

**"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE
SENOSIDOS A-B EN TABLETAS, POR
ESPECTROFOTOMETRIA"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

ALEIDA HERNANDEZ HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION.

1. GENERALIDADES.

1.1	Tabletas de senósidos A-B	1
1.1.1	Fórmula	1
1.1.2	Indicaciones.....	1
1.1.3	Contraindicaciones.....	1
1.1.4	Reacciones adversas.....	1
1.1.5	Precauciones.....	1
1.1.6	Posología.....	1
1.2	Senósidos A-B.....	2
1.2.1	Propiedades fisicoquímicas.....	2
1.2.2	Fórmula condensada.....	2
1.2.3	Fórmula desarrollada.....	2

2. TABLETAS

Consideraciones generales.....	3	
2.1	Formulación típica de tabletas.....	4
2.2	Métodos de preparación de tabletas.....	7
2.2.1	Método de granulación por vía húmeda.....	7
2.2.2	Método de granulación por vía seca.....	8
2.2.3	Método de compresión directa.....	9
2.3	Pruebas de control de calidad.....	9
2.3.1	Aspecto externo.....	10
2.3.2	Exactitud de dosificación, desviación del peso.....	10
2.3.3	Resistencia mecánica.....	10
2.3.3.1	Generalidades.....	10
2.3.3.2	Resistencia a la fractura y dureza.....	11
2.3.3.3	Abrasión por tambor y agitación.....	11
2.3.4	Desintegración.....	12
2.3.4.1	Generalidades.....	12
2.3.4.2	Método "Erweka".....	12

3. ESPECTROFOTOMETRIA	
Consideraciones generales.....	14
3.1 Radiación electromagnética.....	15
3.2 Absorción de radiación.....	16
3.3 Ley de Beer.....	19
3.4 Espectrofotómetros.....	22
3.4.1 Fuente de energía radiante.....	23
3.4.1.1 Fuente de radiación visible.....	24
3.4.1.2 Fuente de radiación ultravioleta.....	24
3.4.2 Monocromador.....	24
3.4.2.1 Monocromador de prisma.....	25
3.4.2.2 Monocromador de rejillas.....	25
3.4.3 Recipiente para la muestra.....	26
3.4.4 Detector.....	26
3.4.4.1 Celdas fotovoltaicas.....	27
3.4.4.2 Tubos de rayos catódicos.....	27
3.4.5 Amplificación y lectura.....	28
4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	
4.0 Validación.....	29
4.1 Linealidad.....	30
4.2 Precisión.....	30
4.2.1 Repetibilidad.....	30
4.2.2 Reproducibilidad.....	31
4.3 Especificidad.....	31
4.4 Exactitud.....	32
4.5 Estabilidad de la muestra.....	32
4.6 Tolerancia al sistema.....	32
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
6. OBJETIVOS	34
7. HIPOTESIS	34
8. METODOLOGIA	35
8.1 Material y equipo.....	35
8.2 Reactivos.....	35
8.3 Método.....	36

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación de la linealidad del sistema.....	37
9.2 Evaluación de la precisión del sistema.....	41
9.3 Evaluación de la linealidad del método.....	42
9.4 Evaluación de la exactitud del método.....	45
9.5 Evaluación de la especificidad del método.....	47
9.6 Evaluación de la reproducibilidad del método.....	54
9.7 Estabilidad de la muestra.....	57
ANALISIS DE RESULTADOS.....	59
CONCLUSIONES.....	61
ANEXO.....	62
BIBLIOGRAFIA	

I N T R O D U C C I O N

La Industria farmacéutica tiene un gran interés en la validación de métodos analíticos, debido al incremento de nuevos productos, los cuales requieren de métodos de análisis apropiados mediante los cuales se puede controlar la calidad de los medicamentos, para asegurar que éstos manifiesten su actividad terapéutica en forma adecuada.

Es por tal motivo que en la industria farmacéutica ha surgido la necesidad de validar todos los métodos analíticos utilizados en la determinación de principios activos, para así poder asegurar dicha calidad.

La validación de los métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son: Linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, entre otros.

De éstos obtenemos información sobre la confiabilidad del método analítico para el análisis del activo(s) de una forma farmacéutica.

Los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son establecidos por la Secretaría de Salud.

Para la cuantificación de los senósidos A-B en la forma farmacéutica de tabletas, encontramos varios métodos de análisis, pero en dichos métodos es necesario primero la extracción del activo para poder cuantificarlo. (4,33)

El método que se propuso para la cuantificación del activo, es el que presentó una buena reproducibilidad de resultados, lográndose con esto, que en la validación del método se obtuvieron resultados dentro de los criterios marcados.

1. GENERALIDADES

1.1 Tabletas de senósidos A-B

1.1.1 Fórmula: Contiene 8.6 mg de senósidos A-B.

1.1.2 Indicaciones: Los senósidos A-B pueden emplearse cuando se necesite una evacuación completa del contenido intestinal. En la constipación se recomienda intentar la corrección con dietas ricas en fibras.

1.1.3 Contraindicaciones: Los laxantes están contraindicados en pacientes con cólicos, náuseas, vómito y otros síntomas como apendicitis y dolor abdominal de origen desconocido, obstrucción e impactación.

1.1.4 Reacciones adversas: Estas consisten principalmente en diarrea excesiva y dolor cólico intenso.

1.1.5 Precauciones: Debe evitarse el abuso de este tipo de sustancias.

1.1.6 Posología: La dosis para adultos es de 12 a 24 mg (una a dos tabletas antes de acostarse).

1.2 Senósidos A-B

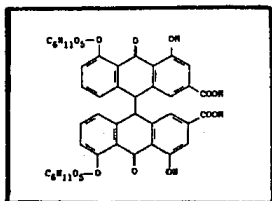
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas: Insoluble en agua, benceno, éter y cloroformo. Parcialmente soluble en metanol, acetona, dioxano; Soluble en soluciones acuosas de bicarbonato de sodio.

Peso Molecular: 862.72

Punto de fusión: 200-240°C

1.2.2 Fórmula condensada: $C_{42}H_{38}O_{20}$

1.2.3 Fórmula desarrollada:



2. Tabletas

Las tabletas son una de las formas farmacéuticas de mayor importancia. Las antiguas formas medicamentosas para administración oral, como píldoras, glóbulos, bolos y pastillas, pueden considerarse como sus precursores. El impetuoso desarrollo que ha tenido la "tableta" comenzó con el invento de la prensa para comprimir polvos, ideada por el inglés W. Brockedon en el año de 1843.

La tableta es una forma farmacéutica sólida, de dosificación unitaria. Se obtiene por compresión a partir de polvos secos, cristales o granulados y, en la mayoría de las veces, con adición de coadyuvantes.

Las tabletas pueden ser de forma cilíndrica, cúbica, bastoniforme, lenticular, ovoidea o esférica. Han prevalecido las de forma circular con las superficies biconvexas, ó discoideas. La forma de las tabletas influye notablemente en su estabilidad para el transporte y almacenamiento. Las tabletas muy biconvexas, al ser envasadas en tubos contactan entre sí solamente con su parte más gruesa e insensible y son, por tanto, menos propensas a daños mecánicos que los tipos biplanos.

La tableta como forma medicamentosa, es ventajosa, al poderse elaborar en máquina a gran escala y, por tanto, resulta barata. Las tabletas son dosificables con exactitud, fáciles de envasar, de transportar y de almacenar, además de ser fácil su empleo por el paciente.

2.1 Formulación típica de tabletas

De manera adicional a los agentes activos, una tableta contiene materiales inertes, que juegan un papel muy importante; de manera genérica pueden dividirse en dos grandes grupos:

A) Los que ayudan a impartir características de compresión a la formulación: diluyentes, aglutinantes y, lubricantes.

B) Los que proporcionan características físicas deseables a la tableta terminada: desintegrantes, colorantes y saborizantes.

A-1) Diluyentes: En el caso de elaboración de cantidades muy pequeñas de medicamento (por ejemplo, alcaloides, hormonas, vitaminas, etc.) se necesitan medios de relleno, para hacer posible la compresión e incrementar su volumen o tamaño.

Se incluyen entre estas sustancias las diversas clases de almidón (de patata, trigo y maíz) la lactosa, la celulosa microcristalina, la glucosa y el manitol.

A-2) Aglutinantes: Este grupo de coadyuvantes es responsable de la firmeza y resistencia de las tabletas. Además, los coadyuvantes aglutinantes cuidan la consistencia de las partículas pulverulentas en un granulado. Como aglutinantes típicos pueden considerarse los siguientes: azúcar y diversos tipos de almidón, gelatina, derivados celulósicos incluyendo la celulosa microcristalina, la goma arábiga y la tragacanto y, finalmente la polivinilpirrolidona.

A-3) Lubrificantes: Cumplen diversas funciones como, evitar la adhesión a la matriz o punzones, reducir la fricción entre partículas, facilitar la eyección de la matriz. Los lubricantes se subdividen en tres grupos:

-Deslizantes: Facilitan el flujo en tolvas y otros equipos. Por ejemplo el dióxido de silicio (Aerosil^R), talco, estearatos de calcio, aluminio y magnesio.

-Antiadhesivos o antiapelmazantes: Previenen la adherencia de la tableta a la matriz y punzones. Por ejemplo el talco, ácido esteárico, parafina, estearatos de

calcio y magnesio, grasas hidrogenadas; emulsión de silicona.

