



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

43  
209

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

## FALLA DE ORIGEN

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
PARA LA CUANTIFICACION DE  
BEZAFIBRATO EN TABLETAS POR  
ESPECTROFOTOMETRIA

T E S I S

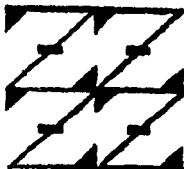
Que para obtener el Título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a :

**MIGUEL ANGEL LUNA ORTIGOZA**

Asesor: Q.F.B. Patricia Parra Cervantex



LO HUMANO  
EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

México, D. F.

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE  
BEZAFIBRATO EN TABLETAS POR ESPECTROFOTOMETRIA**

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** M. EN C. GLORIA VELASQUEZ VAQUERO  
**VOCAL:** Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES  
**SECRETARIO:** Q.F.B. FELIPE PEREZ VEGA  
**SUPLENTE:** M. EN C. LOURDES A. CASTILLO GRANADA  
**SUPLENTE:** Q.F.B. MA. DE LOURDES CERVANTES MARTINEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:**

**DEPARTAMENTO DE DESARROLLO ANALITICO DEL LABORATORIO  
WAYNE S.A. DE C.V.**

**ASESORA DE LA TESIS: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES**

## INDICE

LISTA DE TABLAS.....	1
LISTA DE GRAFICAS.....	11
I. INTRODUCCION.....	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
A. BEZAFIBRATO.....	3
B. ESPECTROFOTOMETRIA.....	9
C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
IV. OBJETIVO.....	32
V. HIPOTESIS.....	33
VI. MATERIALES.....	34
A. MATERIAL.....	34
B. EQUIPO.....	34
C. REACTIVOS.....	34
VII. METODOLOGIA.....	35
A. LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	35
B. PRECISION DEL SISTEMA.....	36
C. ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	36
D. LINEALIDAD DEL METODO.....	37
E. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.....	38
F. PRECISION (REPRODUCIBILIDAD).....	38
G. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.....	39

VIII. RESULTADOS.....	40
IX. DISCUSION DE RESULTADOS.....	53
X. CONCLUSIONES.....	57
XI. ANEXOS.....	59
A. FORMULARIO ESTADISTICO.....	60
B. CALIBRACION DE BALANZA ANALITICA.....	65
C. CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO.....	74
XII. BIBLIOGRAFIA.....	82

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Regiones del espectro electromagnético .....	11
Tabla 2. Valores de % de recobro y CV permitidos en la validación de métodos analíticos.....	27
Tabla 3. Resultados de la linealidad del sistema.....	40
Tabla 4. Resultados de la precisión del sistema.....	43
Tabla 5. Resultados de la especificidad del método.....	44
Tabla 6. Resultados de la linealidad del método.....	45
Tabla 7. Resultados de la exactitud al 100%.....	48
Tabla 8. Resultados de la reproducibilidad.....	49
Tabla 9. Valoraciones en la estabilidad a temperatura ambiente.	50
Tabla 10. Intervalos de confianza para temperatura ambiente.....	51
Tabla 11. Valoraciones en la estabilidad en refrigeración.....	51
Tabla 12. Intervalos de confianza para refrigeración.....	52

## LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Linealidad del sistema.....	41
Gráfica 2. Linealidad del método.....	46
Gráfica 3. Barrido del filtro de óxido de holmio.....	79
Gráfica 4. Curva de calibración para el $K_2Cr_2O_7$ .....	81



## I. INTRODUCCION.

Durante los últimos años la industria farmacéutica ha recurrido al empleo de métodos de análisis que aseguren un adecuado control de la calidad de los medicamentos. En este sentido un aspecto de importancia central es el empleo de técnicas y procedimientos convenientemente validados. La comprobación y verificación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso se ha denominado validación (1).

El bezafibrato es empleado en el ser humano para disminuir los niveles de lípidos (tratamiento de las hiperlipidemias). Este medicamento se fabrica actualmente en forma de tabletas pero su método de análisis no se encuentra validado.

El presente trabajo describe la validación de un método analítico para la determinación del bezafibrato en tabletas por una valoración espectrofotométrica en la región ultravioleta. Los parámetros evaluados fueron:

- \* Linealidad del sistema.
- \* Precisión del sistema.
- \* Especificidad del método.
- \* Linealidad del método.
- \* Exactitud y repetibilidad al 100%.
- \* Reproducibilidad.
- \* Estabilidad de la muestra analítica.

Una vez validado el método analítico, éste podrá ser empleado en el análisis cotidiano del bezafibrato en tabletas con la seguridad de obtener datos verídicos y confiables, siempre y cuando no se modifique alguno de los parámetros establecidos en la validación.

Finalmente, para asegurarse la confiabilidad de los resultados se efectuó la calibración del equipo empleado: balanza analítica y espectrofotómetro.

## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

### A. BEZAFIBRATO.

#### 1. Propiedades físicas y químicas.

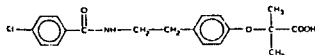
**Nombres químicos.** Acido 2-[p-[2-(p-clorobenzamido) etil] fenoxi]-2-metilpropiónico.

Acido-[4-[2-[(4-clorobenzoi) amino]-etilfenoxi]-2-metilpropanoico.

**Fórmula condensada.**  $C_{13}H_{20}ClNO_4$

**Peso molecular.** 361.83

**Fórmula estructural.**

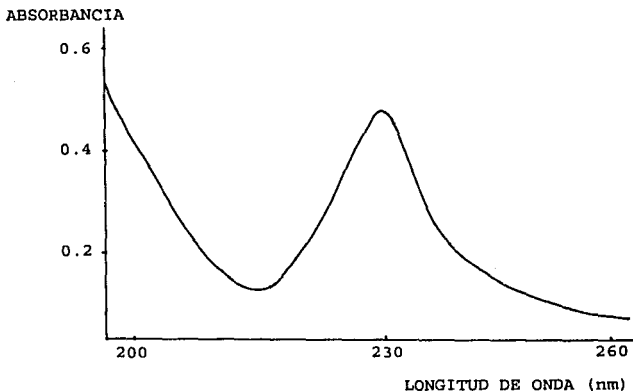


**Solubilidad.** Soluble en etanol, metanol y acetona. Insoluble en agua y ácido clorhídrico. Soluble en álcali caliente.

**Apariencia.** Polvo no cristalino, color blanco-crema.

**Punto de fusión.** 155-156°C.

**Absorción Ultravioleta.** En etanol a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  da una absorbancia aproximada de 0.5 a 230 nm (2,3).



## **2. Métodos de cuantificación.**

En la investigación previa no se encontró un método de cuantificación oficial para el principio activo. Únicamente se encontraron 2 métodos alternativos en diferentes artículos (13,14) y un método de valoración que proporcionaba el proveedor de la materia prima. Los métodos son los siguientes:

**a. Cromatografía de gases.**

Se emplea un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama, una columna de vidrio (2 mm X 4 mm) empacada con 8% de OV-101 en gas-cromo Q. La velocidad de flujo del gas acarreador (nitrógeno) y del hidrógeno es de 60 ml/min; la velocidad del flujo del aire fué de 240 ml/min. El inyector y el detector se operan a 300°C y el horno a 290°C. Bajo estas condiciones el bezafibrato y el estándar interno eluyen después de 4 y 8 min. respectivamente (13).

**b. Cromatografía líquida de alta resolución.**

Se emplea un sistema HPLC isocrático, consistente de una bomba y un espectrofotómetro de longitud de onda variable enfocado a 230 nm. Las muestras se inyectan a través de un muestreador automático.

