	-	x	x
Especificidad	x	x	x	x	x
Límite de detección	x	-	x	-	-
Límite de cuantificación	-	x	-	-	-

**Leyenda:**

**X evaluación del parámetro, - No es necesario que se evalué este parámetro.**

Para el presente proyecto se evaluaron, especificidad, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango de trabajo, estabilidad de la muestra y robustez los cuales se definen a continuación:

a) Especificidad.<sup>(5)</sup>

Es la capacidad del método para identificar el analito en presencia de interferencia, es decir distinguir la respuesta del analito dentro de una matriz.

b) Precisión.<sup>(5)</sup>

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba. Es la medida de cuán cerca están los valores entre si para un número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas. La precisión de un método analítico generalmente se analiza a través de:

Repetibilidad.<sup>(5)</sup>

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por un mismo analista bajo condiciones iguales como equipo, reactivo e intervalos de tiempo.

Precisión intermedia.<sup>(5)</sup>

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Reproducibilidad.<sup>(5)</sup>

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y en diferentes laboratorios. La reproducibilidad mide las desviaciones interlaboratorios.

c) Exactitud.<sup>(5)</sup>

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos empleando el método y el valor real. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas del analito.

d) Límite de detección.<sup>(5)</sup>

Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas.

e) Límite de cuantificación. (5)

Se define como la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones establecidas.

f) Linealidad y rango. (5)

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito, incluyendo estos valores, que se ha demostrado son determinados con precisión, exactitud y linealidad.

El rango del método se valida comprobando que el método analítico proporciona una precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del rango así como dentro del rango.

g) Estabilidad de la muestra. (5)

Propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas.

h) Robustez. (5)

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

### 1.2.2 Criterios de aceptación.

Los criterios de aceptación son lineamientos bajo los cuales un resultado se considera aceptable. Estos criterios de aceptación se encuentran especificados dentro de normas, guías y/o documentos técnicos emitidos por instituciones, comités y/o publicaciones reconocidas internacionalmente, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), United States Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP), American Society for Testing Materials (ASTM), International Standard Organization (ISO).

En la Tabla 2 se presentan los criterios de aceptación utilizados en el presente trabajo.



Tabla 2. Criterios de aceptación.

Parámetro	Criterio de aceptación	Referencia
Linealidad del sistema	Coeficiente determinación $r^2 \geq 0.999$ Gráfico de residuales.	5
	Prueba de t-student hipótesis nula $H_0$ si $t_{\text{tabla}}$ es mayor que $t_{\text{calculada}}$ no existe linealidad. Por lo tanto: $t_{\text{calculada}} > t_{\text{tabla}}$	6
Precisión del sistema	Precisión Coeficiente de variación CV% <1.5	5
Límite de detección (LD)	LD Señal-ruido > 3	6
Límite de cuantificación (LC)	LC Señal-ruido >10	5
	Precisión Coeficiente de variación CV% <1.5	5
Rango de trabajo	Coeficiente determinación $r^2 \geq 0.999$ Pendiente (m) cercana a un valor de 1	5
	Prueba de t-student hipótesis nula $H_0$ si $t_{\text{tabla}}$ es mayor que $t_{\text{calculada}}$ no existe linealidad. Por lo tanto: $t_{\text{calculada}} > t_{\text{tabla}}$	6

Parámetro	Criterio de aceptación	Referencia
Exactitud	Recobro % >98%	5
	Recobro % <102%	6
Precisión intermedia	Prueba de t- student, no existen diferencias significativas si $t_{calculada} < t_{tabla}$	5
Repetibilidad	Precisión Coeficiente de variación CV% ≤ 2	6
Robustez	Coefficiente de variación CV% ≤ 2	5
	Diferencia absoluta de cada variable con respecto a la variable normal debe ser ≤ 2.0% Para la prueba de Robustez de Younden y Steiner: la diferencia entre el valor alto y el valor bajo debe ser menor a $\sqrt{2}$ la desviación estándar de la precisión del método (S)	6
Estabilidad de la muestra	Diferencia absoluta ≤ 2.0%	5
Especificidad	El o los máximo(s) de absorción obtenidos en el espectro del analito de interés en la solución muestra, deberá ser similar o igual al de la referencia. Pureza de pico: El valor del Factor de comparación de Pureza de Pico deberá ser arriba de 990 lo cual nos indica que el pico esta puro. Valores entre 900 a 990 nos indica que el pico probablemente este impuro. Cuando los valores individuales del PPI forman un rectángulo	5

### 1.3 Isómeros de Lactato.

El lactato es un compuesto químico con tres carbonos: un átomo de carbón terminal que es parte de un grupo carboxílico; el otro átomo de carbón terminal es parte de un metilo; y el átomo de carbón central está unido a un grupo alcohol. Existen dos esteroisómeros del lactato el L (+) y D (-) Lactato (Figura 4), que desempeñan importantes roles en diversos procesos bioquímicos. El lactato es utilizado en la industria alimenticia, farmacéutica, química, textil entre otras. <sup>(9)</sup>

En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable. En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable. <sup>(9)</sup>

El lactato puede ser obtenido por vía química o biológica. La producción química, está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico. (9)

La producción biológica está basada en la fermentación de sustratos, ricos en carbohidratos, por bacterias u hongos o bien utilizando enzimas, cabe mencionar que depende del isómero (D o L) que se desee obtener, es la enzima que se emplea en el proceso (9)

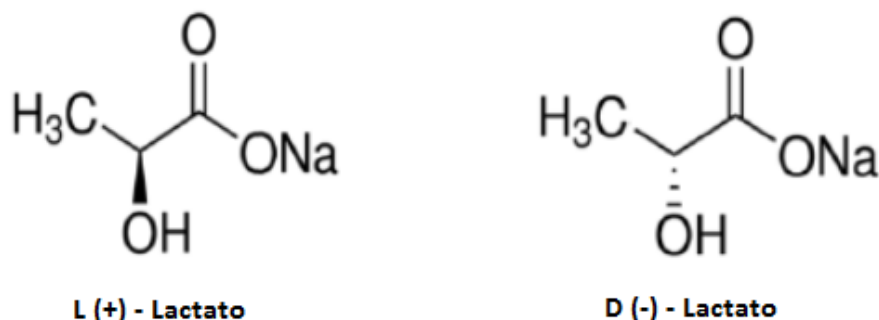


Gráfico 3. Estructura química de los isómeros de lactato, se observa el carbono quiral unido a 4 grupos diferentes en donde la posición de cada grupo define el giro de la molécula.

#### 1.4 Método validado en LABCITEC S. A. de C.V.

El método validado fue desarrollado para identificar y cuantificar los isómeros D y L – lactato por cromatografía de intercambio de ligando en HPLC, LCT01-PRO-DAQ-035.

Este tipo de cromatografía utiliza fase reversa común como fase estacionaria (C18 o C8) y una fase móvil quiral que consiste en un intercambiador de ligando que funciona como un selector de quiralidad y éste a su vez es inmovilizado por un ion metálico como el Cu (II) referencia.

Como selector quiral, pueden emplearse L-aminoácidos, debido a la configuración L, este tipo de enantiómeros permiten enlazarse al ion metálico, lo que para la configuración D es imposible debido al impedimento estérico que existe. (V. A. Davankov, 2000) (7)

El mecanismo de selectividad de los enantiómeros D y L al emplear éste método, radica en la formación de un complejo entre el L-aminoácido y el analito de interés con el ion metálico (Cu(II)), por otro lado, el mecanismo de retención de los analitos de interés, radica en la parte hidrofóbica del aminoácido mediante el cual es retenido por la fase estacionaria de la columna, fase hidrofóbica, (Gráfico 4).

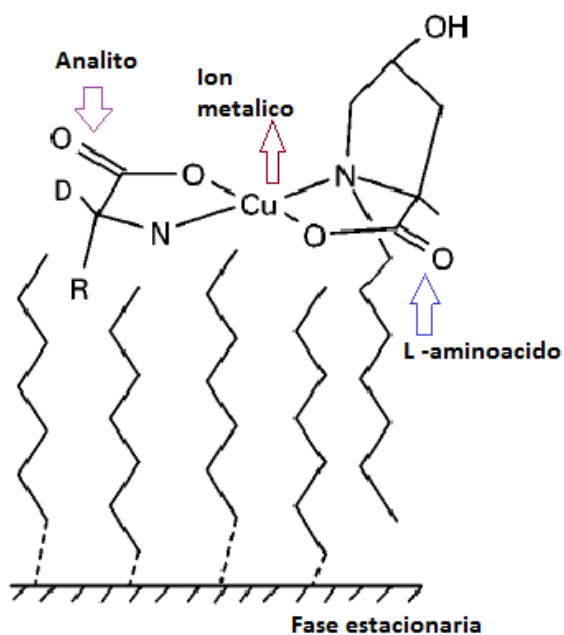


Gráfico 4. Mecanismo de selectividad y retención. (V. A. Davankov, 2000) (7)

Para este método se utilizó como selector quiral L- isoleucina y como ion metálico cloruro cúprico.

Las condiciones generales del método se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de análisis del método.