-Lubricantes: Reducen la fricción interparticular durante la compresión y eyección, facilitando la expulsión de la tableta. Como ejemplo de estas sustancias tenemos: talco, estearatos de calcio, magnesio y aluminio; ácido estearílico y cetílico; almidón; polietilenglicoles; y parafina.

B-1) Desintegrantes: Son sustancias que facilitan la ruptura o desintegración de la partícula, después de ser administrada, desprendiéndose el activo de la matriz de la tableta lo más eficientemente posible para permitir su rápida disolución.

Como ejemplo tenemos al almidón, el ácido algínico y sus sales; los alginatos de calcio o de sodio; la formaldehidogelatina (formolgelatina); la formaldehidocaseína (Esma^R); la celulosa microcristalina; así como la de sodio-carboximetilcelulosa y el ácido poliacrílico (Carbopol^R).

B-2) Colorantes: Ayudan al fabricante a tener un mayor control del producto durante su manufactura y, asimismo sirven de medio de identificación para el usuario.

B-3) Saborizantes: Aunque generalmente éstos no se consideran necesarios en la formulación de tabletas, existen casos especiales, como las tabletas masticables en que es

conveniente su adición, para facilitar la aceptación del usuario.

2.2 Métodos de preparación de tabletas.

2.2.1 Método de granulación por vía húmeda.

Es el más usado de los métodos de preparación de tabletas, debido a la gran probabilidad de que la granulación reúna los requerimientos de compresión para obtener buenas tabletas. Su principal desventaja es el número de etapas separadas que involucra, así como el tiempo que se requiere por esta vía.

Las etapas a seguir por este método son: pesado, mezclado, granulación, tamizado de la masa húmeda, secado, tamizado seco, lubricación y compresión.

El activo, diluyente y desintegrante se mezclan y tamizan para remover gruesos; se agrega la solución del componente aglutinante al tiempo que se agita, el polvo se humecta hasta un punto perfectamente establecido, ya que si se sobrehumedece, los gránulos se harán duros, requiriéndose mayor presión para la compactación y las tabletas resultarán moteadas. Por el contrario, si la mezcla no se humedece

suficientemente los gránulos serán muy suaves, rompiéndose durante la lubricación y causando dificultades en la compresión. Los gránulos húmedos se hacen pasar por mallas 6 u 8, utilizando osciladores Stokes o equipo equivalente, los gránulos se secan por métodos convencionales, se pasa la molienda a una mezcla final y, por último a compactación.

2.2.2 Método de granulación por vía seca.

Este procedimiento es especialmente adecuado para la fabricación de tabletas a partir de sustancias sensibles a la temperatura, o de aquellos medicamentos que son inestables en presencia de agua, o bien, cuando los ingredientes de las tabletas cuentan con suficientes propiedades de cohesión.

Las etapas principales del método son: pesado, mezclado, precompresión, tamizado, lubricación y compresión. Los activos, diluyentes (si se requiere) y parte del lubricante se mezclan, se pasan a la precompresión utilizando las propiedades de cohesión de alguno de los componentes, así se producen grandes tabletas. Las tabletas se muelen a un tamaño de malla adecuado, utilizando de preferencia un molino oscilante; se agrega así el resto del lubricante, se mezcla con cuidado y se procede al tableteado.

2.2.3 Método de compresión directa.

Bajo el concepto de compresión directa se entiende la compresión de medicamentos pulveriformes o de mezclas de medicamentos y coadyuvantes, sin tratamiento previo. Este es un método reservado para un pequeño grupo de compuestos cristalinos que cuentan con características apropiadas para la formación de tabletas, tales como buena cohesión y fluidez satisfactoria.

La compresión directa es también muy ventajosa en el caso de medicamentos sensibles a la humedad y al calor, cuya estabilidad se vería comprometida por las operaciones de granulación.

El método consiste en tres etapas: pesado, mezclado y compactación. Los ingredientes previamente pesados, se mezclan y se pasan directamente a compactación.

2.3 Pruebas de control de calidad.

Los ensayos de tabletas no sólo se efectúan como ensayos de calidad, o para comprobar únicamente que las tabletas se ajusten a las normas o correspondan a las prescripciones de las farmacopeas, sino que sirven también para el desarrollo de normas óptimas para su fabricación.

2.3.1 Aspecto Externo

Hay que comprobar si todas las tabletas presentan la forma indicada en las prescripciones estandarizadas, o señaladas en la farmacopea, y que se ajustan a las medidas de tamaño allí indicadas.

2.3.2 Exactitud de dosificación, desviación del peso.

Para averiguar la exactitud de la dosificación se determina el contenido en sustancia activa de cada tableta. Esta determinación se efectúa predominantemente por vía químico-analítica. En estrecha relación con ésto hay que considerar el peso de las tabletas, pues las desviaciones de peso repercuten inevitablemente en la dosificación.

2.3.3 Resistencia mecánica (estabilidad).

2.3.3.1 Generalidades.

En particular se refiere a la resistencia que presentan las tabletas frente a la presión, la tracción, los golpes, la torsión, la rotura, la agitación, la abrasión y la caída. Los ensayos de estabilidad mecánica se extienden a las características de desgastabilidad, transportabilidad, agitabilidad, golpeabilidad, rozabilidad, compresibilidad, y

flexibilidad. Estos son absolutamente necesarios para poder garantizar que las tabletas permanecerán indemnes ante el efecto que supone su agitación y transporte.

2.3.3.2 Resistencia a la fractura y dureza.

"Stokes Monsato-Hardness-Tester". En este aparato metálico se introduce una tableta y se aplica la mínima presión necesaria para que la tableta quede bien sujeta, girando el botón superior se va aumentando la presión, que se transmite a la tableta, hasta conseguir que ésta se rompa. La presión que fué necesaria se lee directamente sobre la escala. De esta manera se obtiene la dureza de la tableta.

"Bruchfestigkeitsmesser" según Köhler. (Medidor de resistencia a la fractura). Este equipo permite leer en un dinamómetro la fuerza que es necesario aplicar para romper por su tercera dimensión una tableta con sus bordes situados en secciones paralelas a la vertical que se mide, y sometida a presión de torsión.

2.3.3.3 Abrasión por tambor y agitación.

La determinación de la abrasión (desgaste) por tambor y agitación permite averiguar la resistencia a la abrasión. El desgaste se expresa en porcentaje con respecto a la masa que tenía la tableta antes del ensayo.

"Roche-Friabilator" Las tabletas se someten a un efecto de abrasión por tambor, agitación y golpeteo. El friabilizador es el más usado en los laboratorios de control de calidad.

2.3.4 Disgregabilidad o desintegración.

2.3.4.1 Generalidades:

Las sustancias activas incorporadas en las tabletas sólo son óptimamente absorbibles cuando el comprimido se disgrega, o se disuelve, con rapidez. Bajo el concepto de disgregabilidad de una tableta se entiende la disolución completa del comprimido.

En los ensayos de disgregabilidad efectuados in vitro sirven como medio de ensayo el agua o líquidos digestivos artificiales a determinada temperatura (20°C ó 37°C). El tiempo en el que el comprimido debe disgregarse depende del tipo de tableta.

2.3.4.2 Método:

"Erweka" Este aparato para ensayos de desintegración trabaja en forma automática. Una canastilla contiene 6 tubos

de vidrio para colocar en cada uno, una tableta..La parte inferior de éstos está cerrada por un tamiz de 2 mm de amplitud de malla, y la superior permanece abierta.

Al poner en marcha el aparato, la canastilla se desplaza con movimientos hacia arriba y hacia abajo, sumergiéndose en un baño de agua o de líquidos digestivos. El tiempo de desintegración termina cuando todas las partes de la tableta han pasado a través del tamiz. Un disco con agujeros, se apoya sobre la tableta. Estos discos ejercen una ligera presión e impiden que la tableta pueda flotar en algún momento.

3. ESPECTROFOTOMETRIA.

El término espectrofotometría sugiere la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, así como las mediciones por separado a una longitud de onda determinada. Si sólo se trata de la medición de radiación visible, o luz, recibe el nombre de colorimetría.

Los instrumentos que se emplean en la medición de la absorción de radiación visible y/o ultravioleta e infrarroja reciben el nombre de espectrofotómetros; los aparatos en los que sólo puede medirse radiación visible o luz se llaman colorímetros.

La espectroscopía de absorción es, indudablemente, una de las técnicas más interesantes de las descubiertas hasta la fecha. A pesar de los nuevos avances en química analítica probablemente permanecerá como un instrumento útil, debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de muchos problemas. Estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

Los métodos de análisis instrumental se convierten en una parte muy importante de la química experimental. La meta de un análisis químico es proporcionar información sobre la

composición de una muestra, en algunos casos es suficiente la información cualitativa referente a la presencia o ausencia de un componente, en otros se busca información cuantitativa, y es aquí donde entra la espectrofotometría.

3.1 Radiación electromagnética.

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades, adopta muchas formas siendo las más fácilmente reconocidas la luz y el calor radiante. Cabe considerar la radiación electromagnética, de la cual forma parte la luz visible, como energía propagada en forma de onda. Se utilizan varios términos y relaciones para describir la onda.

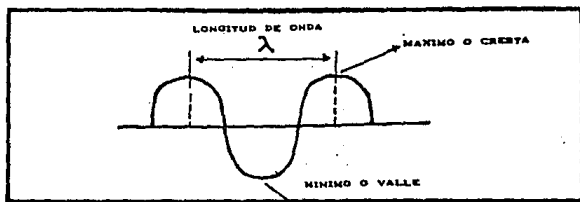


Fig. 1 Propiedades ondulatorias de la radiación electromagnética.