La columna es de tipo licosfera fase reversa (30 cm X 4.6 mm; tamaño de partícula de 10 $\mu$ ). La fase móvil es buffer de fosfatos 0.01M (pH 3.5)-metanol(40:60). La velocidad de flujo es de 1.0 ml/min a una temperatura ambiente de 25°C (14).

**c. Valoración por espectrofotometría UV.**

Este es el método que describe el proveedor de la materia prima y se basa en la absorción que presenta la molécula del bezafibrato en alcohol metílico a una longitud de onda de 230 nm.

### **3. Propiedades terapéuticas.**

El bezafibrato reduce los niveles elevados de colesterol y triglicéridos en pacientes diabéticos e hiperlipidémicos; está indicado en los casos de pacientes afectados por valores excesivos de glucosa, colesterol y triglicéridos.

Este medicamento disminuye los lípidos sanguíneos elevados (triglicéridos y colesterol) por medio de la reducción de niveles de lipoproteínas, además de mejorar las propiedades de flujo sanguíneo por medio de su acción sobre los factores trombogénicos, por ejemplo: bajando los niveles de fibrinógeno elevado, y por reducción de la viscosidad sanguínea y de la agregación plaquetaria. Además de estimular la actividad de la lipasa de las lipoproteínas, hay indicios de que el bezafibrato aumenta la actividad de la lipasa hepática y el número de receptores de las lipoproteínas de baja densidad en las células hepáticas (4,12).

### **4. Contraindicaciones.**

El bezafibrato está contraindicado en enfermedades hepáticas, enfermedades de la vesícula biliar, trastornos severos de la función renal, embarazo y lactancia. La indicación para el tratamiento en niños debe ser considerada cuidadosamente(4).

## **5. Precauciones.**

En muchos casos los trastornos en el metabolismo de los lípidos pueden ser favorablemente afectados por un cambio en la dieta, incrementando la actividad física, disminuyendo de peso o con un tratamiento adecuado de cualquier otra enfermedad metabólica existente (por ejemplo, diabetes mellitus o gota). Estas medidas deben mantenerse durante la ingestión del medicamento. La acción terapéutica varía considerablemente en cada individuo. En orden de lograr el objetivo deseado, se requiere la ingestión a largo plazo bajo una estricta prescripción médica (4,12).

## **6. Reacciones secundarias y adversas**

Durante el tratamiento con Bezafibrato se pueden presentar síntomas gastrointestinales, como pérdida del apetito, sensación de opresión gástrica, mareos y náuseas, pero generalmente son transitorios y no requieren suspensión del tratamiento. Ocasionalmente puede producir prurito, urticaria, dolor muscular y debilidad muscular (especialmente en las piernas). En general, los efectos colaterales desaparecen rápidamente con la suspensión del tratamiento (4,12).

## **7. Interacciones medicamentosas.**

El bezafibrato puede potencializar la acción de anticoagulantes cumarínicos. Por esta razón la dosis de anticoagulante debe ser reducida entre 30% y 50% al inicio del tratamiento con Bezafibrato y reajustarse después de checar el tiempo de coagulación.

La acción de las sulfonilureas e insulina puede ser potencializada por el Bezafibrato. Los estrógenos pueden llevar a una elevación de los niveles de lípidos; por lo tanto en pacientes hiperlipidémicos que están tomando estrógenos, la prescripción del Bezafibrato debe ser cuidadosamente considerada para cada caso en forma individual (4).

## **8. Dosis y vía de administración.**

Por vía oral, una tableta de 200 mg 3 veces al día. Cuando hay una buena respuesta terapéutica, puede ser intentada una disminución de la dosis a una tableta dos veces al día. Las tabletas deben ser tomadas en la mañana, el mediodía y en la noche, de preferencia después de los alimentos. La dosis de 2 tabletas, deberá tomarse una en la mañana y otra en la noche, de preferencia después de los alimentos (4,12).



## B. ESPECTROFOTOMETRIA.

### 1. Principios teóricos.

La espectrofotometría de absorción consiste en la cuantificación de la absorción de una radiación electromagnética al hacerla pasar sobre una sustancia a una cierta longitud de onda. Esta absorción es producida por la interacción de las moléculas al aplicarle la energía incidente (5).

El análisis espectrofotométrico cuantitativo se basa en la relación de la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente; esta relación puede expresarse en términos de una ley, la ley de Beer que puede expresarse mediante las siguientes ecuaciones:

$$\log \frac{I_0}{I} = abc \quad (1)$$

$$A = abc \quad (2)$$

donde ( $I_0$ ) es la intensidad de luz incidente, ( $I$ ) es la intensidad de la luz después de atravesar el espesor ( $b$ ) de la solución, ( $a$ ) es el coeficiente de absorptividad y ( $c$ ) es la concentración del soluto absorbente.

Las magnitudes espectrofotométricas que se miden son la Transmitancia (T) donde  $T = I / I_0$ , y la Absorbancia (A), donde  $A = \log ( 1 / T )$ . La ley de Beer se expresa más frecuentemente por la ecuación 2, que establece que la absorbancia A, de una solución es directamente proporcional a la concentración (c), del soluto absorbente. A menudo se asocian los nombres de Beer y Lambert con la dependencia de la absorbancia sobre el paso de la luz (b), a través de la solución, y entonces a la ecuación 2 se le llama de Beer-Lambert.

El coeficiente de absortividad (a) es una constante de proporcionalidad que es independiente de la concentración, paso de la luz e intensidad de la radiación incidente. La absortividad depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda de la radiación.

Las unidades de (a) se determinan a partir de las de (b) y (c). Cuando (b) está en centímetros y (c) en gramos por litro el coeficiente de absortividad se expresa en litros por gramo-centímetro. Si (c) es una concentración molar, la absortividad recibe el nombre de coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ), y sus unidades se expresan en litros por mol-centímetro. Los intervalos de longitud de onda que tienen interés en espectrofotometría se definen en la siguiente tabla:

REGIONES	INTERVALO DE LONGITUD DE ONDA
Ultravioleta lejano	100-200 nm
Ultravioleta	200-400 nm
Visible	400-750 nm
Infrarrojo cercano	750-4000 nm
Infrarrojo	4000-25000 nm

**Tabla No 1. Regiones del espectro electromagnético.**

Los espectros ultravioleta y visible de una sustancia no tienen un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy adecuados para las determinaciones cuantitativas y, en el caso de muchas sustancias, constituyen un medio útil de identificación (5,6).

## **2. Aparato**

Básicamente todos los espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación monocromática a través de la solución problema, convenientemente preparada y hagan posible la medición de la fracción de radiación transmitida.

El espectrofotómetro consta de los siguientes componentes:

- a. *Fuente de radiación.*
- b. *Selector de longitud de onda.*
- c. *Celda.*
- d. *Detector.*
- e. *Medidor o registrador.*

**a. Fuente de radiación.**

Una lámpara de tungsteno es una buena fuente de radiación para la región visible. En la región ultravioleta la fuente de energía usual es una lámpara de descarga de hidrógeno, que emite radiación de intensidad casi constante en todo el intervalo del ultravioleta (6).

**b. Selector de longitud de onda.**

La determinación de un espectro de absorción requiere la medida de la absorbancia o de la transmitancia como función de la longitud de onda. Es necesario, contar con la opción de seleccionar la longitud de onda (o la frecuencia) de la radiación. Por lo general, el elemento dispersante (la unidad que separa la luz en sus longitudes de onda componentes) en un espectrofotómetro es una rejilla de difracción. Para la luz visible, el vidrio es un buen material para la rejilla, pero este material no resulta apropiado para la luz ultravioleta, ya que la absorbe y por ello se dispersa con una rejilla de sílice.