Variable	Valor
Columna	Polaris C-18, 250X4.6 mm, 5 $\mu$
Temperatura columna	5°C
Detector	UV, 265 nm
Fase móvil	Solución de L- isoleucina (8mM) con Cloruro Cúprico (4mM)
Flujo fase móvil	0.3 mL/min
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Tiempo de corrida	25 min

## **2. Justificación.**

La producción de D y/o L - Lactato en Labcitec S.A de C.V es de interés para emplearlo en diferentes procesos, por lo que es importante la identificación y cuantificación de este compuesto.

Para garantizar la confiabilidad, seguridad y calidad de los resultados emitidos por el área de Análisis Químicos, el método empleado para la identificación y cuantificación de D y L lactato debe estar debidamente validado y cumplir con los requisitos de linealidad, límite de detección y cuantificación, rango de trabajo, exactitud, precisión y robustez.

Cabe mencionar que esta confianza y seguridad en el método analítico se traduce en disminución de repeticiones y permite cumplir los plazos previstos para el análisis.

Debido a que el método utilizado para la identificación y cuantificación de los analitos D y L – lactato fue desarrollado en Labcitec S.A de C.V y no se encuentra normalizado, es necesario realizar una validación que respalde la calidad del método.

## **3. Objetivos.**

### **3.1 Objetivo general.**

Demostrar a través de evidencia documentada, que el método de identificación y cuantificación de D y L láctico por cromatografía de intercambio de ligando por HPLC, cumple con los criterios de aceptación establecidos para cada parámetro de desempeño analítico.

### **3.2 Objetivos particulares.**

Realizar un plan de validación para el método de identificación y cuantificación de D y L láctico por cromatografía de intercambio de ligando por HPLC.

Elaborar el reporte de validación correspondiente.

## 4. Metodología

Para lograr los objetivos planteados, la metodología se dividió en tres etapas las cuales pueden resumirse en el diagrama de flujo (Gráfico 5).

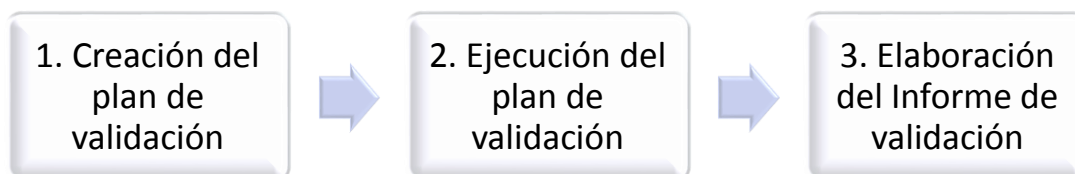


Gráfico 5. Diagrama general de la metodología, ilustra los pasos base en la validación de un método analítico.

### 4.1 Creación del plan de validación.

El plan de validación es un documento en el cual se definen previamente las pruebas o parámetros de validación necesarios, el diseño experimental a desarrollar con base a los requerimientos del método y los criterios de aceptación para cada parámetro (8).

El plan de validación contiene (8):

- Título: Se indica el nombre y clave del método que se pretende validar.
- Objetivo: Se consideran los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
- Campo de aplicación: Se indica el tipo de producto (s) para los cuales aplica la validación.
- Equipo: Se realiza una descripción general del equipo a utilizar en la validación.
- Materiales: Se indica los materiales a utilizar
- Reactivos: Se indica el nombre de los reactivos a utilizar.
- Preparación de las soluciones de trabajo.
- Preparación de la soluciones de referencia.
- Muestras: Se indica las características, forma de almacenamiento y cantidades de muestra estimadas para llevar a cabo la validación.
- Desarrollo experimental: Se describen las instrucciones para cada uno de los parámetros de desempeño a ensayar.
- Resultados: se hace una propuesta del formato de registro.
- Análisis estadístico: Se establece para cada parámetro de desempeño la herramienta estadística a utilizar para su evaluación.
- Criterios de aceptación: Se establecen los criterios de aceptación que deben cumplirse.
- Bibliografía: Referencias utilizadas.

## 4.2 Ejecución del plan de validación.

De acuerdo al plan de validación se evaluaron cada uno de los siguientes parámetros.

i) Preparación de las soluciones utilizadas.

Diluyente de trabajo: solución de L-isoleucina (8mM) con Cloruro Cúprico (4mM) en agua.

- 1) Etiquetar frasco schott de 1L con los siguientes datos:  
Solución de isoleucina (8mM) con cloruro cúprico (4mM) en agua, fecha.
- 2) Pesar, en una charola, 1.04939 gramos de L - isoleucina
- 3) Pesar, en una charola, 0.5378 gramos de cloruro cúprico
- 4) Disolver en un litro de agua bi- destilada la sal y el aminoácido pesado
- 5) Filtrar la solución.

ii) Solución stock de referencia.

1. Pre-identificar 2 tubos falcon de 15 mL con los datos siguientes:
  - a. D-lactato 10 mg/mL (fecha) stock de referencia
  - b. L-lactato 10 mg/mL (fecha) stock de referencia
2. Pesar 125.811 mg de D - Lactato y transferir al tubo falcon pre- identificado. Adicionar 10 mL de diluyente, agitar con vortex durante 30 minutos.
3. Pesar 125.811 mg de L - Lactato y transferir al tubo falcon. Adicionar 10 mL de diluyente, agitar con vortex durante 30 minutos.

iii) Soluciones de L y D – Lactato a diferentes concentraciones.

En las Tablas 4, 5, 6 y 7 se muestran la preparación de soluciones de L y D –Lactato utilizadas en la linealidad del método.

Tabla 4. Soluciones D – Lactato, a partir del stock de referencia.

Solución #	Concentración D–lactato [mg/mL]	Alícuota stock D – lactato [mL]	Alícuota de diluyente [mL]
1 D	8.6	0.86	0.14
2 D	7.15	0.715	0.285
3 D	5.73	0.573	0.427
4 D	4.29	0.429	0.571
5 D	2.86	0.286	0.714
6 D	2	0.2	0.800

<b>7 D</b>	1.43	0.143	0.857
<b>8 D</b>	0.86	0.086	0.914

Tabla 5. Soluciones D – Lactato, preparadas a partir de las soluciones obtenidas del stock de referencia.

<b>Solución #</b>	<b>Concentración D-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Alícuota de la solución indicada [mL]</b>	<b>Alícuota de diluyente</b>
<b>9 D</b>	0.286	Tomar 0.100 de 5 D	0.900
<b>10 D</b>	0.2	Tomar 0.100 de 6D	0.900
<b>11 D</b>	0.143	Tomar 0.100 de 7D	0.900
<b>12 D</b>	0.086	Tomar 0.100 de 8D	0.900
<b>13 D</b>	0.0286	Tomar 0.100 de 9D	0.900
<b>14 D</b>	0.02	Tomar 0.100 de 10 D	0.900
<b>15 D</b>	0.0143	Tomar 0.100 de 11D	0.900
<b>16 D</b>	0.0086	Tomar 0.100 de 12 D	0.900
<b>17 D</b>	0.00286	Tomar 0.100 de 13 D	0.900

Tabla 6. Soluciones L – Lactato, preparadas a partir del stock de referencia.

<b>Solución #</b>	<b>Concentración L-lactato [mg/mL]</b>	<b>Alícuota stock L-lactato [mL]</b>	<b>Alícuota de diluyente [mL]</b>
<b>1 L</b>	8.6	0.86	0.14
<b>2 L</b>	7.15	0.715	0.285
<b>3 L</b>	5.73	0.573	0.427
<b>4 L</b>	4.29	0.429	0.571
<b>5 L</b>	2.86	0.286	0.714
<b>6 L</b>	2	0.2	0.800
<b>7 L</b>	1.43	0.143	0.857
<b>8 L</b>	0.86	0.086	0.914

Tabla 7. Soluciones L – Lactato, preparadas a partir de las soluciones obtenidas del stock de referencia.

<b>Solución #</b>	<b>Concentración L-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Alícuota de la solución indicada [mL]</b>	<b>Alícuota de diluyente</b>
<b>9 L</b>	0.286	Tomar 0.100 de 5 D	0.900
<b>10 L</b>	0.2	Tomar 0.100 de 6D	0.900
<b>11 L</b>	0.143	Tomar 0.100 de 7D	0.900



<b>12 L</b>	0.086	Tomar 0.100 de 8D	0.900
<b>13 L</b>	0.0286	Tomar 0.100 de 9D	0.900
<b>14 L</b>	0.02	Tomar 0.100 de 10 D	0.900
<b>15 L</b>	0.0143	Tomar 0.100 de 11D	0.900
<b>16 L</b>	0.0086	Tomar 0.100 de 12 D	0.900
<b>17 L</b>	0.00286	Tomar 0.100 de 13 D	0.900

iv) Linealidad del sistema.

Se realizaron diluciones (Tablas 8 y 9), a partir de un stock de referencia con una concentración de D – lactato de 10 mg/mL y un stock de referencia con una concentración de L – lactato de 10 mg/mL, se prepararon 25 niveles con concentraciones desde 0.005 mg/mL hasta 5mg/mL de L y D – lactato, estas diluciones se prepararon por triplicado. Se construyó una curva de calibración en donde el eje de las “x” corresponde a la concentración y el eje de las “y” corresponde al área obtenida para cada concentración.