La longitud de onda es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente. (ver fig. 1)

Frecuencia es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo.

El intervalo completo de radiaciones se denomina espectro electromagnético, y se ha caracterizado convencionalmente tal como se indica a continuación:

REGIONES	INTERVALOS DE LONGITUD DE ONDA
Ultravioleta lejano	100-200 nm
Ultravioleta	200-400 nm
Visible	400-750 nm
Infrarrojo cercano	0.75-4 μ m
Infrarrojo	4 - 25 μ m

El color de la luz visible se correlaciona con su longitud de onda. La luz blanca contiene radiación de todas las longitudes de onda de la región visible. Es posible seleccionar la luz de una sola longitud de onda (radiación monocromática) a partir de la luz blanca (por ejemplo, con un prisma).

3.2 Absorción de radiación.

Todas las moléculas poseen energía, la cual es la suma de sus componentes de energía: de traslación, de vibración, de rotación y electrónica.

Si la molécula pasa desde uno de sus niveles de energía permitidos hasta otro más bajo, se ha de liberar cierta energía. Esta energía se puede perder como radiación, y entonces se dice que se ha producido emisión de radiación. Si se permite que una molécula encuentre una radiación electromagnética de una frecuencia apropiada, de manera que la energía de la molécula se eleve desde un nivel (estado fundamental) a otro superior (estado excitado), se dice entonces que ha ocurrido una absorción de radiación.

Los átomos o moléculas excitados son de vida corta y tienden a volver a sus estados fundamentales en 10^{-8} segundos aproximadamente; la energía liberada en este proceso aparece en el sistema como calor, pero en otros casos la especie excitada puede experimentar un cambio químico que absorbe la energía (reacción fotoquímica), en otros se vuelve a emitir radiación generalmente en longitudes de onda más largas en forma de fluorescencia o fosforescencia.

La absorción de radiación electromagnética para algunas especies (M) puede considerarse de la siguiente manera:



donde M^* es la partícula atómica o molecular en el estado excitado que resulta de absorción del fotón $h\nu$. Para que se

produzca absorción de radiación la energía del fotón en estado excitado debe igualar la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente, como estas diferencias de energía son únicas para cada especie, un estudio de las frecuencias de radiación absorbida ofrece un medio para caracterizar a los constituyentes de una muestra. Para este objeto los analistas deben obtener experimentalmente una gráfica de la reducción de potencia radiante (absorbancia) como una función de la longitud de onda o frecuencia, las gráficas típicas de esta clase son llamadas espectros de absorción.

La medición de la absorción de radiación ultravioleta y visible que comprende la región de 750 a 200 nm proporciona un medio cómodo para el análisis de numerosas especies inorgánicas y orgánicas, ya que la absorción se verifica cuando un quantum de energía radiante coincide con una transición permisible a un estado energético más alto por parte del átomo o molécula que se está estudiando. Por lo tanto la espectrofotometría de absorción nos permite realizar análisis de la siguiente manera:

- 1) Análisis cualitativo para la identificación de un compuesto puro. Determinación de la presencia o ausencia de una sustancia en una mezcla o la identificación de ciertos grupos funcionales en un compuesto.

- 2) Análisis cuantitativo de una o más especies en una mezcla.
- 3) Titulaciones espectrofotométricas en las que se emplean mediciones de absorción para localizar el punto de equivalencia de una titulación.
- 4) Determinación de constantes de equilibrio.

3.3 Ley de Beer.

La ley que rige la relación entre la concentración y la cantidad de luz o radiación absorbida es la ley de Beer-Lambert. Relaciona la absorbancia a la concentración de la especie absorbente y a la longitud de la trayectoria de la solución a través de la cual la radiación debe pasar.

La cantidad de radiación que absorbe una solución se mide en unidades de absorbancia, que van de 0.00 a 1.0 o 2.0. La fracción de la radiación que se transmite se mide en unidades de transmitancia, o porcentaje de transmitancia, que fluctúa desde 100% T a 0% T.

La ley de Beer nos dice que P_0 es el poder radiante del haz en fotones/s que incide sobre la celda, después de

atravesar una distancia b del material, su potencia se reduce a P por la absorción de los iones o moléculas de la solución, es el poder radiante del haz que abandona la celda.

(ver fig.3)

$$A = \log P_0/P$$

$$T = P/P_0$$

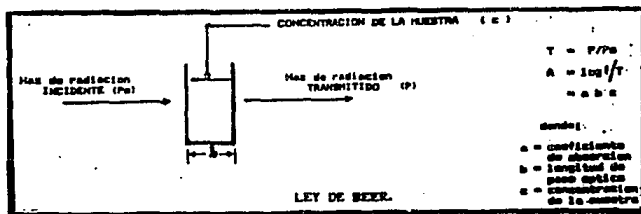


Fig. 3 Ley de Beer.

El símbolo que suele emplearse para representar la longitud de la trayectoria de una solución es b , también es la longitud interna de la celda, o el diámetro interno del tubo si se emplea un tubo de ensayo en lugar de una celda cuadrada. El símbolo habitual para la concentración es c .

Si la concentración, C , de una solución está dada en términos de molaridad, la ley de Lambert-Beer proporciona la relación entre A y C según:

$$A = \epsilon bc$$

donde b se da en cm y ϵ es una constante de proporcionalidad que se conoce como absorptividad molar.

Si la concentración está dada en otras unidades diferentes de la molaridad, la ley de Lambert-Beer se enuncia en la forma:

$$A = abc$$

Donde la constante de proporcionalidad se simboliza con a y recibe el nombre de absorptividad, y se representa como $a_{1\text{cm}}^{1\%}$.

Si A se traza en función de c , el resultado es una recta que pasa por el origen.

Durante los análisis, los químicos frecuentemente encuentran desviaciones con relación a la proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración mediadas cuando b es constante, esto puede deberse a desviaciones químicas o instrumentales, ya sea como consecuencia de la forma en que se hacen las mediciones de absorbancia o como resultado de cambios químicos relacionados con cambios en la concentración.

La ley de Beer describe bien el comportamiento de absorción de soluciones diluidas solamente, en soluciones de altas concentraciones, la distancia media entre las especies que causan absorción disminuye hasta el punto en que cada una afecta a la distribución de carga de sus vecinas.

Lo que a su vez puede alterar su capacidad para absorber una longitud de onda de radiación dada y puesto que el grado de

interacción depende de la concentración, la presencia de este fenómeno causa desviaciones de la relación lineal entre absorbancia y concentración. También puede haber desviaciones como consecuencia de asociación, disociación o reacción de la sustancia absorbente con el disolvente y, en cuanto a desviaciones instrumentales solo se observa un estricto cumplimiento de la ley de Beer cuando la radiación empleada es monocromática, ésto depende del artificio que permite el aislamiento de la porción deseada del espectro.

3.4 Espectrofotómetros.

Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la transmitancia o la absorbancia de una muestra en función de una longitud de onda determinada; de acuerdo a la región del espectro en que trabajen pueden ser para ultravioleta, visible e infrarrojo.

El funcionamiento general del equipo es proporcionar el paso de energía radiante monocromática a través de la muestra y, medir la intensidad de la fracción de la energía que es transmitida (transmitancia) o la que fue absorbida (absorbancia).

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro; los cuales se presentan en forma esquemática en la fig.4, son los siguientes:

- Una fuente de energía radiante continua que cubre la región del espectro en la cual opera el instrumento.
- Un monocromador, que es una parte del instrumento que aísla una banda angosta de longitud de onda de todo el espectro emitido por la fuente.
- Un recipiente para la muestra.
- Un detector, que es un transductor que convierte la energía radiante en una señal eléctrica a la lectura apropiada.
- Un amplificador y un circuito asociado que traduce la señal eléctrica a la lectura apropiada.
- Un sistema de lectura de la medición, (registrador).



Fig. 4 Diagrama de los componentes básicos de un espectrofotómetro.

3.4.1 Fuente de energía radiante.

La fuente de radiación para que sea apropiada en mediciones de absorción debe cumplir ciertos requisitos:

- Generar un haz con suficiente potencia para fácil detección de la medición.

- Proporcionar radiación continua, es decir, su espectro debe contener todas las longitudes de onda en que va a ser usada.
- Ser estable, es decir, debe permanecer constante durante el periodo necesario de la medición.

La fuente de radiación varía según la región del espectro:

3.4.1.1 Fuente de radiación visible: La lámpara de filamento de tungsteno es la más común en esta región. Esta lámpara es útil para la región de longitudes de onda comprendidas entre 320 y 2500 nm.

3.4.1.2 Fuente de radiación ultravioleta: La lámpara más común es la de deuterio, la cual tiene la ventaja de producir radiación continua de intensidades más altas en las mismas condiciones de operación que otras lámparas como la de hidrógeno. Las lámparas producen un espectro continuo en la región comprendida entre 180 y 375 nm.

3.4.2 El Monocromador.

Este es un instrumento óptico que sirve para separar de una fuente de radiación continua un haz de elevada pureza espectral y de cualquier longitud de onda. Los componentes esenciales de un monocromador son rendijas y un elemento dispersor.

La radiación de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada, y es colimada por una lente o por un espejo para que el haz llegue paralelo al elemento dispersor, el cual puede ser un prisma o una rejilla de difracción.