La rejilla descompone la luz en sus longitudes de onda, es decir, en bandas estrechas que contienen muy pocas longitudes de onda. La rejilla, con los elementos ópticos asociados, se le conoce como monocromador (5,6).

**c. Control de la intensidad.**

La cantidad de luz requerida para atravesar la muestra dependerá de su longitud de onda (puesto que la respuesta del detector varía con la longitud de onda) y de la naturaleza de la muestra. Por ello en la mayoría de los espectrofotómetros hay uno o más mecanismos de rendijas, que regulan la intensidad de la salida de la luz (6).

**d. Celdas.**

Todos los estudios espectrales en las regiones ultravioleta y visible se efectúan en soluciones diluídas. Las celdas que contendrán a la muestra deben ser transparentes a la luz, por lo que se emplean celdas de vidrio en la región visible y celdas de sílice en el ultravioleta. Las celdas de vidrio son aptas para medir por arriba de los 325 nm; por debajo de esta longitud de onda el vidrio presenta absorción (6).

**e. Detector.**

En los espectrofotómetros visible y ultravioleta se emplean como detectores dispositivos electrónicos sensibilizadores, que se conocen como fototubos o tubos fotomultiplicadores (6).

**f. Medidor o registrador.**

La señal del detector se alimenta con un circuito potenciométrico, que se gradúa para obtener una lectura de transmitancia o absorbancia. Los espectrofotómetros registradores trazan un registro de la absorbancia o la transmitancia sobre papel; en estos equipos se registra automáticamente el espectro de absorción completo, y el propio aparato "barre" el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva absorbancia-longitud de onda (6).

**3. Aplicaciones.**

Las aplicaciones más importantes de la espectrofotometría de absorción en la región ultravioleta-visible son (5,6):

- a. *Espectros de absorción.*
- b. *Valoraciones de un solo componente.*
- c. *Valoraciones de más de un componente.*
- d. *Determinación de constantes de equilibrio.*
- e. *Determinación de constantes de velocidad.*

**a. Espectros de absorción.**

Para obtener un espectro de absorción se mide la absorbancia o transmitancia de una solución como función de la longitud de onda o frecuencia de la luz. Estos espectros se obtienen

trazando la absorbancia en el eje de las ordenadas, con respecto a la longitud de onda en el eje de las abscisas. Las longitudes de onda que corresponden al máximo y mínimo en la gráfica se simbolizan por  $\lambda_{\text{máx}}$  y  $\lambda_{\text{mín}}$ .

Como se sabe, los diferentes espectrofotómetros pueden mostrar pequeñas variaciones en la longitud de onda aparente de este máximo. En la práctica se recomienda emplear la longitud de onda máxima observada realmente en el instrumento que se maneja, siempre que la diferencia entre una y otra no pase de  $\pm 0.5$  nm en el intervalo de 240-280 nm, de  $\pm 1$  nm en el intervalo de 280-320 nm o de 2 nm arriba de los 320 nm (5,6).

**b. Valoración de un sólo componente.**

Si en una serie de soluciones de concentraciones conocida de una misma sustancia se mide la absorbancia de cada una de ellas a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución, y se grafica la absorbancia de cada solución en función de su concentración, se obtendrá por lo general una línea recta que pasa por el origen de acuerdo a la ley de Beer. La longitud de onda seleccionada para la determinación de la absorptividad es usualmente  $\lambda_{\text{máx}}$ , por dos razones:

1) La sensibilidad máxima se alcanza trabajando en el máximo de la banda, puesto que una concentración dada produce la señal más fuerte a esta longitud de onda.

2) La variación de la absorbancia para pequeños cambios de la longitud de onda debe ser mínima en el máximo de la banda (a menos que la banda sea en extremo pronunciada).

Una vez determinada la absorptividad de la sustancia (a una longitud de onda fija) se procede al análisis de muestras de concentración desconocida de esta misma sustancia. Se prepara una solución de la sustancia en el mismo disolvente utilizado para las muestras conocidas, la concentración estimada para la solución debe estar dentro del intervalo que limitan las concentraciones extremas, usadas en el estudio de la ley de Beer. Se mide la absorbancia de la muestra de interés a la longitud de onda establecida, luego se calcula la concentración desconocida a partir de la ecuación de la ley de Beer, o también, se lee directamente a partir de la gráfica de la ley de Beer.

Otro método es leer al mismo tiempo la solución de la muestra y una solución preparada con un patrón de referencia. El patrón es el mismo compuesto que la muestra, pero de pureza conocida.

**c. Valoración de más de un componente.**

Cuando se tiene una mezcla de dos sustancias, primero se deben determinar los espectros de absorción de los dos componentes puros, los cuales se comparan convirtiendo los valores de



absorbancia a un dato común, como absorptividades molares, y se procede a superponer los espectros. Enseguida se seleccionan dos longitudes de onda analíticas de tal forma que sea máxima la diferencia entre la absorción de los compuestos a estas longitudes de onda, siendo la absorptividad del compuesto A mayor que para el B a una longitud de onda y menor que la otra.

Posteriormente se trazan las gráficas de la ley de Beer, utilizando soluciones de las sustancias puras para cada compuesto a cada longitud de onda. Se obtienen así cuatro gráficas de la ley de Beer, a partir de las cuales se calculan cuatro absorptividades. Con estos datos se puede analizar cualquier solución que contenga los dos compuestos.

***d. Determinación de constantes de equilibrio.***

La determinación de una constante de equilibrio requiere el cálculo de las concentraciones de equilibrio de los reactivos por análisis directo o por análisis combinado, con el conocimiento de la estequiometría de la reacción. Si los espectros de absorción de las especies que intervienen en la reacción, son lo suficientemente distintos, resulta posible determinar de modo espectrofotométrico la constante de equilibrio.

**e. Determinación de las constantes de velocidad.**

En ocasiones, es importante medir la velocidad de una reacción, por ejemplo, cuando se evalúa la estabilidad de un principio activo en un medicamento. Si la molécula reactiva tiene un espectro de absorción diferente al de su producto, entonces ocurre un cambio espectral cuando se produce la reacción, y en este caso la espectrofotometría es un método de análisis apropiado para el estudio de la velocidad de esta reacción.

**C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.**

**1. Importancia de la Validación.**

Existen dos razones importantes para validar los métodos analíticos en la industria farmacéutica. En primer lugar la validación de métodos analíticos es una parte integral dentro del sistema de control de calidad. En segunda las regulaciones de las Prácticas Adecuadas de Manufactura vigentes requieren de los ensayos de la validación (12).

Dentro del sistema integral de la calidad la industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación debido a la creciente lista de medicamentos nuevos. En este sentido, cada medicamento requiere de métodos de valoración apropiados que garanticen su calidad antes, durante y después de su fabricación.

## **2. Terminología.**

La validación de un método analítico puede definirse como una serie de pruebas experimentales por las cuales queda establecido de manera objetiva que el método de análisis reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera, que la validación de un método en particular está basado en principios científicos y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición (7,8).

Los parámetros típicos que deben ser considerados en la validación son: precisión, exactitud, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, linealidad y reproducibilidad (9). Otro parámetro de vital importancia que no siempre se considera es la estabilidad de la muestra analítica. Cada uno de los parámetros serán definidos a continuación (8,9,10,11).

### **a. Precisión.**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento es aplicado varias veces a muestras múltiples de una muestra homogénea. La precisión normalmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (denominada coeficiente de variación). La precisión es una medida del grado de reproducibilidad de un método analítico

**b. Exactitud.**

La exactitud es la concordancia de resultados obtenidos en un método con respecto a un valor verdadero. Esta exactitud a menudo se expresa como el porcentaje de recobro obtenido en la valoración de cantidades conocidas, adicionadas al producto de interés.