Tabla 8. Preparación de los niveles del 9 al 18 de la prueba de linealidad del sistema.

Nivel	Alícuota stock de referencia D-Lactato [mL]	Alícuota stock de referencia L-Lactato [mL]	Alícuota diluyente [mL]	Concentración D-Lactato [mg/mL]	Concentración L-Lactato [mg/mL]
<b>11</b>	0.040	0.040	0.920	0.4	0.4
<b>12</b>	<b>0.050</b>	0.050	0.900	0.5	0.5
<b>13</b>	0.060	0.060	0.880	0.6	0.6
<b>14</b>	0.070	0.070	0.860	0.7	0.7
<b>15</b>	0.080	0.080	0.840	0.8	0.8
<b>16</b>	0.090	0.090	0.820	0.9	0.9
<b>17</b>	0.100	0.100	0.800	1	1
<b>18</b>	0.150	0.150	0.700	1.5	1.5
<b>19</b>	0.200	0.200	0.600	2	2
<b>20</b>	0.250	0.250	0.500	2.5	2.5
<b>21</b>	0.300	0.300	0.400	3	3
<b>22</b>	0.350	0.350	0.300	3.5	3.5
<b>23</b>	0.400	0.400	0.200	4	4
<b>24</b>	0.450	0.450	0.100	4.5	4.5
<b>25</b>	0.5	0.5	-----	5	5

Tabla 9. Preparación de los niveles del 1 al 8 de la prueba de linealidad del sistema.

Nivel	Alícuota tomada del nivel indicado [mL]	Alícuota del diluyente [mL]	Concentración D-Lactato [mg/mL]	Concentración L-Lactato [mg/mL]
1	0.100 del nivel 3	0.900	0.0005	0.0005
2	0.100 del nivel 5	0.900	0.001	0.001
3	0.100 del nivel 6	0.900	0.005	0.005
4	0.100 del nivel 7	0.900	0.007	0.007
5	0.100 del nivel 8	0.900	0.01	0.01
6	0.100 del nivel 11	0.900	0.05	0.05
7	0.100 del nivel 13	0.900	0.07	0.07
8	0.100 del nivel 16	0.900	0.1	0.1
9	0.100 del nivel 18	0.900	0.2	0.2
10	0.100 del nivel 20	0.900	0.3	0.3

v) Precisión del sistema.

Se realizó preparando 6 soluciones, tabla 6, a una concentración de 0.7 mg/mL de L y D – lactato a partir de un stock de referencia con una concentración de D – lactato de 10 mg/mL y un stock de referencia con una concentración de L – lactato de 10 mg/mL, cada una de las 6 soluciones preparadas se programaron e inyectaron con las condiciones cromatográficas del método analítico a validar. Se evaluaron las áreas obtenidas estadísticamente.

Tabla 10. Preparación de la solución a 0.7 mg/mL de ambos analitos.

Alícuota stock de referencia D-lactato [mL]	Alícuota stock de referencia L-lactato [mL]	Alícuota diluyente [mL]	Concentración D-Lactato [mg/mL]	Concentración L-Lactato [mg/mL]
0.070	0.070	0.860	0.7	0.7

vi) Límite de detección.

A partir de las inyecciones de las concentraciones más bajas programadas en la linealidad del sistema se obtuvo la relación señal ruido de cada una de ellas y se observó cuál cumplía con el criterio de aceptación.

vii) Límite de cuantificación.

Se prepararon 6 soluciones, con una concentración de 0.04 mg/mL de D - lactato y 0.03 mg/mL de L – lactato a partir de la solución que se muestra en la Tabla 11, se tomó 0.1 mL y se agregó 0.9 ml de diluyente. Se evaluaron las áreas obtenidas estadísticamente.

Tabla 11. Preparación de solución 0.3 mg/mL L – Lactato y 0.4 mg/mL D – Lactato.

Alícuota stock de referencia D-lactato [mL]	Alícuota stock de referencia L-lactato [mL]	Alícuota diluyente [mL]	Concentración D-Lactato [mg/mL]	Concentración L-Lactato [mg/mL]
0.040	0.030	0.930	0.4	0.3

viii) Linealidad del método.

Se evaluó agregando estándar de referencia de L y D-lactato a las muestras de fermentación, (F68), las concentraciones adicionadas fueron de 0.05 mg/mL hasta 2.5 mg/mL de L y D – lactato, (Tabla 12), cada una de las muestras adicionadas se preparó por triplicado. Se realizó una curva de calibración colocando en el eje de las “x” la concentración de las muestras y en el eje de las “y” la respuesta área.

Tabla 12. Preparación de muestras adicionadas.

Nivel	Concentración L y D –Lactato [mg/mL]	Alícuota de la solución indicada [mL]	Alícuota de la solución indicada [mL]	Alícuota de muestra [mL]
1	2.5	0.350 de 2D	0.350 de 2L	0.300
2	2	0.350 de 3D	0.350 de 3L	0.300
3	1.5	0.350 de 4D	0.350 de 4L	0.300
4	1	0.350 de 5D	0.350 de 5L	0.300
5	0.7	0.350 de 6D	0.350 de 6L	0.300
6	0.5	0.350 de 7D	0.350 de 7L	0.300
7	0.3	0.350 de 8D	0.350 de 8L	0.300
8	0.1	0.350 de 9D	0.350 de 9L	0.300
9	0.07	0.350 de 10 D	0.350 de 10 L	0.300
10	0.05	0.350 de 11D	0.350 de 11L	0.300

ix) Rango de trabajo.

A partir de las muestras adicionadas, programadas en la linealidad del método, se calculó la cantidad recuperada para cada concentración de muestra adicionada y posteriormente se graficó la cantidad recuperada vs la cantidad adicionada para cada analito, D y L – lactato.

x) Exactitud.

A partir de las muestras adicionadas, programadas en la linealidad del método, se obtuvo el porcentaje de recobro.

xi) Repetibilidad.

Se prepararon 6 diluciones (Tabla 13), de una muestra de fermentación, (F68), cada muestra se programó e inyectó a las mismas condiciones que el método analítico a validar, por un solo analista, se evaluó estadísticamente las áreas obtenidas.

Tabla 13. Preparación de la muestra para repetibilidad y precisión intermedia.

<b>Alícuota muestra, F68 [mL]</b>	<b>Alícuota diluyente [mL]</b>	<b>Concentración D-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Concentración L-Lactato [mg/mL]</b>
0.075	0.825	0.39	0.27

xii) Precisión intermedia.

Se evaluó con dos analistas y en dos días diferentes, cada analista preparo por día 6 diluciones, (Tabla 13), de una muestra de fermentación (F68), estas se programaron e inyectaron cada día de análisis. Se evaluó estadísticamente las áreas obtenidas.

xiii) Estabilidad de la muestra.

Se evaluó una muestra proveniente de fermentación (F68), en 3 tiempos diferentes en condiciones diferentes: en congelación, refrigeración y ambiente. Se evaluó la diferencia absoluta entre la concentración inicial de los analitos de interés y la concentración de estos en cada tiempo y condición evaluados.

xiv) Selectividad.

Se comparó el espectro producido por el estándar de referencia de cada analito de interés contra el espectro producido por la muestra de fermentación, se evaluó la pureza de pico.

xv) Robustez.

Se evaluó a través de la prueba de Younden y Steiner, las variables que se estudiaron fueron temperatura, volumen de inyección, flujo de fase móvil, fase móvil, (Tabla 14).

Tabla 14. Métodos empleados en la robustez.

Variable	Condición alta	Condición baja	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5	Método 6	Método 7	Método 8
Temperatura Columna °C	10	7	10	10	10	10	7	7	7	7
Flujo fase mL/min	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2
Volumen de inyección µL	12	8	12	8	12	8	12	8	12	8
Fase Isoleucina 8mM	Isoleucina 9mM	Isoleucina 7 mM	Isoleucina 9mM	Isoleucina 9mM	Isoleucina 7 mM	Isoleucina 7 mM	Isoleucina 7 mM	Isoleucina 7 mM	Isoleucina 9mM	Isoleucina 9mM
Cloruro cúprico 4mM	Cloruro Cúprico 4.5 mM	Cloruro Cuprico 3.5 mM	Cloruro Cúprico 4.5 mM	Cloruro Cúprico 4.5 mM	Cloruro Cuprico 3.5 mM	Cloruro Cuprico 3.5 mM	Cloruro Cuprico 3.5 mM	Cloruro Cuprico 3.5 mM	Cloruro Cúprico 4.5 mM	Cloruro Cúprico 4.5 mM

### 4.3 Informe de validación.

El Informe de validación es un documento en el cual se reportan los resultados de cada uno de los parámetros evaluados en la validación y se establece si el método cumple o no con los criterios de aceptación. (8)

El informe de validación contiene (8):

- Título: Informe de resultados de validación parcial o total (según aplique).
- Objetivo: Considerar los parámetros de desempeño evaluados y el analito determinado.
- Campo de aplicación: Indicar el tipo de producto (s) para los cuales aplicó la validación
- Antecedentes: Hacer una breve explicación de las características del analito, su importancia, así como las especificaciones nacionales e internacionales establecidos para este.
- Equipo: Descripción del nombre, marca, modelo, número de serie.
- Materiales: Descripción de nombre, marca y lote del material de uso general utilizado.
- Reactivos: Indicar el nombre, marca, pureza, presentación y lote de los reactivos utilizados.
- Muestras: Indicar las características, forma de almacenamiento, marca, presentación, caducidad y cantidades de muestra utilizadas para llevar a cabo la validación.
- Desarrollo experimental: Detallar como se llevaron a cabo los ensayos de cada uno de los parámetros de desempeño.
- Resultados: Presentación de resultados en forma de tablas.