Existen diferentes tipos de monocromadores, los más comunes son:

3.4.2.1 Monocromador de prisma:

La luz penetra por una ranura de entrada, es colimada por una lente y luego incide en la superficie del prisma formando un ángulo, hay una refracción en ambas caras del prisma; la radiación dispersa se enfoca luego sobre una superficie ligeramente curva que contiene la ranura de salida.

3.4.2.2 Monocromador de rejillas:

Una rejilla consiste de un gran número de escalones paralelos y situados a espaciamentos iguales que se han arreglado sobre una superficie perfectamente pulida. Las rejillas comunmente encontradas consisten en una placa muy delgada de vidrio con un coeficiente de expansión muy bajo, una película delgada de resina sintética en donde se graban los surcos para luego ser recubiertos en una fina capa de aluminio.

3.4.3 Recipiente para la muestra.

El compartimiento de la celda tiene como objetivo proteger al detector de excesiva luz externa; aquí se acomoda la celda de muestra y luego se sella para proteger los componentes ópticos de sustancias químicas. Las celdas que contienen las muestras deben ser de material que no absorba radiación en la región espectral que interesa; por lo que se requiere cuarzo o sílice fundido para trabajar en la región ultravioleta inferior a 350 nm, estos materiales también son transparentes en la región visible y hasta 3 micras en la región infrarroja, aunque pueden emplearse vidrios de silicato en la región entre 350nm y 2 micras. Las mejores celdas tienen ventanas perfectamente normales a la dirección del haz para reducir al mínimo las pérdidas por reflexión. La longitud más común de la celda es de 1cm. Huellas dactilares, grasa u otros depósitos sobre la pared de la celda alteran notablemente sus características de transmisión, por esto es necesario la limpieza antes y después de su uso y no deben tocarse nunca las ventanas durante la manipulación de las celdas.

3.4.4 Detector.

Las características que deseamos encontrar en un detector para un espectrofotómetro son: sensibilidad elevada

en la región espectral que nos interesa, respuesta lineal para la energía radiante, tiempo de respuesta rápido, buena disponibilidad para la amplificación y alta estabilidad o bajo nivel de ruido.

Se emplean tres aparatos fotoeléctricos básicos para detección de radiación:

- Celdas fotovoltaicas.
- Tubos de rayos catódicos.
- Celdas fotoconductoras (infrarrojo).

3.4.4.1 Celdas fotovoltaicas: La energía radiante genera una corriente en la superficie de separación de un semiconductor y un metal; se usa principalmente para detectar y medir radiación de la región visible. Tiene una sensibilidad máxima de 550nm. Consiste generalmente en un electrodo plano de cobre o hierro sobre el cual hay depositado una capa de material semiconductor (selenio u óxido de cobre), en la superficie del semiconductor hay un película transparente de oro, plata o plomo que actúa como segundo electrodo o colector; el conjunto se protege con una cubierta totalmente transparente.

3.4.4.2 Tubos de rayos catódicos: (tubos fotomultiplicadores)

Consta de un cátodo semicilíndrico y un ánodo de alambre encerrado en un recipiente transparente al vacío, la superficie cóncava del cátodo tiene una capa de material fotoemisor que tiende a emitir electrones al ser irradiada. El número de electrones emitidos de la superficie fotoemisora es directamente proporcional a la potencia radiante del haz que incide en la superficie.

El tubo fotomultiplicador se caracteriza por su extrema sensibilidad así como por su rapidez de respuesta. El tubo combina la fotoemisión con etapas múltiples en cascada de emisiones secundarias logrando una gran ampliación de la fotocorriente primaria.

Amplificación y Lectura.

En instrumentos de lectura directa las escalas de transmitancia y absorbancia aparecen en la carátula de un medidor y los datos se obtienen por la posición de la aguja. Actualmente cuentan con presentación de datos en pantalla digital y hasta acoplados a computadoras.

4.0 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Durante el proceso de fabricación de los productos farmacéuticos, éstos deben contar con un alto grado de calidad, de tal manera que al finalizar dicho proceso obtengamos productos que posean las características físicas, químicas y analíticas especificadas. Ante estos requerimientos aumenta día a día la necesidad de desarrollar mejores métodos analíticos que nos permitan verificar dicha calidad, para así estar seguros que nuestros productos poseen dicha calidad.

La validación de métodos analíticos es una parte fundamental en el desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que va a ser aquí donde por medio de la secuencia de pruebas y análisis en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado, cumple con los propósitos para los cuales fué diseñado.

DEFINICIONES.

4.0 VALIDACION: Es el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios experimentales, que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

4.1 LINEALIDAD: Es la habilidad que tiene el sistema (equipo, reactivos, etc.) o el método para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración VS respuesta medida) de una misma solución patrón (estándar de referencia), utilizando cuando menos cinco niveles y haciendo el análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos, el nivel central deberá corresponder al 100% de la concentración esperada. Se deberá de elaborar una curva con los resultados obtenidos, con éstos datos se calcularán los siguientes parámetros:

Media (\bar{X}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), pendiente (b), ordenada al origen (a), coeficiente de correlación lineal (r) y error estándar de correlación (r^2).

4.2 PRECISION: Es el grado de concordancia obtenida entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

4.2.1 Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones

independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos, técnicas y reactivos.

Se determina realizando el análisis por sextuplicado, de una misma solución patrón (estándar de referencia), correspondiente al 100% del principio activo.

4.2.2 Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes, realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferente equipo. Se determina cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra (placebos cargados con el 100% del principio activo).

4.3 ESPECIFICIDAD: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Indica el grado de interferencia (o ausencia de ésta) en el análisis de mezclas.

Se determina confrontando al método, por separado, al placebo, placebo cargado y al estándar.

4.4 EXACTITUD: Es la concordancia que existe entre los datos obtenidos por el método y el valor real esperado (100%). Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo (placebos cargados).

Se determina analizando de manera independiente y como mínimo seis placebos cargados con el 100% del principio activo.

4.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: Son las condiciones a las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

Se determina almacenando como mínimo seis muestras analizadas a temperatura ambiente o a las condiciones acostumbradas, por el tiempo acostumbrado o por algunas horas. Después de transcurrido este tiempo se reanalizarán bajo las mismas condiciones de operación.

4.6 TOLERANCIA AL SISTEMA: Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, lotes de reactivos, equipos, etc.

5.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Para obtener productos de calidad es necesario que dicha calidad sea verificada durante todo el proceso de fabricación, para así poder asegurar que los productos finales poseerán las características especificadas. Para poder realizar ésto es necesario desarrollar métodos de análisis que nos permitan verificar dicha calidad. Una parte integral del desarrollo de un método es la validación del mismo, principalmente por ser un requisito ante la Secretaría de salud.

La cuantificación de los senósidos A-B se puede realizar conforme al método farmacopeico, pero el principal problema aquí radica en la pérdida del activo debido a las numerosas extracciones que hay que realizar; por lo cual buscamos otra técnica en la cual no intervinieran las extracciones con éter y cloroformo, pudiendo así asegurar que no perderíamos al activo; y se obtendrían resultados más confiables, reduciendo también el costo del análisis. Por lo tanto se tuvo la necesidad de desarrollar un método analítico para cuantificar senósidos A-B en tabletas como producto terminado.

En la actualidad la validación de los métodos analíticos es de vital importancia en los laboratorios

farmacéuticos, ya que así aseguran que los medicamentos que se producen son eficaces y confiables, además de ser un requisito sanitario, que pide a los laboratorios validar todos los métodos empleados (de fabricación y control), por lo que se validará el método desarrollado para los senósidos A-B en tabletas como producto terminado.

6.0 OBJETIVOS:

- 6.1 Desarrollar un método analítico para la determinación y cuantificación de los senósidos A-B en tabletas por espectrofotometría.
- 6.2 Validar el método analítico propuesto, de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

7.0 HIPOTESIS.

Debido a que los senósidos A-B proceden de un producto natural, la cuantificación de éstos por técnicas como HPLC son muy difíciles, ya que presentan interferencias los demás componentes; por lo cual proponemos cuantificarlos por espectrofotometría, por medio del desarrollo de color, con lo cual no tendremos interferencia de los componentes de la planta. Y así se podrá validar el método propuesto, para poder ser utilizado en la cuantificación del principio activo.

8.0 METODOLOGIA.

8.1 Material y Equipo.

Matraz volumétrico de 25 y 50 ml, marca pyrex.

Pipetas volumétricas de 2, 3 y 5 ml, marca Kimax.

Embudos de filtración rápida.

Termómetro de 0 - 150°C.

Papel filtro No. 41

Baño de petrolato.

Espectrofotómetro UV-VIS marca Beckman, modelo DU 7500.

8.2 Reactivos.

Acido acético glacial R.A, marca Baker.

Anhídrido acético R.A, marca Baker.

Acido bórico R.A, marca Baker.

Estándar secundario de polvo de vaina.

Placebo.

Placebo cargado.

8.3 Método.

Solución de referencia:

Pesar 100 mg de estándar secundario de polvo de vaina en un matraz volumétrico de 50 ml., adicionar 25 ml de ácido acético glacial.

Solución de la muestra:

Pesar 10 tabletas y sacar el peso promedio, y moler éstas; pesar una cantidad equivalente a 100 mg de polvo de vaina en un matraz volumétrico de 50 ml., adicionar 25 ml de ácido acético glacial.

A partir de éste punto, tratar igual al estándar y muestra.