**c. Límite de detección.**

El límite de detección es la mínima concentración del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. Este límite de detección usualmente se expresa en términos de concentración (p. ej. porcentaje, partes por millón).

**d. Límite de cuantificación.**

Es el parámetro que cuantifica niveles bajos de ciertos compuestos en un medicamento dado, tales como impurezas y productos de degradación. Es la más baja concentración del analito en una muestra, que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones experimentales establecidas. Este límite se expresa en términos de concentración (p. ej. porcentaje, partes por millón).

**e. Selectividad.**

La selectividad (también denominada especificidad) de un método analítico es la habilidad para cuantificar de una forma exacta y específica a la sustancia de interés en presencia de otros componentes. Estos componentes pueden ser impurezas añadidas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o placebos. La selectividad es una medida del grado de interferencia (o ausencia de ella) en el análisis de muestras.

**f. Rango.**

El rango de un método analítico es el intervalo comprendido entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia de interés (incluyendo estos niveles) en los cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal. El rango se expresa en las mismas unidades de los resultados obtenidos por el método analítico (p. ej. porcentaje, partes por millón).

**g. Linealidad.**

La linealidad de un método analítico es la habilidad de asegurar que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia de interés en una muestra dentro de un rango dado. Esta proporcionalidad puede ser establecida mediante una transformación matemática bien definida. La linealidad se expresa usualmente en términos

del valor de la pendiente de una regresión lineal. Esta regresión se obtiene del análisis de muestras a diferentes niveles de concentración.

***h. Reproducibilidad.***

Es el grado de reproducibilidad de resultados obtenidos en el análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones de prueba, tales como diferentes laboratorios, diferentes instrumentos, diferentes lotes o reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes días, etc.

***i. Estabilidad de la muestra analítica.***

Esta evaluación determina el período de tiempo dentro del cuál la solución a analizar mantiene su integridad fisicoquímica bajo ciertas condiciones de almacenaje. Este período de tiempo puede ser pequeño (minutos) o prolongado (días) dependiendo de los cambios observados en la muestra a lo largo del estudio.

**3. Determinaciones y criterios de aceptación.**

***a. Linealidad del sistema.***

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución estándar y efectuando análisis cuando menos por duplicado para

cada dilución.

El intervalo de las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y para el seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100% (19).

**\* Criterio de aceptación.**

Construir la tabla del análisis de la varianza (ANADEVA) y determinar en la tabla de la distribución "F" de Fisher los valores para:

$F(gl_r, gl_{er}; 0.01)$  y  $F(gl_{fa}, gl_{ep}; 0.05)$

Donde:  $gl_r$  : grados de libertad de la regresión.

$gl_{er}$  : grados de libertad del error de regresión.

$gl_{fa}$  : grados de libertad de la falta de ajuste.

$gl_{ep}$  : grados de libertad del error puro.

Establecer la decisión con base a la siguiente regla<sup>1</sup>

Si  $F_r \geq F(gl_r, gl_{er}; 0.01)$  :

*Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.*

---

<sup>1</sup>Para cualquier duda sobre la abreviación estadística consultar el anexo A, formulario estadístico.

Si  $F_r < F(\text{gl } r, \text{gl } er; 0.01)$  :

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Si  $F_{fa} \geq F(\text{gl } r, \text{gl } er; 0.05)$  :

Existe falta de ajuste a la relación lineal simple: cantidad adicionada y propiedad medida.

Si  $F_{fa} < F(\text{gl } r, \text{gl } er; 0.05)$  :

No existe falta de ajuste a la relación lineal simple: cantidad adicionada y propiedad medida.

Asimismo  $r^2 \geq 0.98$

**b. Precisión del sistema.**

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema (19).



**\* Criterio de aceptación.**

El coeficiente de variación,  $CV \leq 3\%$

**c. Especificidad del Método**

Se analiza un placebo que contenga los demás componentes de la formulación. Analizar las respuestas que pudieran presentar (19).

**\* Criterio de aceptación.**

La respuesta del placebo no deberá ser mayor del 1%

**d. Linealidad del método.**

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente y efectuando el análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicación del método (control de calidad, estudio de estabilidad) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación (19).

**\* Criterio de aceptación.**

Construir la tabla de análisis de la varianza (ANAEVA) y determinar en la tabla de la distribución "F" de Fisher los valores para:

$F(1, gl_{er}; 0.99)$  y  $F(gl_{fa}, gl_{ep}; 0.95)$

Establecer la decisión con base a la siguiente regla:

Si  $F_r \geq F(1, gl_{er}; 0.99)$  :

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si  $F_r < F(1, gl_{er}; 0.99)$  :

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si  $F_{fa} \geq F(gl_{fa}, gl_{ep}; 0.95)$  :

Existe falta de ajuste a la relación lineal simple: cantidad adicionada y cantidad recuperada.

Si  $F_{fa} < F(gl\ fa, gl\ ep; 0.95)$  :

No existe falta de ajuste a la relación lineal simple: cantidad adicionada y cantidad recuperada.

En la gráfica de cantidad adicionada vs cantidad recuperada debe cumplirse lo siguiente:  $m=1$ ,  $b=0$  y  $r^2 > 0.98$

Los % recuperados y el CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo con la tabla 2.

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Cromatográficos	98-102 %	$\leq 2\%$
Volumétricos	98-102 %	$\leq 2\%$
Químicos y espectrofotométricos	97-103 %	$\leq 3\%$
Microbiológicos	95-105 %	$\leq 5\%$

**Tabla 2. Valores de %recobro y CV permitidos en la validación de metodos analíticos.**

**e. Exactitud y repetibilidad al 100%.**

Este parámetro se determina, cuando menos, con 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. El análisis se efectúa bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista (19).

**\* Criterio de aceptación.**

El  $CV \leq 3\%$ . El intervalo de confianza para la media  $IC(M)$  debe incluir el 100%.

**f. Precisión (Reproducibilidad).**

Se determina con una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado (19).

**\* Criterio de aceptación.**

Construir la tabla de análisis de la varianza (ANAVEVA) y determinar en la tabla de la distribución "F" de Fisher los valores para:

$F(gl\ a, gl\ d; 0.05)$  y  $F(gl\ d, gl\ e; 0.05)$

Donde:  $gl\ a$  = grados de libertad del analista.

$gl\ d$  = grados de libertad del día.

$gl\ e$  = grados de libertad del error.

Establecer la decisión con base a la siguiente regla:

Si  $F_a \geq F(\text{gla}, \text{gld}; 0.05)$  :

*El método analítico no es  
reproducible por los analistas.*

Si  $F_a < F(\text{gla}, \text{gld}; 0.05)$  :

*El método analítico es  
reproducible por los analistas.*

Si  $F_d \geq F(\text{gld}, \text{gle}; 0.05)$  :

*El método analítico no es  
reproducible en distintos días por un  
mismo analista.*

Si  $F_d < F(\text{gld}, \text{gle}; 0.05)$  :

*El método analítico es  
reproducible en distintos días por un  
mismo analista.*

Asimismo CV total  $< 3\%$

**g. Estabilidad de la muestra analítica.**

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis de 3 muestras con los obtenidos de las mismas

muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las muestras pueden ser almacenadas bajo distintas condiciones (p. ej. en refrigeración, a temperatura ambiente, protegidas de la luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del principio activo.

El reanálisis se efectúa bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista (19).