- Análisis de resultados Presentar en forma de tabla los criterios de aceptación considerados y los resultados obtenidos y hacer las observaciones correspondientes.
- Observaciones: Se indican recomendaciones.
- Desviaciones encontradas: Indicar que cambios se realizaron durante la validación.
- Control de cambios: se establece el seguimiento a las desviaciones encontradas y cambios realizados durante y posterior a la validación.
- Referencias normativas: Escribir la normatividad utilizada.
- Mantenimiento del estado validado: Se indica la vigencia del estado validado del método.
- Conclusiones: Se establece si el método cumple o no cumple con las especificaciones.
- Aprobación del documento: Firma de aprobación, quien lo realizó y reviso.
- Bibliografía: Referencias utilizadas

## 5. Resultados y análisis.

### i) Linealidad del sistema.

Se analizaron concentraciones desde 0.0005 mg/mL hasta 5mg/mL para D y L- lactato, observando una respuesta lineal en un intervalo de concentraciones de 0.02 mg/mL hasta 2.0 mg/mL para ambos analitos (Gráficos 6 y 7), obteniendo un coeficiente de determinación de 0.999 para ambos casos, para confirmar que la regresión es lineal se aplicó el test de student, en el cual se cumplió con el criterio de aceptabilidad para D y L- Lactato, por lo que se considera que el sistema tiene una respuesta proporcional a la concentración en un intervalo de 0.02 mg/mL hasta 2.0 mg/mL, (Tabla 15 y 16).

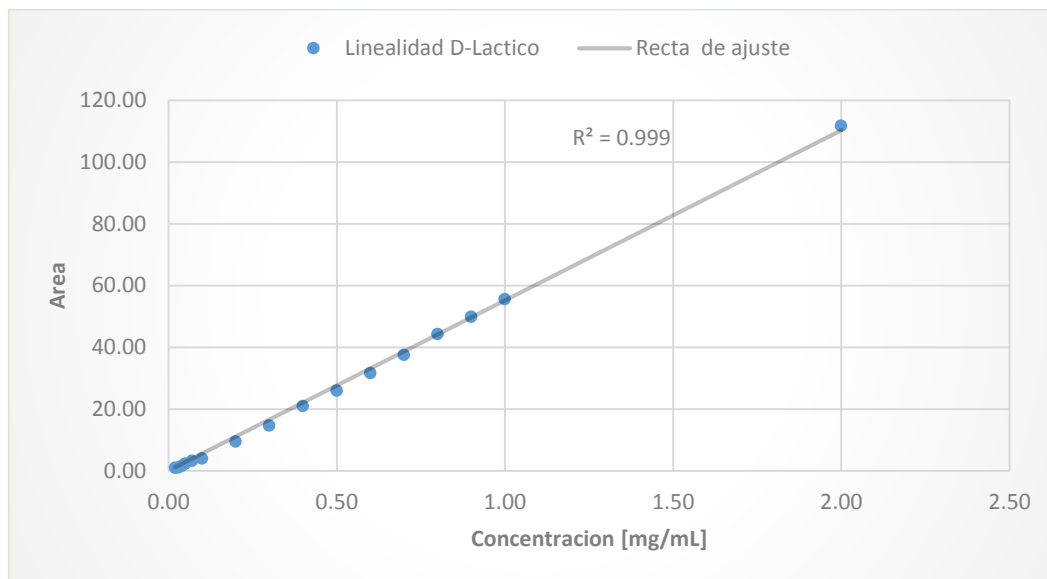


Gráfico 6. Linealidad del sistema D-Lactato. , se observa un coeficiente de determinación igual a 0.999 que confirma la linealidad de la curva.

Tabla 15. Estimadores para la evaluación de linealidad D-Lactato.

Estimador	Valor obtenido
Pendiente	56.250
Ordenada al origen	-1.144
Coefficiente de determinación	0.9992
Intervalo de confianza para la pendiente	57.001 ; 55.498 ( $t_{0.975, n-2}$ )
<b>Prueba t student</b>	$t_{calculada} = 118.262$ $t_{tabla} = 2.1448$

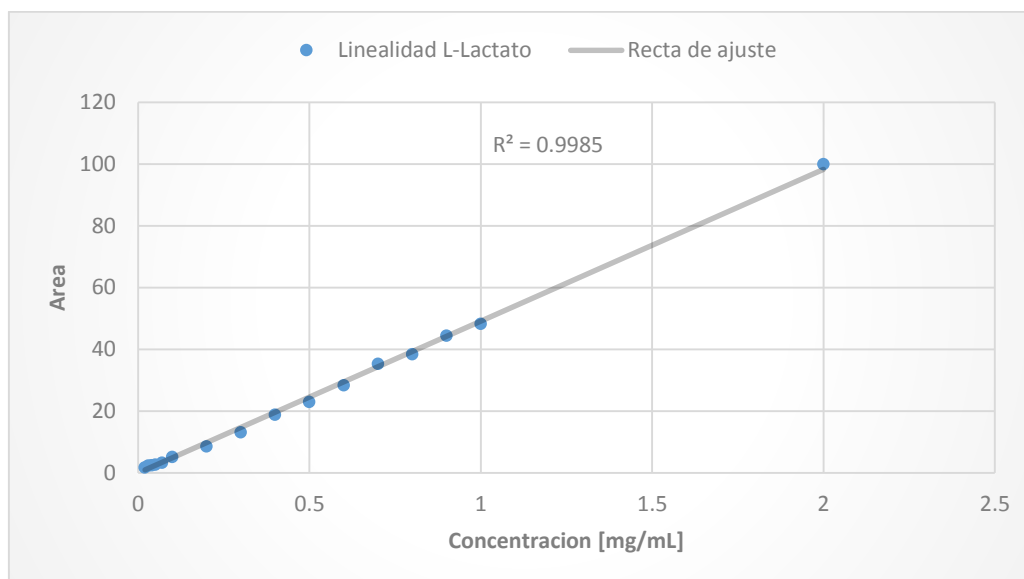


Gráfico 7. Linealidad del sistema L – Lactato, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.999 lo que confirma la linealidad de la curva.

Tabla 16. Estimadores para la evaluación de linealidad L – Lactato.

Estimador	Valor obtenido
Pendiente	49.820
Ordenada al origen	-0.517
Coefficiente de determinación	0.999
Intervalo de confianza para la pendiente	51.083 ; 48.556 ( $t_{0.975 \ n-2}$ )
<b>Prueba t student</b>	$t_{calculada} = 118.262$ $t_{tabla} = 2.1448$

## ii) Límite de cuantificación y detección.

El límite de detección fue en la concentración de 0.02 mg/mL, para ambos analitos, debido a que concentraciones inferiores a 0.02 mg/mL no cumplen con el criterio de aceptabilidad, relación señal ruido mayor a 3. La relación señal ruido, para la concentración de 0.02 mg/mL fue de 6.16 para D-Lactato y 7.7 para L-Lactato, (Tabla 17).

Para el límite de cuantificación se evaluó la relación señal ruido en la concentración de 0.04 mg/mL para el D-Lactato fue de 11.7, así mismo se verificó la precisión en este punto, donde el coeficiente de variación fue menor del 1.5% por lo que se estableció que a partir de esta concentración es cuantificable el D-lactato, el límite de cuantificación para el L-Lactato se estableció en 0.03 mg/mL con una relación señal ruido de 10.204 y un coeficiente de variación de 1.397% (Tablas 18 y 19).



Tabla 17. Relación Señal-Ruido D y L – lactato.

Concentración D – Lactato [mg/mL]	Señal – ruido 1	Señal – ruido 2	Señal – ruido 3	Promedio
<b>0.02</b>	6.4	6.1	6.0	6.16
<b>0.03</b>	8.3	7.9	8.6	8.26
<b>0.04</b>	12.1	12.1	11.9	12.06
Concentración L – Lactato [mg/mL]	Señal – ruido 1	Señal – ruido 2	Señal – ruido 3	Promedio
<b>0.02</b>	7.4	7.8	7.9	7.7
<b>0.03</b>	11.98	11.56	11.78	11.77
<b>0.04</b>	16.13	15.76	15.2	15.697

Tabla 18. Precisión del límite de cuantificación D-Lactato.