Calentar en baño de petrolato a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, enfriar la muestra y el estándar y aforar con ácido acético. Filtrar ambos a través de papel filtro número 41.

Tomar una alícuota de 2 ml, y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml., el cual contiene: 150 mg de ácido bórico, 10 ml de anhídrido acético y 8 ml de ácido acético glacial. Calentar en baño de petrolato a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 25 - minutos.

Dejar enfriar el estándar y la muestra., aforar con ácido acético glacial y, determinar las absorbancias a una longitud de onda de 574 nm.

9.0 RESULTADOS

9.1 EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se trabajarón cinco niveles (60,80,100,110, y 120%) por triplicado c/u obteniendose los resultados que se muestran en la tabla No. 1.

Cantidad Adicionada (%)	Cantidad Recuperada (%)
60	59.80
60	60.45
60	59.16
80	78.45
80	78.77
80	79.42
100	100.00
100	99.67
100	100.64
110	110.28
110	110.61
110	110.93
120	119.29
120	118.97
120	119.61

Tabla No. 1 Muestra los % de recobro obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema.

Con los resultados anteriores se calcularón los siguientes parámetros.

$$a = -0.8400$$

$$S_{y/x} = 0.9722$$

$$b = 1.0061$$

$$\sum (X_i - \bar{X})^2 = 6960$$

$$r = 0.999471$$

$$r^2 = 0.9989$$

$$\begin{aligned} \bar{X} &= 94 & \sum y &= 1406.05 \\ DE(X) &= 22.2967 & \sum y^2 &= 138851.5509 \\ \sum x &= 1410 \\ \sum x^2 &= 139500 \\ \sum xy &= 139171.4 \end{aligned}$$

a. Evaluación de la ordenada al origen. A (a)

Se hace a través del estadígrafo "t".

Hipótesis planteada.

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

Utilizando la fórmula 2 del anexo tenemos:

$$t \text{ calc.} = (-0.84) / [0.9722 \sqrt{139500/15 \times 6960}]$$

$$t \text{ calc.} = -0.7474$$

$$t \text{ tab.} = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab.}}$$

$$-0.7474 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el sistema posee una ordenada al origen igual a "cero".

b. Evaluación de la pendiente B (b). Se hace a través del estadígrafo "t".

Hipótesis planteada.

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

Utilizando la fórmula 3 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (1.0061-1)(22.2967)(\sqrt{14}) / 0.9722$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.5235$$

$$t_{\text{tab.}} = 2.16$$

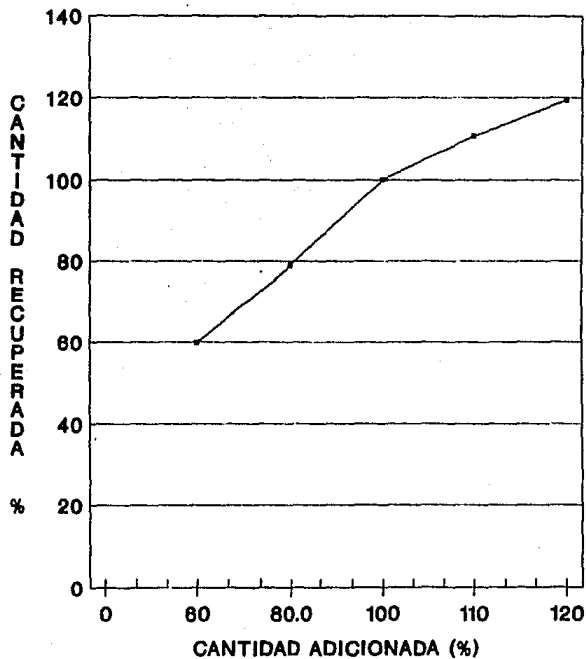
CRITERIO:

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tab.}}$$

$$0.5235 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el sistema posee una pendiente igual a "uno".

LINEALIDAD DEL SISTEMA. SENOSIDOS A-B



9.2 EVALUACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA.

Se trabajó con un solo nivel (100%), con 10 replicas, obteniendose los resultados que se muestran en la tabla No.2.

Cantidad adicionada(%)	Cantidad recuperada (%)
100	100.45
100	99.09
100	99.54
100	101.36
100	101.36
100	100.90
100	101.36
100	100.90
100	102.27
100	102.27

Tabla No. 2 Muestra los % de recobro, obtenidos en la precisión del sistema.

Con los resultados anteriores se calcularon los sig. parámetros:

$$\begin{aligned}\bar{y} &= 100.95 \\ DE &= 1.0377 \\ DER &= 1.0279 \%\end{aligned}$$

CRITERIOS:

DER menor de 1.5 %

Dado que la DER es menor de 1.5 podemos decir que el sistema se considera preciso.

9.3 EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO.

Se trabajó con placebos cargados del principio activo, efectuando cada análisis por triplicado y con cuatro diferentes niveles (80,90,100,110%). Obteniendo los resultados que se muestran en la tabla No. 3.

Cantidad Adicionada (%)	Cantidad Recuperada (%)
80	80.60
80	80.84
80	80.54
90	89.55
90	90.37
90	90.70
100	100.11
100	100.11
100	101.81
110	109.45
110	110.50
110	110.30

Tabla No. 3 Muestra los % recuperados en la evaluación de la linealidad del método.

Con los resultados anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$\begin{array}{ll}
 a = 1.6036 & \sum XY = 110244.7 \\
 b = 0.9874 & \sum (X_i - \bar{X})^2 = 1500 \\
 r = 0.9986 & \bar{Y} = 95.4066 \\
 S_{y/x} = 0.631161 & DE(Y) = 11.6774 \\
 \bar{X} = 95 & \sum Y = 1144.8 \\
 DE(X) = 11.5457 & \sum Y^2 = 110695.53 \\
 \sum X = 1140 & \\
 \sum X^2 = 109800 &
 \end{array}$$

a. Evaluación de A (a). Ordenada al origen., Se efectúa con el estadígrafo de contraste "t".

Hipótesis planteada.

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

Calculando con la fórmula 2 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (1.6036 - 0) / [0.631161 \times \sqrt{109800 / (12 \times 1500)}]$$

$$t_{\text{calc.}} = 1.0287$$

$$t_{\text{tab.}} = t(0.975, 13) = 2.228$$

CRITERIO:

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tab.}}$$

$$1.0287 < 2.228$$

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

b. Evaluación de la pendiente B (b). Se efectúa con el estadígrafo de contraste "t".

Hipótesis planteada.

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

Calculando con la fórmula 3 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (0.9874 - 1) \times 11.5457 \times \sqrt{11} / 0.631161$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.76445$$

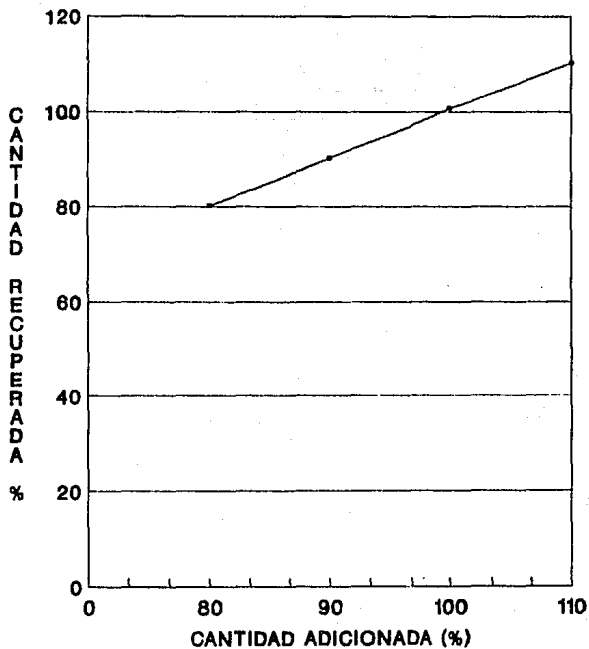
$$t_{\text{tab.}} = 2.228$$

CRITERIO:

$$T_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$$

$$-0.76445 < 2.228$$

LINEALIDAD DEL METODO. SENOSIDOS A-B



9.4 EVALUACION DE LA EXACTITUD DEL METODO.

Se manejaron seis muestras (placebos cargados), con el 100% del principio activo, obteniendose los resultados que se muestran en la tabla No. 4.

Cantidad adicionada (%)	Cantidad Recuperada (%)
100	100.11
100	101.83
100	103.24
100	98.00
100	97.84
100	100.11

Tabla No. 4 Muestra los porcentos recuperados en la evaluación de la exactitud del método.

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$\bar{Y} = 100.1883$$

$$DE(Y) = 2.109$$

La exactitud se evalúa a través del estadígrafo de contraste "t".

Prueba de hipótesis $H_0: u = 100\%$

$H_a: u \neq 100\%$

Calculando con la fórmula 4 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (100.1883 - 100) / (2.109 / \sqrt{6})$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.2187$$

$$t_{\text{tab.}} = t(0.975, 5) = 2.571$$

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tab.}}$$

$$0.2187 < 2.571$$

Como $t_{\text{calc.}}$ es menor que $t_{\text{tab.}}$ podemos considerar al método exacto.