**\* Criterio de aceptación.**

La muestra es estable si la valoración de las muestras reanalizadas, es estadísticamente equivalente a la valoración inicial. Si en el intervalo de confianza se incluye el cero, se puede concluir que la valoración del tratamiento respectivo, es equivalente a la valoración inicial.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El bezafibrato fué analizado en 1978 por Endele R. mediante cromatografía de gases en suero y orina humanos (13). Posteriormente en 1985 Castoldi D., Monzani V. y Toffaneti O. (14) lo cuantificaron en plasma y orina humano por Cromatografía Líquida de Alta Resolución; en este segundo estudio determinaron la exactitud y la precisión del método analítico así como la sensibilidad. A la fecha el único análisis reportado para la cuantificación de Bezafibrato en tabletas es el proporcionado por el proveedor de la materia prima, pero al no ser oficial debe ser validado.

Este método de valoración está basado en que el bezafibrato presenta un máximo de absorción a una longitudes de onda de aproximadamente 230 nm, empleando como disolvente etanol al 96%.

Por medio de esta validación se pretende asegurar que el método de valoración brinde resultados confiables, exactos y reproducibles. Asimismo, el método se ajustará a las condiciones de trabajo del laboratorio para poder utilizarlo como un método de análisis rutinario en control de calidad.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados se trabajó con una balanza analítica y un espectrofotómetro apropiadamente calibrados (ver anexos B y C).

#### **IV. OBJETIVO.**

Validar un método analítico para la cuantificación de Bezafibrato en tabletas por medio de una valoración espectrofotométrica en la región ultravioleta.



## V. HIPOTESIS.

Considerando que el Bezafibrato absorbe en la región Ultravioleta sin que exista interferencia por parte de los excipientes de la tableta, la validación del método podrá efectuarse obteniendo un método preciso, exacto, lineal y reproducible en el intervalo de concentración comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## **VI. MATERIAL.**

### **A. MATERIAL.**

Matraces volumétricos de 50 ml (Kimax)  
Matraces volumétricos de 100 ml (Pyrex)  
Matraces volumétricos de 200 ml (Pyrex)  
Pipetas volumétricas 2, 3 y 5 ml (Kimax)  
Probeta de 50 ml (kimax)  
Bureta de 10 ml (kimax)  
Papel filtro Whatman #40  
Embudos de plástico  
Espátula de acero inoxidable

### **B. EQUIPO.**

Balanza analítica. Marca AND, Modelo ER-180A. Sensib. 0.1mg.  
Espectrofotómetro UV. Marca Perkin Elmer, Modelo Lambda 2.  
Baño de ultrasonido. Marca Cole Parmer, Modelo 8850.  
Impresora con graficador. Marca Epson, Modelo FX-380

### **C. REACTIVOS.**

Etanol al 96% (J.T. Baker)  
Polvo placebo de tabletas de Bezafibrato  
Bezafibrato materia prima. No de análisis 218-91.  
Bezafibrato estándar de referencia. Clave SSD-96  
Tabletas de Bezafibrato. Lote 024-061.

## VII. METODOLOGIA.

### A. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

1. Pesar exactamente 20 mg de Bezafibrato estándar de referencia y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con etanol. Se obtiene una solución stock de 0.20 mg/ml.

2. De esta solución tomar por duplicado los siguientes volúmenes para sus respectivos niveles:

Nivel 60%  $\Rightarrow$  3 ml y llevar a 100 ml.

Nivel 80%  $\Rightarrow$  2 ml y llevar a 50 ml.

Nivel 90%  $\Rightarrow$  4.5 ml y llevar a 100 ml.

Nivel 100%  $\Rightarrow$  5 ml y llevar a 100 ml.

Nivel 120%  $\Rightarrow$  3 ml y llevar a 50 ml.

3. Aforar cada matraz con etanol. Se obtienen así las siguientes concentraciones:

Nivel 60%  $\Rightarrow$  6.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 80%  $\Rightarrow$  8.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 90%  $\Rightarrow$  9.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 100%  $\Rightarrow$  10.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 120%  $\Rightarrow$  12.0  $\mu\text{g/ml}$

Leer en el espectrofotómetro a 230.5 nm empleando etanol como blanco.

## **B. PRECISION DEL SISTEMA.**

1. De la solución stock anterior tomar por sextuplicado 5 ml y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml (Nivel del 100%).

2. Aforar cada matraz con etanol y leer en el espectrofotómetro a 230.5 nm empleando etanol como blanco.

## **C. ESPECIFICIDAD DEL METODO.**

1. Pesar por triplicado las siguientes sustancias y depositar en matraces volumétricos de 100 ml:

a. 41.3 mg de placebo.

b. 25.0 mg de bezafibrato materia prima.

c. 41.3 mg de placebo y 25.0 mg de bezafibrato materia prima.

A cada matraz añadir 50 ml de etanol y sonicar por 10 minutos. Aforar con etanol, filtrar y desechar los primeros ml.

2. De cada solución filtrada tomar 2 ml y llevar a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con etanol.

3. Leer en el espectrofotómetro a 230.5 nm empleando etanol como blanco y comparando con un estándar.

4. Preparación del estándar. Pesar 25 mg de bezafibrato estándar de referencia y llevar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con etanol. Tomar una alícuota de 2 ml y llevar a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con etanol. Este estándar tiene una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

#### D. LINEALIDAD DEL METODO.

1. Pesar por triplicado cada una de las siguientes cantidades y depositarlas en matraces volumétricos de 100 ml:

Nivel 80% = 41.3 mg de placebo y 20.0 mg de materia prima

Nivel 90% = 41.3 mg de placebo y 22.5 mg de materia prima

Nivel 100% = 41.3 mg de placebo y 25.0 mg de materia prima

Nivel 120% = 41.3 mg de placebo y 30.0 mg de materia prima

2. A cada matraz añadir 50 ml de etanol y sonicar por 10 minutos. Aforar con etanol, filtrar y desechar los primeros mls.

3. De cada solución filtrada tomar 2 ml y llevar a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con etanol. Se obtienen así las siguientes concentraciones de Bezafibrato:

Nivel 80% = 8.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 90% = 9.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 100% = 10.0  $\mu\text{g/ml}$

Nivel 120% = 12.0  $\mu\text{g/ml}$

4. Leer cada solución en el espectrofotómetro a 230.5 nm comparando con un estándar preparado como se indica en la especificidad del método.

## **E. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%**

1. Pesar por sextuplicado 41.3 mg de placebo y 25 mg de materia prima y depositar en matraces volumétricos de 100 ml.

2. Efectuar el mismo tratamiento que a las muestras de la linealidad del método.

## **F. PRECISION (REPRODUCIBILIDAD).**

Moler 20 tabletas de Bezafibrato hasta obtener un polvo homogéneo. De aquí tomar lo indicado para ambos días.

DIA 1.

Cada uno de los dos analistas efectuará el siguiente análisis por triplicado:

1. Pesar el equivalente a 25 mg de Bezafibrato (aprox. 66.3 mg de polvo) y depositar en un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar 50 ml de etanol, sonicar por 10 minutos y aforar con etanol.

2. Filtrar y desechar los primeros mls. De la solución filtrada tomar 2 ml y llevar a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con etanol.

3. Leer en el espectrofotómetro a 230.5 comparando con un estándar preparado como se indica en la especificidad del método.

Emplear etanol como blanco.

DIA 2.

Repetir el procedimiento del día 1.

## G. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

1. Preparar 6 muestras como se indica en la reproducibilidad y leer inicialmente. Dividir los matraces en dos grupos de 3. El primero de ellos someterlo a refrigeración y el otro mantenerlo a temperatura ambiente.

2. Leer en el espectrofotómetro a 230.5 nm a los tiempos 1, 3, 6 y 24 horas. Comparar con un estándar similar al indicado en la especificidad y preparado a la hora de la lectura. Emplear etanol como blanco.