Muestra	Concentración [mg/mL]	Área	Señal-ruido
<b>1</b>	0.04	1.537	12.213
<b>2</b>	0.04	1.572	11.708
<b>3</b>	0.04	1.577	11.747
<b>4</b>	0.04	1.549	11.505
<b>5</b>	0.04	1.575	11.725
<b>6</b>	0.04	1.578	11.754
	Promedio	1.564	11.775
	Desviación estándar	0.0182	0.233
	CV %	1.1639	1.182

Tabla 19. Precisión del límite de cuantificación L-Lactato.

Muestra	Concentración mg/mL	Área	Señal - ruido
<b>1</b>	0.03	1.968	10.298
<b>2</b>	0.03	1.924	10.100
<b>3</b>	0.03	1.9359	10.130
<b>4</b>	0.03	1.9752	10.336
<b>5</b>	0.03	1.9757	10.338
<b>6</b>	0.03	1.915	10.020
	Promedio	1.948	10.204
	Desviación estándar	0.027	0.137
	CV %	1.397	1.344

iii) **Linealidad del método y Rango de trabajo.**

Para la evaluación de la linealidad del método y rango de trabajo se analizaron muestras adicionadas, se obtuvo una curva de calibración, en el eje de las “x” se encuentra la concentración adicionada a las muestras y en eje de las “y” la respuesta obtenida, área (Gráficos 8 y 9). El coeficiente de determinación fue mayor a 0.999 para ambos analitos. Para el rango de trabajo se comparó la concentración adicionada contra la concentración recuperada, (Gráfica 10 y 11).

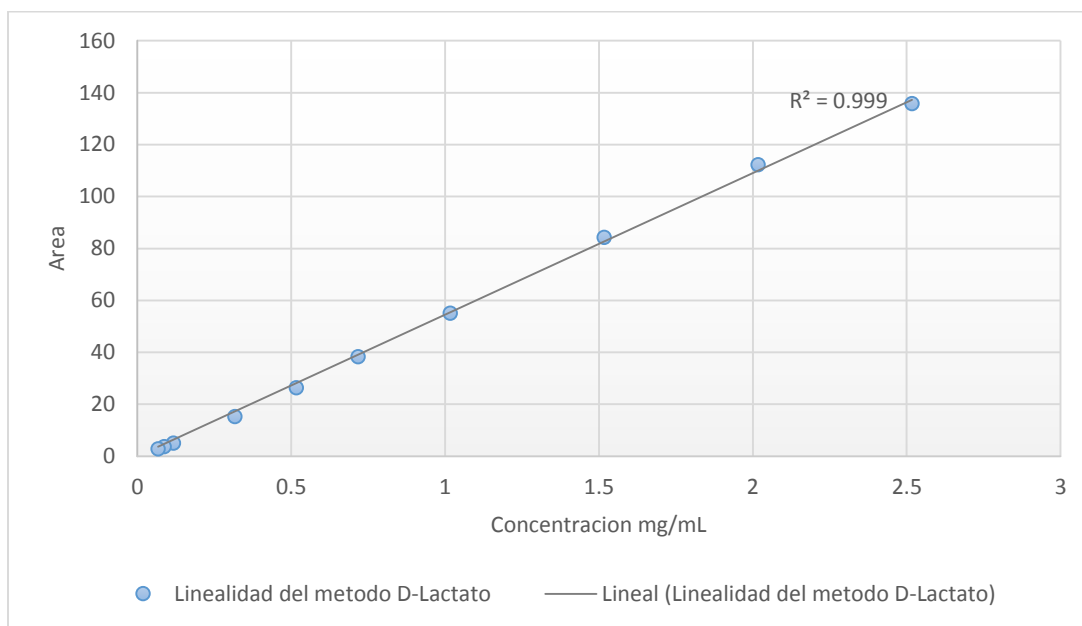


Gráfico 8. Linealidad del método D- Lactato, la concentración se ubica en el eje “x” y la respuesta, área, en el eje “y”, se observa un coeficiente de determinación igual a 0.999

Tabla 20. Estimadores de la linealidad del método para D – Lactato.

Estimador	Valor obtenido
Pendiente	55.3863
Ordenada al origen	-1.3842
Coficiente de determinación	0.9993
Intervalo de confianza para la pendiente	55.879 ; 54.893 ( $t_{0.975, n-2}$ )

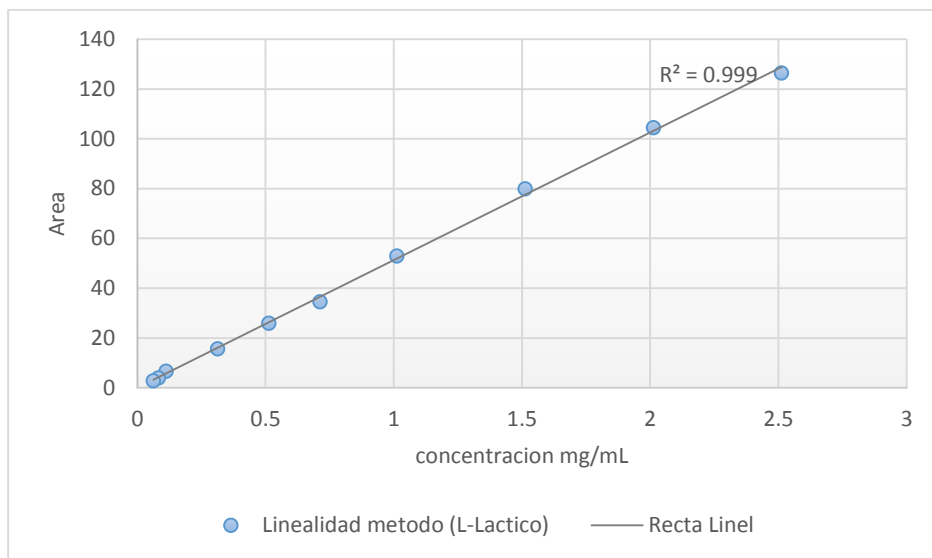


Gráfico 9. Linealidad del método L- Lactato, donde la concentración se encuentra en el eje “x” y el área en el eje “y”, se observa un coeficiente de determinación igual a 0.999.

Tabla 21. Estimadores para linealidad del método D-Lactato.

Estimador	Valor obtenido
Pendiente	50.807
Ordenada al origen	0.726
Coefficiente de determinación	0.999
Intervalo de confianza para la pendiente	51.432 ; 50.182( $t_{0.975 \ n-2}$ )

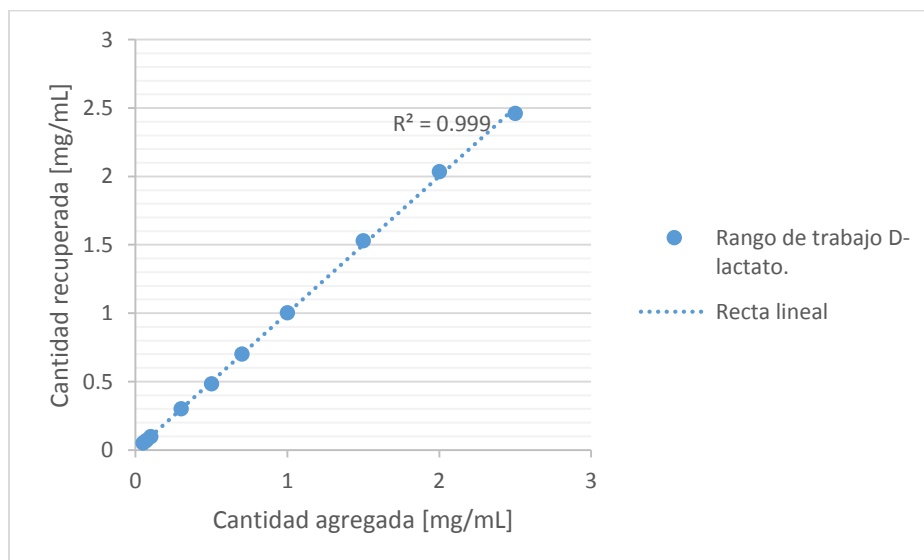


Gráfico 10. Rango de trabajo D-lactato, se observa un coeficiente de determinación de 0.999, lo que indica linealidad.