9.5 EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL METODO.

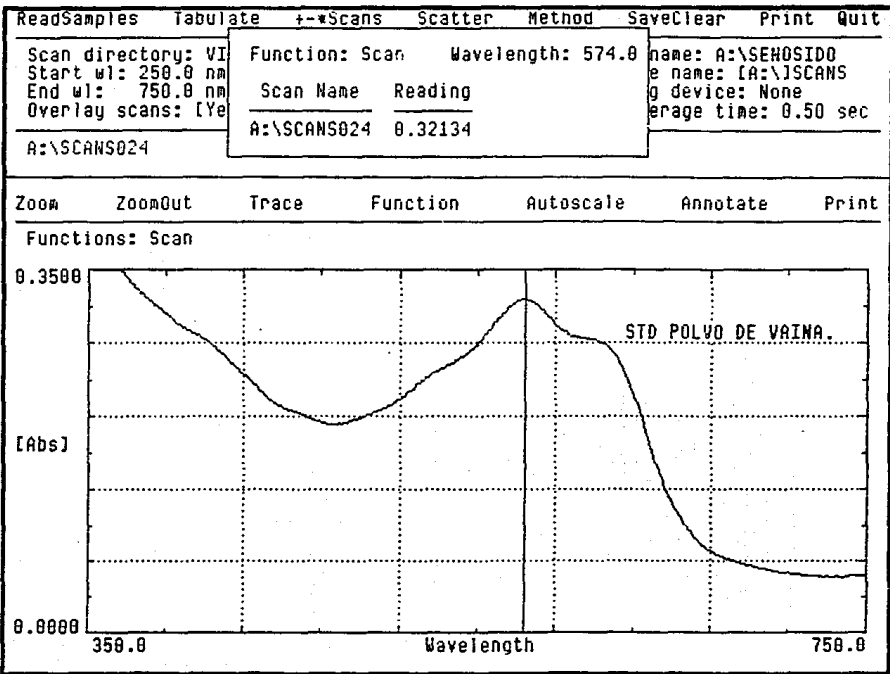
La especificidad del método frente a excipientes se determino analizando las siguientes muestras por separado con el método propuesto:

- a. Estándar
- b. Placebo cargado
- c. Placebo

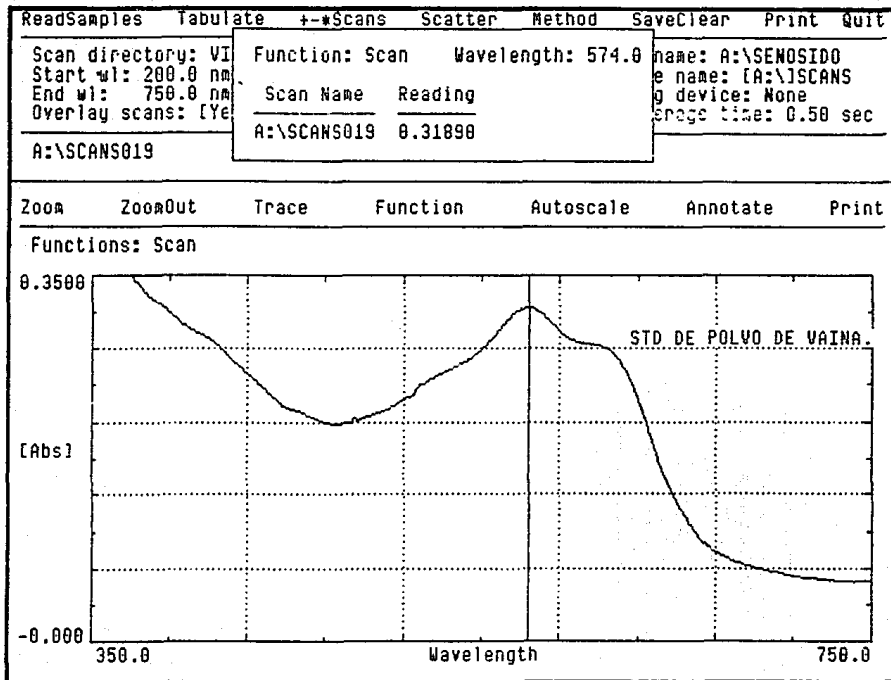
Como podemos observar en los espectros 1, 2, y 3 respectivamente, el método es capaz de cuantificar solamente a las sustancias de interés de cualquier otra interferencia.

La especificidad del método frente a productos de degradación, se determinó analizando las mismas muestras anteriores, pero antes fueron degradadas con peróxido de hidrógeno y con hidroxido de sodio, como lo vemos en los espectros 5 y 6. Las muestras que fueron expuestas a la luz ultravioleta no sufrierón ningún cambio; como lo observamos en el espectro No. 4.

Los resultados obtenidos demuestran que no hay interferencia para la determinación de los senósidos A-B en tabletas.

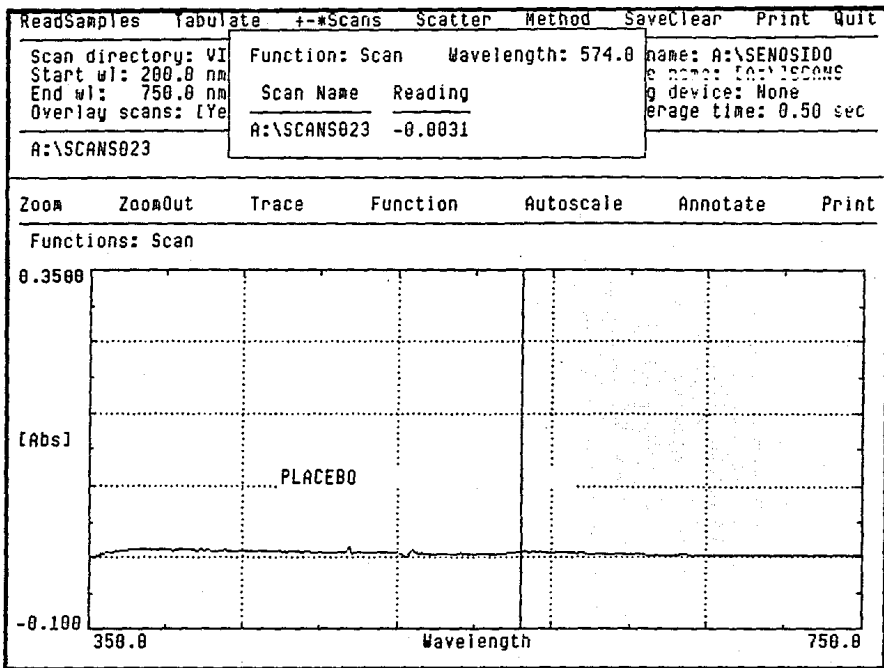


ESPECTRO No. 1
ESTANDAR DE POLVO DE VAINA.



ESPECTRO No. 2

PLACEBO CARGADO.

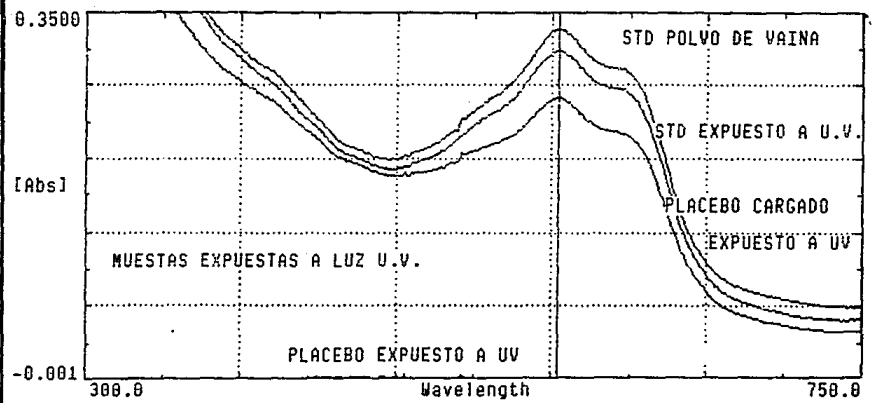


ESPECTRO No. 3

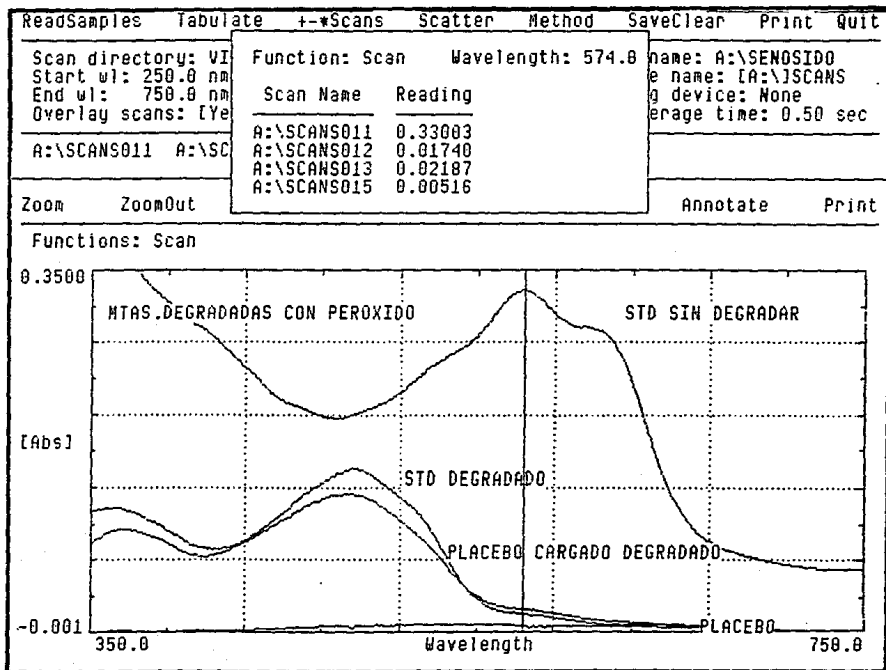
PLACEBO.