## VIII. RESULTADOS.

### A. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

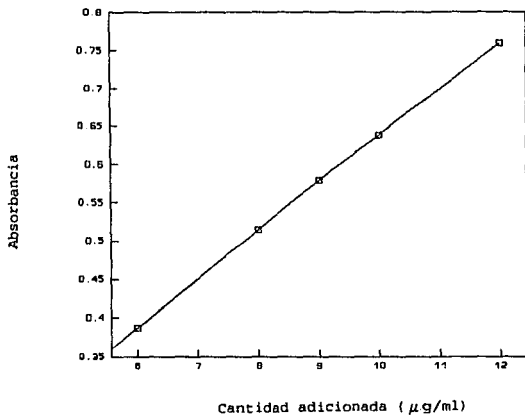
Se obtuvo la siguiente tabla :

Cantidad adicionada $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
6.0	0.388
6.0	0.387
8.0	0.515
8.0	0.514
9.0	0.577
9.0	0.579
10.0	0.637
10.0	0.637
12.0	0.759
12.0	0.759

Tabla No. 3. Resultados de  
la linealidad del sistema.



Gráfica No. 1. Linealidad del Sistema



$$b = 0.0185$$

$$m = 0.0618$$

$$r = 0.9977$$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
Regresión	1	0.1500	0.1500	500.00
Error de Regresión	8	0.0030	0.0003	
Falta de ajuste	3	0.0030	0.0010	0.0000
Error puro	5	0.0000	0.0000	

$F_r \geq F_{tab}$

500.00  $\geq$  11.26 Existe relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

$F_{fa} \leq F_{tab}$

0.00  $\leq$  5.41 No existe falta de ajuste a la relación lineal de cantidad adicionada y propiedad medida.

Por lo anterior EL SISTEMA ES LINEAL.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

IC(B): 0.0185  $\pm$  0.0647

## B. PRECISION DEL SISTEMA.

Se obtuvo la siguiente tabla para el nivel del 100%:

Cantidad adicionada $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
10.0	0.651
10.0	0.648
10.0	0.653
10.0	0.647
10.0	0.647
10.0	0.649

Tabla No. 4. Resultados de la  
precisión del sistema.

$$DE = 0.0024$$

$$Y = 0.6491$$

$$CV = 0.3697\%$$

puesto que  $CV \leq 1.5\%$  EL SISTEMA ES PRECISO.

### C. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Se obtuvieron las siguientes absorbancias para las distintas sustancias sometidas a la determinación:

Sustancia	Conc. $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia	Abs. promedio
Placebo	16.5	0.003	0.003
	16.5	0.007	
	16.5	0.001	
Principio activo solo	10.0	0.648	0.648
	10.0	0.647	
	10.0	0.651	
Principio activo + placebo	10.0 + 16.5	0.643	0.644
	10.0 + 16.5	0.645	
	10.0 + 16.5	0.645	
Estándar	10.0	0.646	----

Tabla No. 5. Resultados de la especificidad del método.

$$\% \text{ Resp} = (0.003/0.646)100 = 0.46\%$$

Por lo tanto  $\% \text{ Resp} \leq 1\%$  y EL METODO ES ESPECIFICO

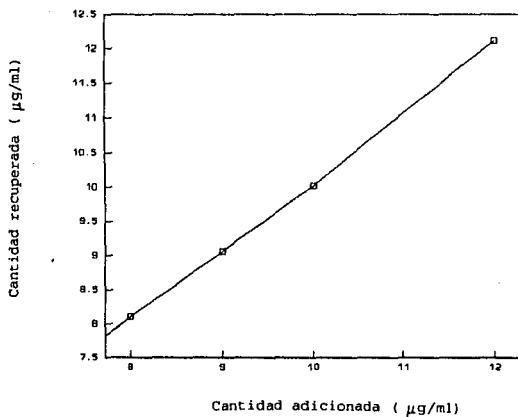
#### D. LINEALIDAD DEL METODO.

Se obtuvo la siguiente tabla:

$\mu\text{g}$ adicionados	$\mu\text{g}$ recuperados	% recuperado
8.0	8.09	101.15
8.0	8.12	101.50
8.0	8.12	101.50
9.0	9.07	100.83
9.0	9.10	101.22
9.0	9.03	100.44
10.0	10.01	100.16
10.0	10.01	100.16
10.0	10.04	100.47
12.0	12.15	101.26
12.0	12.06	100.50
12.0	12.13	101.10

Tabla No. 6. Resultados de la linealidad del método.

Gráfica No. 2. Linealidad del método



$$b = 0.058$$

$$m = 1.002$$

$$r = 0.9990$$

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
Regresión	1	26.3551	26.3551	10542.04
Error de regresión	10	0.0253	0.0025	
Falta de ajuste	2	0.0172	0.0008	0.8000
Error puro	8	0.0081	0.0010	

$$F_r \geq F(1, g_{ler}; 0.99)$$

10542.04  $\geq$  10.04      Existe relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

$$F_{fa} \leq F(g_{lfa}, g_{lep}; 0.95)$$

0.80  $\leq$  4.46      No existe falta de ajuste a la relación lineal simple: cantidad adicionada y cantidad recuperada.

Por lo anterior EL METODO ES LINEAL.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(B) = 0.058 \pm 0.2152$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(M) = 1.0097 \pm 0.0216$$

## E. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

Se obtuvo la siguiente tabla para el nivel del 100%:

Cantidad adicionada $\mu\text{g/ml}$	% recuperado
10.0	100.16
10.0	100.16
10.0	100.47
10.0	100.31
10.0	99.54
10.0	99.70

**Tabla No. 7. Resultados de  
la exactitud al 100%**

$$DE = 0.3607$$

$$\bar{x} = 100.0566$$

$$CV = 0.3604\%. \quad CV \leq 3\bar{x}$$

EL METODO ES EXACTO Y REPETIBLE AL 100%

Intervalo de confianza para % de Recobro.

$$IC(R): 100.0566 \pm 0.3785$$



## F. REPRODUCIBILIDAD.

Se obtuvieron las siguientes valoraciones en % recuperados:

ANALISTA

DIA	1	2
1	98.45	98.33
	98.29	98.48
	97.82	97.87
2	98.74	97.99
	99.53	98.76
	98.59	99.23

Tabla No. 8. Resultados de  
la reproducibilidad

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
Regresión	1	26.3551	26.3551	10542.04
Error de regresión	10	0.0253	0.0025	-----
Falta de ajuste	2	0.0253	0.0008	0.8000
Error puro	8	0.0081	0.0010	----

Fa < Ftab

0.0827 < 18.51

El método analítico es reproducible por los dos analistas.

Fd < Ftab

2.7202 < 4.46

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

EL METODO ES REPRODUCIBLE POR DOS ANALISTAS

EN DOS DIAS DIFERENTES.

Repetibilidad:  $R = \pm 0.4623$

CV total = 0.52%

### G. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

#### 1). Temperatura ambiente.

Se obtuvieron las siguientes valoraciones en Porciento de recobro (%):

MUESTRA	INICIAL	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
1	99.85	99.62	100.62	99.09	100.78
2	99.85	99.46	99.16	98.48	99.69
3	100.00	99.54	99.01	99.33	99.69

Tabla No. 9. Valoraciones en la estabilidad a temperatura ambiente.

Se obtuvieron los siguientes intervalos de confianza:

TIEMPO	INTERVALO DE CONFIANZAS
1 HORA	[ -1.6054 , 0.8854 ]
3 HORAS	[ -1.5554 , 0.9354 ]
6 HORAS	[ -2.1854 , 0.3054 ]
24 HORAS	[ -1.0954 , 1.3954 ]

Tabla No. 10. Intervalos de Confianza para temperatura ambiente.