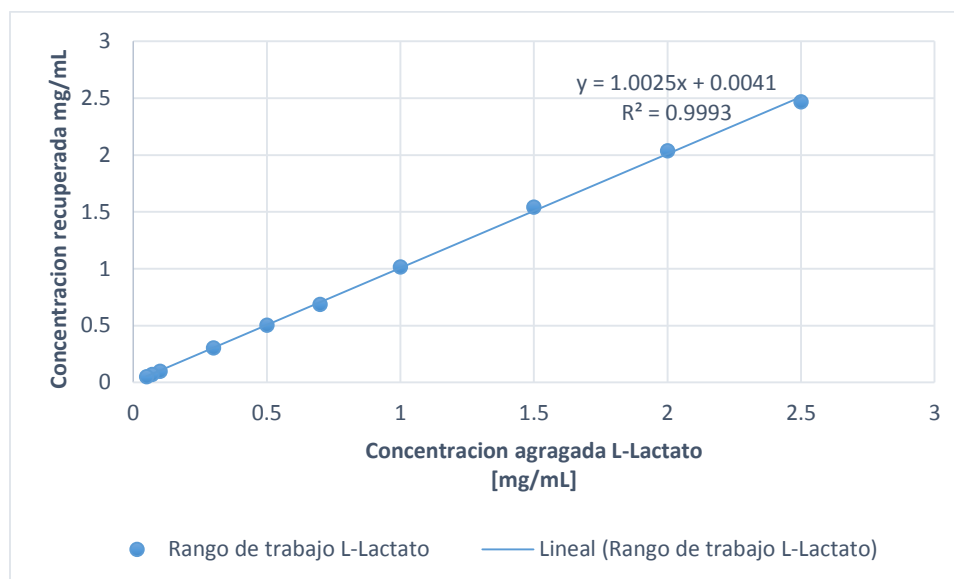


Gráfico 11. Rango de trabajo L – Lactato, se observa un coeficiente de determinación de 0.999, lo que indica linealidad.

#### iv) Exactitud.

Se evaluó el porcentaje de recobro, el cual fue en promedio de 99.84% y 100.84% para D –Lactato y L-Lactato respectivamente (Tabla 22 y 23), para la prueba t student, en ambos analitos, el valor calculado es menor que el valor tabulado por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se afirma que no existen diferencias estadísticas significativas entre los datos y el 100%.

Tabla 22. Recobro D- Lactato

D-Lactato Agregado [mg/mL]	Recuperado 1 mg/mL	Recuperado 2 mg/mL	Recuperado 3 mg/mL	Promedio mg/mL	Recobro %
2.5	2.4608	2.4785	2.48157	2.47366	<b>98.9467</b>
2	2.0201	2.0190	2.01709	2.01875	<b>100.937</b>
1.5	1.5343	1.5242	1.52134	1.52666	<b>101.777</b>
1	0.9973	0.9988	0.99090	0.99737	<b>99.570</b>
0.7	0.7018	0.7099	0.71911	0.71029	<b>101.4702</b>
0.5	0.4926	0.4943	0.48991	0.49233	<b>98.4660</b>
0.3	0.3015	0.2946	0.29864	0.29827	<b>99.4264</b>
0.1	0.0948	0.0995	0.09817	0.09751	<b>97.51</b>
0.07	0.0719	0.7003	0.06909	0.07037	<b>100.5335</b>

Tabla 23. Porcentaje de recobro L – Lactato.

D-Lactato Agregado [mg/mL]	Recuperado 1 mg/mL	Recuperado 2 mg/mL	Recuperado 3 mg/mL	Promedio mg/mL	Recobro %
2.5	2.5202	2.4844	2.5066	2.5037	100.1491
2	2.0102	2.0575	2.0061	2.0246	101.2306
1.5	1.5144	1.5081	1.5131	1.5119	100.7907
1	1.0184	1.0122	1.0222	1.0176	101.7594
0.7	0.6992	0.6895	0.6923	0.6937	99.0944
0.5	0.5104	0.5101	0.4994	0.5066	101.3262
0.3	0.3081	0.3040	0.2958	0.3026	100.8759
0.1	0.1020	0.1020	0.1021	0.1020	102.0277
0.07	0.0714	0.0693	0.0712	0.0706	100.9183

**v) Precisión intermedia y reproducibilidad.**

El estudio de precisión intermedia mostro una buena concordancia entre los resultados, obteniendo un coeficiente de variación global menor al 2% para D-Lactato y L-Lactato, el método es reproducible al obtener un coeficiente de variación menor del 2% para ambos analitos, (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados reproducibilidad.

Muestra	D-lactato mg/mL	L-Lactato mg/mL	Área D-Lactato	Área L-Lactato
<b>1</b>	0.3853	0.2919	21.2761	14.3205
<b>2</b>	0.3935	0.2926	21.7289	14.3519
<b>3</b>	0.3811	0.2862	21.0442	14.0365
<b>4</b>	0.3909	0.2821	21.5853	13.8354
<b>5</b>	0.3810	0.2859	21.0386	14.0227
<b>6</b>	0.3844	0.2902	21.2264	14.2357
<b>Promedio</b>	0.3860	0.2881	21.3166	14.133
<b>Desviación estándar</b>	0.00514	0.00366	0.2833	0.1805
<b>CV%</b>	1.3325	1.27171	1.3294	1.2774

Tabla 25. Resultados CV% global D-Lactato, precisión intermedia.

<b>D-Lactato [mg/mL]</b>								
<b>Analista A</b>	<b>Día 1</b>	0.3799	0.3769	0.3873	0.3704	0.3891	0.3788	
<b>D-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista A</b>	<b>Día 2</b>	0.3768	0.3884	0.3810	0.3775	0.3750	0.3788
<b>D-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista B</b>	<b>Día 1</b>	0.3853	0.3935	0.3873	0.3811	0.3909	0.3972
<b>D-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista B</b>	<b>Día 2</b>	0.3953	0.3841	0.3974	0.3931	0.3948	0.3867
<b>Promedio Global</b>		0.3853						
<b>Desviación Estándar</b>		0.007674						
<b>CV% Global</b>		1.991						

Tabla 26. Resultados CV% global L-Lactato, precisión intermedia.

<b>L-Lactato [mg/mL]</b>								
<b>Analista A</b>	<b>Día 1</b>	0.2797	0.2767	0.2799	0.2693	0.2824	0.2810	
<b>L-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista A</b>	<b>Día 2</b>	0.2813	0.2865	0.2797	0.2805	0.2760	0.2764
<b>L-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista B</b>	<b>Día 1</b>	0.2860	0.2879	0.2876	0.2795	0.2824	0.2810
<b>L-Lactato [mg/mL]</b>	<b>Analista B</b>	<b>Día 2</b>	0.2759	0.2743	0.2745	0.2736	0.2735	0.2791
<b>Promedio Global</b>		0.2793						
<b>Desviación Estándar</b>		0.00476						
<b>CV% Global</b>		1.7060						

**vi) Estabilidad de la muestra.**

La estabilidad de la muestra, se evaluó como la diferencia absoluta entre la concentración inicial y la evaluada en 1, 5 y 8 días en condiciones a temperatura ambiente, refrigeración a 4°C y congelación, si la diferencia absoluta es mayor al 5%, el D y L Lactato dentro de la muestra de fermentación (F68) se consideran no estables, como se muestra en las Tablas 28 y 29 las muestras a temperatura ambiente y refrigeración no son estables.

Las muestras conservadas en congelación fueron estables durante 1 día (Tabla 27).

Tabla 27. Estabilidad de la muestra en congelación.

	<b>Tiempo 0</b>	<b>Congelación Día 1</b>	<b>Congelación Día 5</b>	<b>Congelación Día 8</b>
<b>D -Lactato [mg/mL]</b>	0.43199	0.4388	0.3918	0.4032
<b>L -Lactato [mg/mL]</b>	0.25147	0.25170	0.3012	0.3256
<b>Diferencia D-lactato</b>		0.00680	0.04016	0.02879
<b>Diferencia L-lactato</b>		0.00023	0.04972	0.07412
<b>5% t0 D-lactato</b>	0.02159	estable	no estable	no estable
<b>5% t0 L-lactato</b>	0.01257	estable	no estable	no estable

Tabla 28. Estabilidad de la muestra en refrigeración.

	<b>Tiempo 0</b>	<b>Refrigeración Día 1</b>	<b>Refrigeración Día 5</b>	<b>Refrigeración Día 8</b>
<b>D -Lactato [mg/mL]</b>	0.43199	0.3742	0.363	0.3786
<b>L -Lactato [mg/mL]</b>	0.25147	0.2741	0.2852	0.3203
<b>Diferencia D-lactato</b>		0.0577	0.0689	0.0533
<b>Diferencia L-lactato</b>		0.02269	0.03372	0.06882
<b>5% t0 D-lactato</b>	0.02159	no estable	no estable	no estable
<b>5% t0 L-lactato</b>	0.01257	no estable	no estable	no estable

Tabla 29. Estabilidad de la muestra en temperatura ambiente.

	<b>Tiempo 0</b>	<b>Ambiente Día 1</b>	<b>Ambiente Día 5</b>	<b>Ambiente Día 8</b>
<b>D -Lactato [mg/mL]</b>	0.43199	0.36806	0.3555	0.24773
<b>L -Lactato [mg/mL]</b>	0.25147	0.27423	0.2737	0.2904
<b>Diferencia D-lactato</b>		0.06393	0.07649	0.18426
<b>Diferencia L-lactato</b>		0.02276	0.02222	0.03892
<b>5% t0 D-lactato</b>	0.02159	no estable	no estable	no estable
<b>5% t0 L-lactato</b>	0.01257	no estable	no estable	no estable

**vii) Robustez.**

De acuerdo a la prueba realizada, Youden y Steiner, no existen cambios marcados en la respuesta del método cuando se hacen pequeños cambios en los parámetros cromatográficos, temperatura, flujo, volumen de inyección, lo que demuestra la robustez del método (Tabla 31).