ReadSamples	Tabulate	+*Scans	Scatter	Method	SaveClear	Print	Quit
Scan directory: VI		Function: Scan		Wavelength: 574.0		name: A:\SENOSIDO	
Start wl: 250.0 nm		Scan Name		Reading		e name: [A:\]SCANS	
End wl: 750.0 nm		A:\SCANS030		0.31250		g device: None	
Overlay scans: [Ye		A:\SCANS034		0.33381		erage time: 0.50 sec	
A:\SCANS030 A:\SC		A:\SCANS036		0.26764			
		A:\SCANS037		-0.0008			
Zoom	ZoomOut					Annotate	Print

Functions: Scan

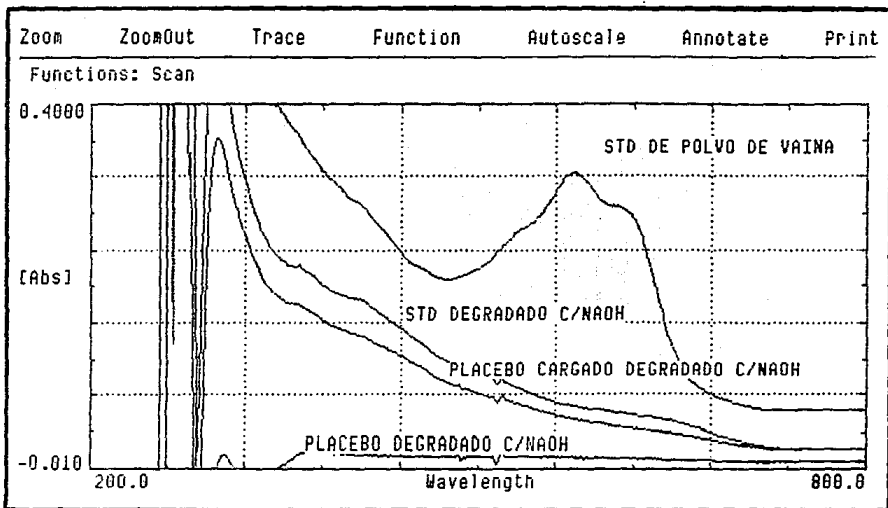


ESPECTRO No. 4
MUESTRAS EXPUESTAS A LUZ ULTRAVIOLETA.



ESPECTRO No. 5

MUESTRAS DEGRADADAS CON PEROXIDO DE HIDROGENO.



ESPECTRO No. 6

MUESTRAS DEGRADADAS CON HIDROXIDO DE SODIO.

9.6 EVALUACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

Se trabajarón placebos cargados al 100% del principio activo, por triplicado, con dos analistas en dos días diferentes. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No. 5

DIA (j)	ANALISTA (i)	
	1	2
1	99.57	100.10
	98.85	100.51
	97.22	104.04
2	100.95	99.21
	99.87	100.90
	99.17	97.10

Tabla No. 5 Muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad del método.

Con los datos de la tabla No. 5 calcular los siguientes parámetros:

Calcular la suma de las combinaciones analista-día (Y_{ij}), de acuerdo a la fórmula 5 del anexo.

$$\begin{aligned}
 Y_{11} &= 295.64 \\
 Y_{12} &= 299.99 \\
 Y_{21} &= 304.65 \\
 Y_{22} &= 297.21
 \end{aligned}$$

Calcular la suma para cada analista ($Y_{i..}$), de acuerdo a la fórmula 6 del anexo.

$$Y_{1..} = 595.63$$

$$Y_{2..} = 601.86$$

Calcular la suma total de ($Y_{...}$), de acuerdo a la fórmula 7 del anexo.

$$Y_{...} = 1197.49$$

Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día, de acuerdo a la fórmula 8 del anexo.

$$\sum \sum Y_{ij}^2 = 358542.4$$

Calcular la suma del cuadrado de cada analista en los dos días, de acuerdo a la fórmula 9 del anexo.

$$\sum Y_{i..}^2 = 717010.6$$

Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado, de acuerdo a la fórmula 10 del anexo.

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 119535.3$$

Calcular la suma de cuadrados del analista (SC_a), efecto del factor analista, con la fórmula 11 del anexo.

$$SC_a = 3.2344$$

Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SC_d), con la fórmula 12 del anexo.

$$SC_d = 12.3794$$

Calcular la suma de cuadrados del error (SC_e), con la fórmula 13 del anexo.

$$SC_e = 21.1411$$

Con los datos obtenidos se construyó la tabla de análisis de varianza, de acuerdo a la tabla No. 1 del anexo.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	gl	SC	MC	F _{calc.}	F _{tab.}
Analista	1	3.2344	3.2344	0.5225	38.51
Día	2	12.3794	6.1897	2.3422	6.06
Error	8	21.1411	2.6426	-----	----

Tabla No. 6 Muestra los resultados obtenidos para el análisis de varianza en la evaluación de la reproducibilidad del método.

Como en ambos casos $F_{\text{calc.}} < F_{\text{tab.}}$ podemos decir que el método es reproducible y que no existe efecto por el día en que se realice el análisis, ni por el analista que lo lleve a cabo.

9.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se analizaron seis muestras sometidas a dos diferentes condiciones y a tres diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la tabla No. 7.

Inicial	Tiempo/Condición		
	24hrs/TA	48hrs/TA	48hrs/refrig.
105.74	104.88	104.59	108.62
109.48	108.90	107.18	110.92
104.59	103.45	102.58	103.45
100.59	98.50	95.52	98.50
97.91	95.52	94.33	94.32
98.80	98.50	97.01	95.82

Tabla No. 7 Muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la estabilidad de la muestra.

Con el S_i/i . $S_i/i = \bar{X}S_i/\bar{X}$

$\bar{X}S_i$ = Media de los valores que obtienen después del tratamiento.

\bar{X} = Media de los valores iniciales.

24hrs/TA = 0.9880

48hrs/TA = 0.9742

48hrs/Ref= 0.9911

Si S_i/i es aproximadamente igual a 1 se considera estable la muestra.

Evaluación de la estabilidad de la muestra a través del estadígrafo " t de Dunnet " (t_D).

Con los resultados de la tabla No. 7 y, aplicando las fórmulas 13, 14, 15 y 16 del anexo se calcularon los siguientes parámetros:

$$\sum \sum Y^2_{ij} = 248627.414$$

$$\sum Y^2_{i..} = 1488164.536$$

$$SCe = - 206589.5203$$

$$MCE = - 10329.47602$$

Aplicando la fórmula 17 del anexo tenemos:

$$t_D (TA/24 \text{ hrs}) = -0.0209$$

$$t_D (TA/48 \text{ hrs}) = -0.04516$$

$$t_D (\text{Ref}/48\text{hrs}) = -0.01556$$

$$t_D \text{ TAB} = t (2,6,0.975) = 2.86$$

Si la t_D calculada es menor que la t_D de tablas podemos concluir que la muestra es estable.

ANALISIS DE RESULTADOS.

1. **Linealidad del sistema.** Un sistema de medición es lineal si su representación gráfica se aproxima a una línea recta, su coeficiente de correlación tiende a uno, su ordenada al origen es igual a cero y su pendiente es igual a uno. Observando la gráfica para la linealidad del sistema y efectuando el análisis estadístico, se comprueba que éste tiene un coeficiente de correlación (r) de 0.9994, una ordenada al origen (a) de -0.8400 y una pendiente (b) de 1.0061. por lo que se considera que el sistema es lineal según los criterios establecidos por la ley General de Salud (5).

2. **Precisión del sistema.** Para métodos espectrofotométricos se considera que el sistema de medición es preciso cuando su coeficiente de variación es menor a 1.5%. Al efectuar el análisis estadístico, el valor de dicho coeficiente es de 1.0279%, por lo que el sistema se considera preciso.

3. **Linealidad del método.** Tomando en cuenta los resultados obtenidos experimentalmente, demuestran que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y). La gráfica de la linealidad del método muestra el comportamiento del activo, el cual es una línea recta.

Al efectuar el análisis estadístico se obtiene un coeficiente de correlación de 0.9986, una ordenada al origen de 1.6036 y una pendiente de 0.9874. Bajo los criterios establecidos por la ley General de Salud, el método se considera lineal.

4. **Exactitud del método.** De acuerdo a la cantidad recuperada y realizando el análisis estadístico, se determinó que éstos caen dentro de los límites permitidos (97-103%), por lo que el método se considera exacto.

5. **Especificidad frente a excipientes.** Al observar las gráficas 1,2,3,4,5, y 6 podemos verificar que tenemos una respuesta nula del placebo, frente al placebo cargado y al principio activo, y no existe interferencia con los productos de degradación.

6. **Precisión del método (Reproducibilidad).** Realizando el análisis estadístico correspondiente, podemos determinar que no existe efecto por el día en que se realice el análisis, ni por el analista que lo lleve a cabo.

7. **Estabilidad de la Muestra.** Los resultados obtenidos demuestran que la muestra es estable a temperatura ambiente por 24 hrs. después de preparada; A las 48 hrs. a TA los resultados ya no son confiables, debido a que hay una disminución de la concentración del activo, en refrigeración son más estables.