Se observa que todos los IC incluyen el valor de 0, por ello se asume que LA MUESTRA ANALITICA ES ESTABLE HASTA LAS 24 HS A TEMPERATURA AMBIENTE.

## 2). Refrigeración.

Se obtuvieron las siguientes valoraciones en porciento de recobro (%):

MUESTRA	INICIAL	1 HORA	3 HORAS	6 HORAS	24 HORAS
1	100.93	99.08	100.16	100.98	101.21
2	100.47	99.70	100.77	100.52	100.86
3	100.47	100.93	100.93	100.59	101.33

Tabla No. 11. Valoraciones en la estabilidad en Refrigeración.

Se obtuvieron los siguientes intervalos de confianza:

TIEMPO	INTERVALO DE CONFIANZA
1 HORA	[ -1.8966 , 0.4566 ]
3 HORAS	[ -1.1766 , 1.1766 ]
6 HORAS	[ -1.1066 , 1.2466 ]
24 HORAS	[ -0.6666 , 1.6866 ]

Tabla No. 12. Intervalos de Confianza para Refrigeración.

Se observa que todos los IC incluyen el valor de 0, por ello se asume (al igual que en la estabilidad a temperatura ambiente) que la muestra analítica es estable en refrigeración hasta las 24 horas .

## **IX. DISCUSION DE RESULTADOS**

### **A. LINEALIDAD DEL SISTEMA**

De acuerdo al análisis estadístico se encontró que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida. Asimismo en la relación cantidad adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ ) y propiedad medida (absorbancia) no es necesario efectuar un ajuste estadístico para que la relación sea considerada lineal.

Consecuentemente la gráfica obtenida presenta un coeficiente de determinación con un valor que está dentro de los límites establecidos en los criterios de aceptación. Con base en esto se puede establecer que el sistema es lineal en el intervalo comprendido entre 6 y 12  $\mu\text{g/ml}$ .

### **B. PRECISION DEL SISTEMA**

El coeficiente de variación obtenido indica que el sistema es preciso cuando se maneja el nivel del 100%. Esto significa que a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  el sistema es repetible.

### C. ESPECIFICIDAD DEL METODO

Al observar la tabla de absorbancias obtenidas por las diferentes sustancias se observa que el placebo sólo da una respuesta de 0.35% es decir un porcentaje menor que el permitido. Este parámetro permitió asegurar que las absorbancias encontradas por los placebos añadidos, se debían únicamente al bezafibrato. Esto lo demuestra el espectro de absorción obtenido por el placebo y el placebo añadido; en el intervalo de 205 a 255 nm el placebo no representa respuesta y por ello el método se consideró específico para el principio activo en estudio.

### D. LINEALIDAD DEL METODO

Al igual que en la linealidad del sistema, el análisis estadístico demostró que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ ) y la cantidad recuperada ( $\mu\text{g/ml}$ ). También se observó que en la relación: cantidad adicionada y cantidad recuperada no es necesario efectuar un ajuste estadístico para que la relación sea considerada lineal.

La gráfica obtenida presenta una pendiente que se aproxima a 1.0 una ordenada al origen cercana a cero y un coeficiente de determinación mayor a 0.98. Con base en esto se considera que el método de valoración es lineal en el intervalo comprendido entre 8

y 12  $\mu\text{g/ml}$ ; esto indica que el método propuesto puede cuantificar desde 8  $\mu\text{g/ml}$  (nivel 80%) hasta 12  $\mu\text{g/ml}$  (nivel 120%) con la confiabilidad de que los porcentajes recuperados obtenidos serán reales.

#### **E. EXACTITUD Y REPETITIBILIDAD AL 100%**

El coeficiente de variación obtenido indica que el método es exacto y repetible cuando se maneja el nivel del 100%. Esto indica que a un concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  el método cuantifica exactamente 10  $\mu\text{g/ml}$  de bezafibrato.

#### **F. REPRODUCIBILIDAD**

EL análisis estadístico demuestra lo siguiente:

1. El método analítico es reproducible por 2 analistas.
2. el método analítico es reproducible en distintos días para un mismo analista.

Por otro lado, el coeficiente de variación total presenta un valor menor al máximo permitido.

Lo anterior se traduce en lo siguiente: el método de valoración puede ser efectuado por dos analistas diferentes en dos

días diferentes sin que haya una variación considerable en los porcentajes recuperados. De aquí que el método pueda ser realizado por dos analistas en distintos días con la plena confianza de que los resultados serán exactos y reproducibles.

#### **G. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.**

Los resultados demostraron que la muestra analítica es estable a temperatura ambiente y en refrigeración por un período de 24 horas. Esto significa que en valoraciones cotidianas las muestras analíticas pueden permanecer hasta 24 horas sin que se afecte su estabilidad al mantenerlas ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración.



## X. CONCLUSIONES.

En el presente estudio se efectuó la validación de un método espectrofotométrico en la región ultravioleta para la cuantificación de bezafibrato en tabletas. Una vez comprobado que el sistema era lineal y preciso, se encontró que el método de valoración era específico, lineal y exacto para el principio activo. Asimismo se encontró que el método es reproducible por dos analistas en días diferentes y que la muestra analítica presenta buena estabilidad tanto en refrigeración como a temperatura ambiente.

Retomando el objetivo inicial, éste se cumplió en su totalidad ya que se logró efectuar la validación del método de valoración. Con esto queda comprobado que el método puede ser usado con la plena confianza de que los resultados obtenidos serán exactos y precisos.

Con respecto a la hipótesis propuesta se encontró lo siguiente; el rango inicial propuesto para la linealidad del sistema era de 5 a 15  $\mu\text{g/ml}$  ; experimentalmente se encontró que en este rango el sistema no era lineal. Se cerró entonces el intervalo hasta obtener la linealidad deseada (se encontró que el sistema era lineal de 6 a 12  $\mu\text{g/ml}$ ). Consecuentemente el rango del método también se redujo para mantener los niveles dentro de los límites de la linealidad del sistema. De esta forma se encontró que el método es lineal entre 8 y 12  $\mu\text{g/ml}$ .

Con lo anterior queda comprobado que algunas sustancias a ciertas concentraciones no cumplen con la ley de Lambert y Beer. En este caso, el bezafibrato no presentó la linealidad esperada en el rango comprendido entre 5 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , pero al reducir el intervalo de concentración se obtuvo una linealidad esperada.

## **XI. ANEXOS**

## ANEXO A. FORMULARIO ESTADISTICO

### 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO.

Cálculo de la pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Cálculo de la ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Cálculo del coeficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{[n \sum xy - \sum x \sum y]^2}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}$$

Suma de cuadrados de la regresión:

$$SCr = (m \sum xy) + b \sum y - [(\sum y)^2 / n]$$

Suma de cuadrados del error de regresión:

$$SCer = \sum y^2 - m \sum xy - b \sum y$$

Suma de cuadrados del error puro:

$$SCep = \sum y^2 - [(\sum Y^2 i.) / r]$$

Suma de cuadrados de la falta de ajuste:

$$SCfa = SCer - SCep$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC(B) = b \pm t_{tab} (Sb)$$

$$\text{Donde } Sb = Sy/x \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{X^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}}$$

$$Sy/x = \sqrt{SCer/gler}$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(M) = m \pm t_{tab} (Sm)$$

$$\text{Donde } Sm = Sy/x \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}}$$