Tabla 30. Criterio de aceptación, robustez.

<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultado</b>
A-a (Condición alta – Condición baja) < $\sqrt{2S}$	$\sqrt{2S} = 0.3378862$



Tabla 31. Resultados robustez.

Variable	Condición Alta (A)	Condición Baja (a)	Diferencia A-a	Cumple (si/no)
Temperatura °C	1.2708	1.33	0.05916	si
Vel.Flujo mL/min	1.2758	1.325	0.04916	si
Vol. Inyección µL	1.3158	1.285	0.0308	si
Fase	1.3208	1.28	0.0408	si

**viii) Selectividad.**

Se comparó el espectro obtenido entre un estándar de referencia y una muestra de fermentación (Gráficos 12, 13, 14 y 15) en donde se observa que los picos de D y L – lactato, obtenidos de la muestra, son probablemente impuros ya que tienen una pureza de pico entre 900 y 990, para asegurar que los picos obtenidos en la muestra son puros se analizó el espectro en 3D en donde los valores individuales del PPI forman un rectángulo, esto indica que son puros (Gráficos 16 y 17), al asegurar que los picos obtenidos de L y D– lactato en la muestra son puros, indica que no hay interferencias y que la respuesta es debida solo a los analitos de interés.

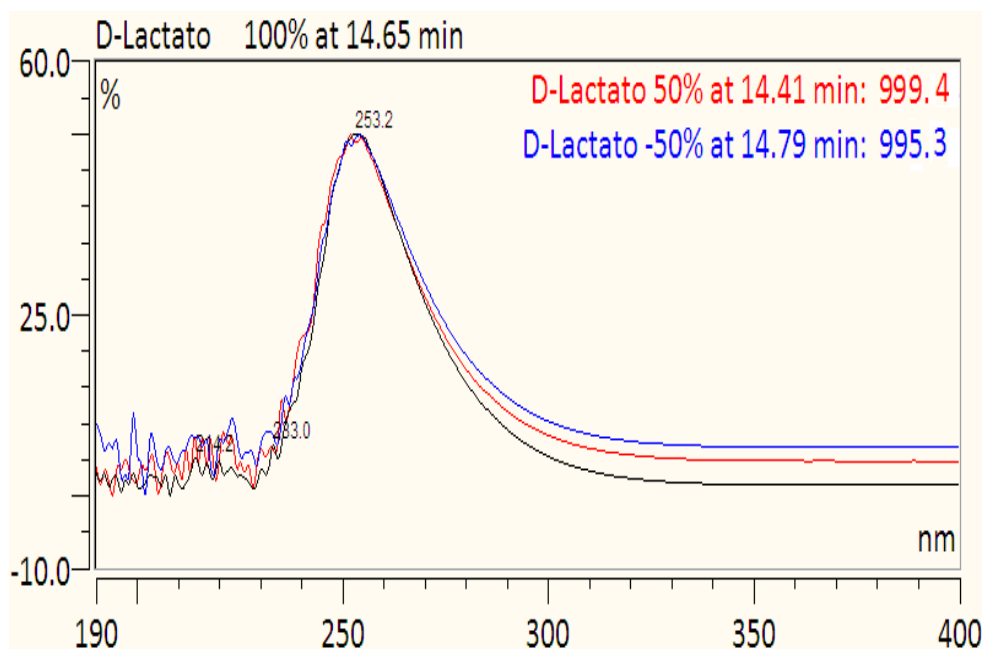


Gráfico 12. Espectro de absorción del estándar de referencia D –Lactato, se observa que su máximo de absorción es a 253.2 nm.

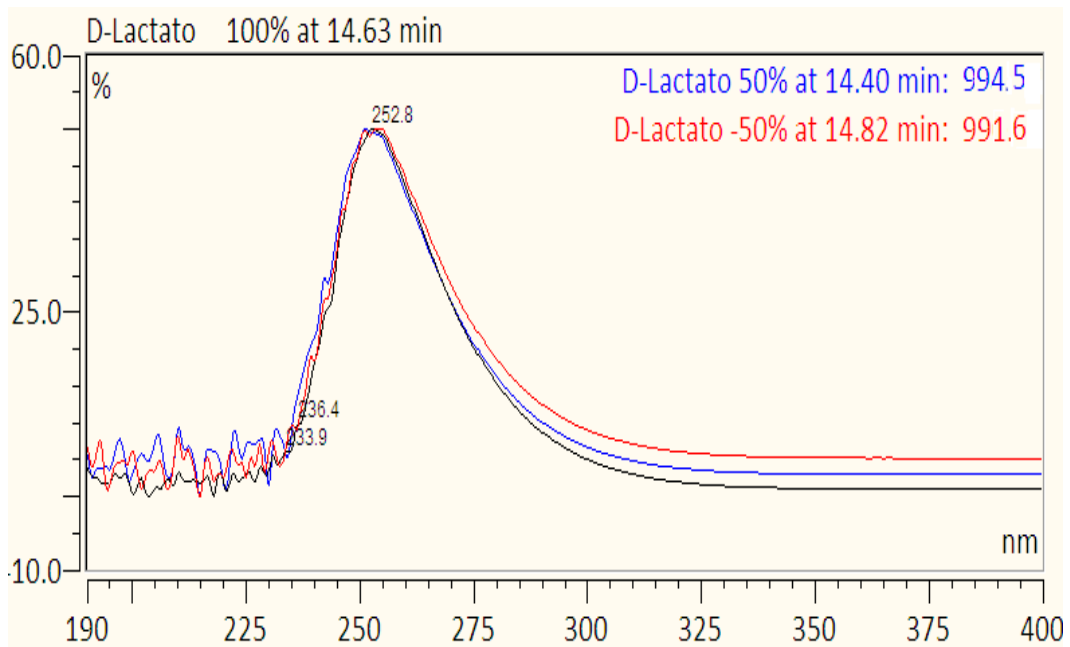


Gráfico 13. Espectro de absorción D – Lactato en la muestra, se observa que su máximo de absorción es 252.8 nm, muy parecido al máximo de absorción del estándar.

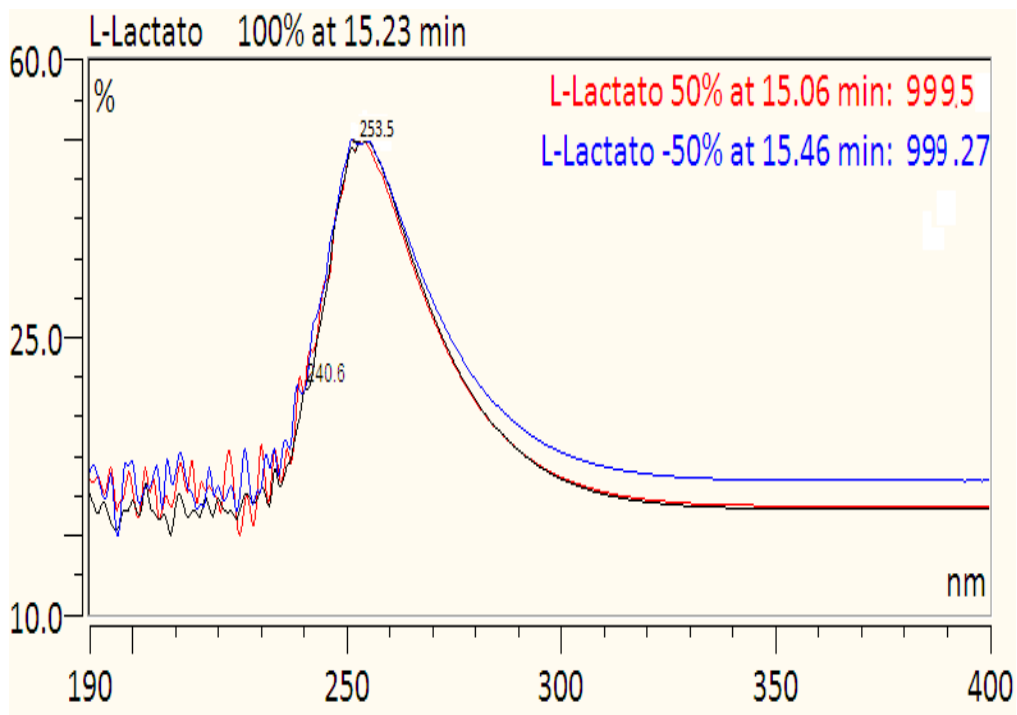


Gráfico 14. Espectro de absorción estándar L –Lactato, se observa que su máximo de absorción es 253.5 nm.