CONCLUSIONES

Una vez finalizado este trabajo, podemos decir que el método propuesto para cuantificar Senósidos A-B en tabletas como producto terminado es adecuado, de acuerdo a todos los parámetros evaluados.

La respuesta obtenida por el sistema es lineal y precisa.

El método analítico es lineal, exacto, preciso y reproducible, además de específico para pruebas de rutina (control de calidad).

Las muestras son estables a temperatura ambiente por lo menos 24 horas y, a las 48 horas en refrigeración.

Por todo lo anterior podemos concluir que el método cumple con los requisitos analíticos deseados, por lo que puede emplearse como método rutinario en la cuantificación de los Senósidos A-B en tabletas como producto terminado.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO

1. Linealidad.

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}}{n - 2} \quad \dots\dots 1$$

a. Evaluación de A(a).

$$t_{\text{calc}} = \frac{a - A}{S_{y/x} \sqrt{\sum x^2 / n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \dots\dots 2$$

* Criterio de Aceptación. $t_{\text{calc}} < t(0.975, n-2)$

el método se acepta y podemos decir que tiene una ordena da al origen considerada como "cero".

b. Evaluación de B(b).

$$t_{\text{calc}} = \frac{(b - B) DE(X) \sqrt{n-1}}{S_{y/x}} \quad \dots\dots 3$$

* Criterio de Aceptación. $t_{\text{calc}} < t(0.975, n-2)$

el método se acepta y podemos decir que tiene una pendiente considerada como "uno".

2. Exactitud.

$$t_{\text{calc}} = (\bar{y} - u) / (DE / \sqrt{n}) \quad \dots\dots 4$$

* Criterio de Aceptación. $t_{\text{calc}} < t(0.975, n-1)$

* Si se acepta consideramos al método como exacto.

3. Reproducibilidad.

Combinaciones analista-día (Y_{ij}):

$$\begin{aligned}
 Y_{11.} &= Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} \\
 Y_{12.} &= Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} && \dots\dots 5 \\
 Y_{21.} &= Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} \\
 Y_{22.} &= Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}
 \end{aligned}$$

Suma para cada analista ($Y_{i..}$):

$$\begin{aligned}
 Y_{1..} &= Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} && \dots\dots 6 \\
 Y_{2..} &= Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}
 \end{aligned}$$

Suma total ($Y_{...}$):

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..} \quad \dots\dots 7$$

Suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum Y_{ij.}^2 = (Y_{11.})^2 + (Y_{12.})^2 + (Y_{21.})^2 + (Y_{22.})^2 \quad \dots\dots 8$$

Suma del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum Y_{i..}^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2 \quad \dots\dots 9$$

Suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\begin{aligned}
 \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 &= (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + \\
 &\quad (Y_{223})^2 \quad \dots\dots 10
 \end{aligned}$$

Suma de cuadrados del analista (SC_a):

$$SC_a = \frac{\sum Y_{i..}^2}{d r} - \frac{Y_{...}^2}{a d r} \quad \dots\dots 11$$

donde: a = número de analistas
d = número de días
r = número de repeticiones

Suma de cuadrados del día anidado en el analista (SC_d):

$$SC_d = \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{d r} \quad \dots\dots 12$$

4. Estabilidad de la muestra.

$$\sum \sum Y^2_{ij} = (Y_{a1.})^2 + (Y_{a2.})^2 + \dots + (Y_{d5.})^2 + (Y_{d6.})^2 \dots 13$$

$$\sum Y^2_{i..} = (Y_a)^2 + (Y_b)^2 + (Y_c)^2 + (Y_d)^2 \dots 14$$

$$SCe = \sum \sum Y^2_{ij} - \sum Y^2_{i..} / r \dots 15$$

$$MCe = SCe / t(r-1) \dots 16$$

Donde:

r es el número de replicas.

t es el número de tratamientos.

$$t_D = Y_n - Y_{na} / \sqrt{MCe(2/r)} \dots 17$$

Donde:

Y_n es la media de las combinaciones

Y_{na} es la media de los valores obtenidos inicialmente.

BIBLIOGRAFIA

1. A F M. Asociación farmacéutica Mexicana "Taller de validación" México., 1987., y 1993.
2. AMA Drug Evaluations., Ed. American Medical Association, Chicago, Illinois, 1980. p.p. 975-987.
3. BERMEJO, F. Química Analítica, Vol.II Edit. Paraninfo, 6° Edición. Madrid, España. p.p. 1133-1208.
4. British Pharmacopoeia, 1980 London England Her Majesty's Stationery office; p.p. 2:728.
5. Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud., "Métodos analíticos, validación". México, 1990.
6. CONNORS, K. Análisis Farmacéutico, Ed.Reverte, 2° Edición., México 1981.p.p. 195.
7. DAY,R.A Jr., Underwood A. Química analítica cuantitativa. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., 5° Edición México., 1989. p.p. 459-490.
8. Diario Oficial de la Federación, tomo CDXII, No.11., México, D. F.,18 de Enero de 1988.
9. DUEZ P. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, Hanocq M, Molle Comparison between high-performance thin layer chromatography-fluorometry and high performance liquid chromatography, for the determination of sennosides A and B in

- Senna (cassia spp) pods and leaves. J.Chromatogr. (1984) 303, p.p. 391-395.
10. FEUM. 5° Edición, México, D.F., 1988. Secretaría de Salud. p.p. 1449-1450.
 11. GARRAT, D.C., The Quantitative Analysis of drugs. Third Edition. p.p. 47-50.
 12. GOTH, A. Farmacología Médica, 6° Edición. Editorial Interamericana. p.p. 450-451.
 13. GÖRLER K, Mutter S, Westphal C, Hochdruckflüssigkeits chromatographische Untersuchungen von Sennazubereitungen. Planta Med. (1979) 37 p.p. 308-315.
 14. GUERRA, J. Validation of analytical methods by FDA Laboratories. Pharm. tech. (1986), March 10(3) p.p. 74-78.
 15. HIETALA P, Lainonen H, Marvola M., New Aspects on the metabolism of the sennosides. Pharmacology (1988) 36: suppl. 1. p.p. 138-143.
 16. IRMAN, E.L. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. J. Chrom. Sci. (1987) 25(7).
 17. KAZUHIKO S, Toshiyuki O, Tsguchika Y., Rapid and Simple determination of sennoside A and B in Rhei Rhizoma by ion pair high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography. (1987) 403 p.p. 253-261.

18. LEMMENS L., Determination of dehydroxydianthrone by densitometry after thin-layer chromatographic separation. J. Chromatogr (1977) 132 p.p. 363-365.
19. MARVOLA M, Koponen A, Hiltunen R, Hietala P, J. The effect of raw material purity on the acute toxicity and laxative effect of sennosides. J. Pharm. Pharmacol. (1981) 33 p.p. 108-109.
20. MEYERS H. Manual de farmacología clínica, 4° Edición., Ed. Manual Moderno., México. p.p. 366-368.
21. MUFFAT F, Bernard P, Sabot J F., Determination of sennosides A and B in Senna extracts by high-performance liquid chromatography. J. Chromatography. (1986) 369 p.p. 261-264.
22. OSHIO H, Naruse Y, Tsukui M., Quantitative analysis of the purgative components of rhubarb and senna. Chem. Pharm. Bull. (1978) 26 p.p. 2458-2464.
23. OHSHIMA Y, Ohno Y, Kajiyama K, Takahashi K., High-performance liquid chromatography separation of rhubarb constituents. J. Chromatogr. (1986) 360 p.p. 303-306.
24. OHSHIMA Y, Takahashi K, Separation method for sennosides. J. Chromatogr. (1983) 258 p.p. 292-296.
25. OHSHIMA Y, Takahashi K, Kaizuka H., applications liquid of three-dimensional UV absorbance-high-performance liquid chromatographic patterns for the analysis of plant extracts. J. Chromatogr. (1983) 268 p.p. 522-527.

26. OLUSEGUN OLUWOLE KOMOLAFE, High-pressure liquid chromatographic analysis of sennosides A and B purgative drugs. J. of Pharm. Sciences (1981) July 70 (7) p.p. 727-730.
27. OLUSEGUN OLUWOLE KOMOLAFE, Ion-Pair Partition Chromatography analysis of anthraquinone glycosides of senna and pharmaceutical preparations of senna. J.Chromatogr. Science. (1978) 16 p.p. 496-499.
28. Pharmaceutical Manufactures Association Current Concepts for the validation of compendial assays. Pharmacopeial forum., The United States pharmacopeial convention, Inc. 1986., p.p. 1241-1245.
29. RODRIGUEZ, R. Vademécum académico de medicamentos, Tomo II, 1° Edición, UNAM., México. 1984. p.p. 757-758.
30. SCHENK, H.G., Química analítica cuantitativa. C.E.C.S.A. México. 1984. p.p. 307-355.
31. SKOOG, D.A., Análisis Instrumental, Ed. Interamericana México, 1983. p.p. 27-67.
32. TAYLOR, J.K. Validation of analytical methods. J. Anal. Chem. 55(6), (1983) p.p. 600A.
33. The United States Pharmacopoeia, 22th Edition, USA, 1990.
34. The Merck Index., Eleventh edition, USA, 1989. p.p. 1340.
35. TREASE G.E., Farmacognosia, Ed. Continental México, 1982., p.p. 525-531.

36. VANDERWIELEN J. Guides for assay validation control news bulletin international edition. 1981-1983.
37. VOIGHT R. Tratado de tecnología farmacéutica. Ed. Acribia., México. p.p. 176-224.