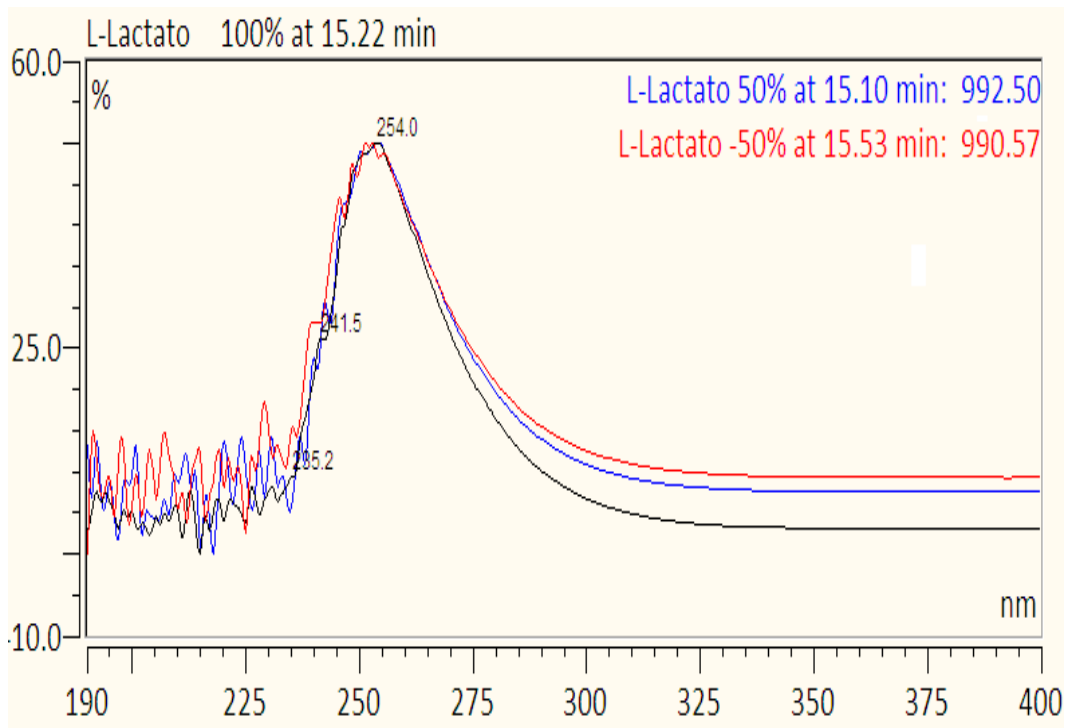


Gráfico 15. Espectro de absorción de L-Lactato, en la muestra, el máximo de absorción es de 254 nm que es muy cercano al obtenido en el estándar.

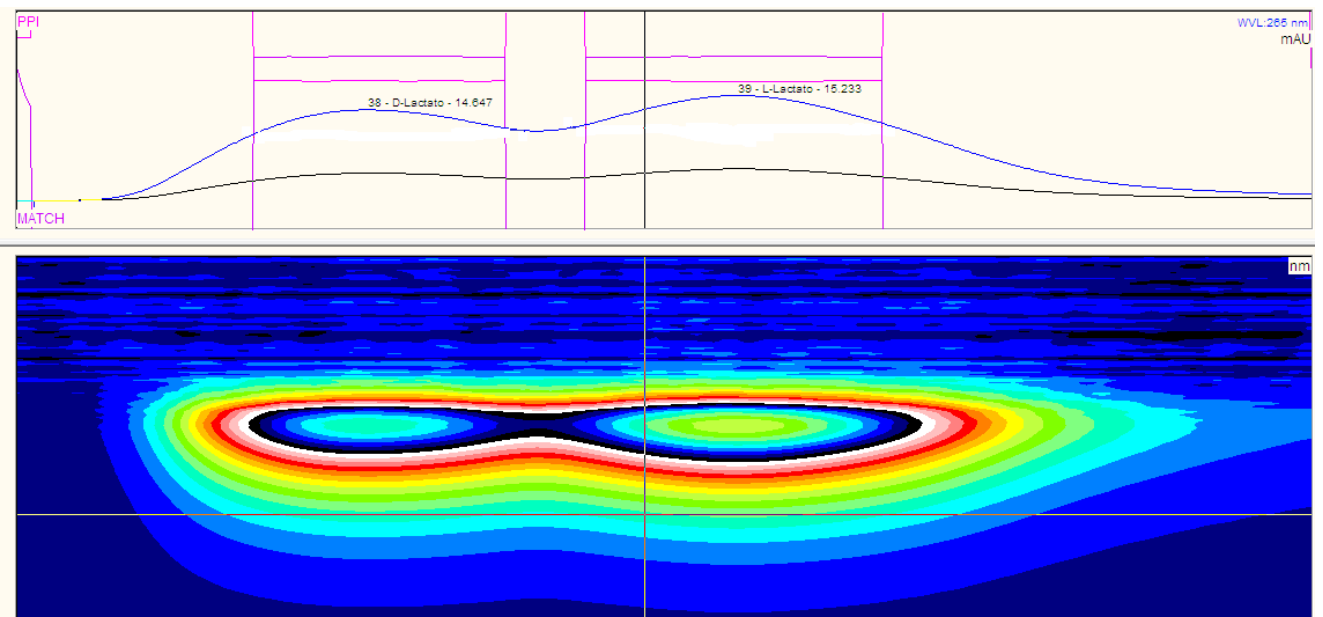


Gráfico 16. Espectro de absorción 3D de la muestra, los valores individuales de PPI forman rectángulos lo que confirma la pureza de los picos.

Tabla 32. Resumen de resultados, D – Lactato.

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación	Cumple (si/no)
Linealidad del sistema	$R^2 = 0.999$	$R^2 \geq 0.999$	Si
	$T_{\text{calculada}} = 118.262$ $T_{\text{tabla}} = 2.1448$	$T_{\text{calculada}} > T_{\text{tabla}}$	Si
Precisión del sistema	CV % = 0.88289	Precisión CV% < 1.5	Si
Límite de detección	[0.02 mg/mL] señal – ruido = 6.16	LD Señal-ruido > 3	Si
Límite de cuantificación	[0.04 mg/mL] señal – ruido = 11.775	LC Señal-ruido > 10	Si
	CV% = 1.16	Precisión CV% < 1.5	Si
Rango de trabajo	$R^2 = 0.999$	$R^2 \geq 0.999$	Si
	$T_{\text{calculada}} = 118.262$ $T_{\text{tabla}} = 2.1448$	$T_{\text{calculada}} > T_{\text{tabla}}$	Si
Exactitud	Recobro % = 99.84982	Recobro % > 98% Recobro % < 102%	Si
	$T_{\text{calculada}} = 0.3213$ $T_{\text{tabla}} = 2.6222$	$T_{\text{calculada}} < T_{\text{tabla}}$	Si
	CV % = 1.991	Precisión CV% ≤ 2	Si

Tabla 33. Resumen de resultados, L – Lactato.

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación	Cumple (si/no)
Linealidad del sistema	$R^2 = 0.999$	$R^2 \geq 0.999$	Si
	$T_{\text{calculada}} = 118.262$ $T_{\text{tabla}} = 2.1448$	$T_{\text{calculada}} > T_{\text{tabla}}$	Si
Precisión del sistema	CV % = 0.292399	Precisión CV% < 1.5	Si
Límite de detección	[0.02 mg/mL] señal – ruido = 7.7	LD Señal-ruido > 3	Si

Límite de cuantificación	[0.03 mg/mL ] señal – ruido=10.274	LC Señal-ruido>10	Si
	CV% =1.16	Precisión CV% <1.5	Si
Rango de trabajo	$R^2 = 0.999$	$R^2 \geq 0.999$	Si
	$T_{calculada} = 118.262$ $T_{tabla} = 2.1448$	$T_{calculada} > T_{tabla}$	Si
Exactitud	Recobro % = 100.8405	Recobro % >98% Recobro % <102%	Si
	$T_{calculada} = 0.3116$ $T_{tabla} = 2.6222$	$T_{calculada} < T_{tabla}$	Si
Precisión intermedia	CV % = 1.7060	Precisión CV% $\leq 2$	Si

## 6. Conclusiones.

Basados en los resultados documentados y evaluados de las actividades mencionadas, se ha determinado que el método analítico para la identificación y cuantificación de D y L láctico por cromatografía de intercambio de ligando HPLC de Labcitec S.A. de C.V. cumple con los especificaciones.

Los analitos, D y L-Lactato, contenidos en la muestra proveniente de una fermentación, (F68), son estables durante 24 h en congelación.

## 7. Recomendaciones.

- Evaluar la estabilidad de D y L lactato en intervalos de tiempo más cortos, por ejemplo, 2 ,3 4 días.
- Evaluar estabilidad del estándar.
- Evaluar el tratamiento de muestras, filtración.

## 8. Referencias.

1. Labcitec S.A de C.V , 2015, [www.labcitec.mx](http://www.labcitec.mx) .
2. USP, United States Pharmacopoeial Convention, 30 ed. Rockville: Mack Printing, 2007.
3. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Norma mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. Diario oficial de la Federación, 6 de junio de 2007.
4. Clasificación OMS, Inf. 32, Anexo 5 Validación de métodos analíticos, anexo 4 informe 40, 2006.
5. Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos de México, A. C.
6. Guía Técnica 1. Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la Validación de Métodos. Edición 2010.
7. V. A. Davankov, Nesmeyanov-Institute of Organo-Element Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 2000 Academic Press.
8. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos, COFEPRIS, 2011.
9. Villa Medina Alberto, 2015, [www.eis.uva.es](http://www.eis.uva.es)