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
Regresión	1	SCr=	SCR=	Fr= SCr/MCcr=
Error de regresión	n-2=	SCer=	SCer/gler=	----
Falta de ajuste	(n-2) - t(r-1) =	SCfa=	SCfa/glfa=	Ffa= MCfa/MCep=
Error puro	t(r-1) =	SCep=	SCep/glep=	----

Donde: t = No. de niveles      r = replicaciones      n = rt

## 2. PRECISION DEL SISTEMA

Cálculo de la desviación estándar (DE):

$$DE = \sqrt{\frac{[n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}{n(n-1)}}$$

Cálculo del coeficiente de variación CV:

$$CV = (DE/Y)100$$

## 3. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Cálculo del porcentaje de respuesta:

$$\% \text{ Resp} = \frac{\text{Absorbancia promedio del placebo}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 100$$

## 4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO.

Cálculo del coeficiente de variación:

$$CV = (DE/Y)100$$

Cálculo del intervalo de confianza para el porcentaje de recobro IC(M):

$$IC(M) = Y \pm t(n-1, 0.975) (DE/\sqrt{n})$$

## 5. REPRODUCIBILIDAD.

Cálculo de la suma de cuadrados del analista:

$$SCa = \frac{\sum y^2_{i...}}{(dr)} - \frac{Y^2_{...}}{dra}$$

Donde: d= No. de días

r= No. de valoraciones

a= No. de analistas

i= analista j= día

Cálculo de la suma de cuadrados del día anidado en el analista

$$SCd = \frac{(\sum \sum Y_{ij}^2)}{r} - \frac{(\sum Y_{i..}^2)}{dr}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = (\sum \sum \sum Y_{ijk}^2) - \frac{(\sum \sum Y_{ij.}^2)}{r}$$

Cálculo del coeficiente de variación total:

$$CV = (DEtotal/Ytotal)100$$

TABLA DEL ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Fcrit
Analista	a-1=	SCa=	MCa= SCa/gla	Fa= MCa/MCd	Fgla, gld 0.05
Día	(d-1)a=	SCd=	MCd= SCd/gld	Fd= Mcd/MCe	Fgld, gle 0.05
Error	(r-1)ad=	SCe=	MCe= SCe/gle	----	----

## 6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Cálculo de la suma de cuadrados del error

$$SCe = \sum \sum Y_{ij}^2 - [\sum Y_i.^2/r]$$

$$Mce = SCe/gle$$

$$\text{donde } gle = (t+1)(r-1)$$

t = No. de tratamientos no incluyendo el inicial.

r = replicaciones por tratamiento.

Cálculo del intervalo de confianza para cada condición-tiempo:

$$IC = (Y_i - Y_c) \pm t_0 \sqrt{Mce (2/r)}$$

Y<sub>i</sub> = valoración promedio inicial

Y<sub>c</sub> = valoración promedio después del tratamiento

Determinación en la tabla de distribución "t" de Dunnet el valor crítico t<sub>0</sub> = t<sub>gle, t, 0.05</sub>



## **ANEXO B. CALIBRACION DE LA BALANZA ANALITICA.**

### **1. OBJETIVO**

Describir el procedimiento de calibración de la balanza analítica AND ER-180A.

### **2. DEFINICIONES**

**CALIBRACION.** Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes de una magnitud determinada.

**MOVILIDAD.** Es la cualidad que caracteriza la aptitud de un instrumento a reaccionar a pequeñas variaciones de carga.

**EXACTITUD.** Es la propiedad que caracteriza la aptitud de un instrumento de medición para dar indicaciones iguales al valor verdadero de la magnitud medida, no tomando en cuenta los errores de fidelidad.

**FIDELIDAD.** Es la aptitud que tiene un instrumento de proporcionar resultados idénticos para una misma carga depositada varias veces sobre el dispositivo receptor de

carga, en diferentes lugares.

**PATRON DE TRABAJO.** Patrón que habitualmente es comparado con un patrón de referencia, y es utilizado comunmente para contrastar o controlar aparatos de medición.

**AJUSTE DE LINEALIDAD.** Significa que cuando una balanza ha sido calibrada, un peso exacto de 50 gramos mostrará un display de 50.0000 gramos y un peso exacto de 150 gramos mostrará un display de 150.0000 gramos.

### **3. PROCEDIMIENTO.**

Para la calibración de la balanza se efectúan los siguientes pasos:

**a. Calibración interna.**

**b. Pruebas de calibración.**

Antes de iniciar, efectuar lo siguiente:

- \* Checar que la balanza y el platillo de pesadas estén limpios.
- \* Checar que la burbuja de alineación se encuentre dentro de su círculo correspondiente.
- \* Conectar el cable a la fuente de poder 30 minutos antes de iniciar.

#### a. Calibración interna.

Esta calibración se requiere cuando la balanza se instala inicialmente, cuando cambia de sitio y siempre que las condiciones del lugar se modifiquen.

- 1). Presionar la tecla ON/OFF y cuando el display muestre "0.0000" presione la tecla CAL. El display mostrará ahora "CAL IN" por aproximadamente un segundo.
  
- 2). El siguiente display será "CAL...", esperar. Ahora el display mostrará "CAL dn", que es el peso de calibración menor, en este momento bajar lentamente el peso interno por medio de la palanca pequeña localizada al lado derecho de la balanza.
  
- 3). El display mostrará "CAL...", esperar. Ahora el display mostrará "CAL up" que es el peso de calibración mayor, en este momento alzar lentamente el peso interno por medio de la misma palanca pequeña (es decir, regresarla a su lugar original).
  
- 4). Nuevamente el display mostrará "CAL...", esperar. Después de una pausa el display cambiará a "CAL END" indicando la terminación de la calibración.
  
- 5). El siguiente display será "0.0000" indicando que la balanza está lista para su uso. Una display "CAL NO", indica

que existe una falla en el procedimiento de calibración debido a algún factor externo. Si esto ocurre presiones la tecla ON/OFF para apagar, y vuelva a empezar otra vez.

**b. Pruebas de calibración.**

Disponer de un patrón de pesas certificado y con este efectuar las pruebas.

**1). Prueba de movilidad.**

Esta prueba consiste en determinar si la balanza es confiable en lecturas de la capacidad mínima. Para esto colocar en el platillo una masa igual a la división mínima. Esta carga se incrementará paulatinamente hasta que exista variación en el display. Anotar la masa que fué capaz de provocar variación.

**2). Prueba de linealidad o exactitud.**

Esta prueba permite conocer el funcionamiento del instrumento en todo su intervalo de medición.

\* Colocar en el platillo de carga la pesa patrón de menor masa: 0.0010 gramos. Esperar algunos segundos para que se estabilice la lectura y anotar el peso en el formato de calibración de la balanza analítica.

\* Retirar la pesa y una vez que el instrumento indique 0.0000 colocar la siguiente pesa: 0.0020 gramos, anotar la lectura y

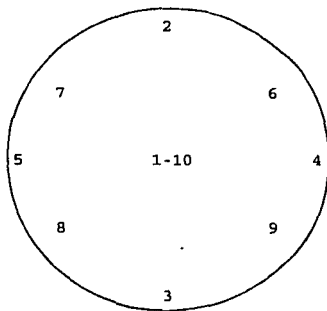
continuar sucesivamente hasta llegar a la pesa de 100 gramos.

\* La última pesada se hará con las pesas de 100 y 50 gramos juntas (150 gramos total). Iniciar nuevamente la prueba pero ahora en orden descendente (iniciando con el peso de 150 g. y terminando con la pesa de 0.0010 g.). Repetir ahora en forma ascendente.

\* Obtener para cada masa el promedio de las 3 lecturas, restando el error de los patrones.

**3). Prueba de fidelidad.**

Utilizar una pesa patrón de 50 g.. Esta se coloca en la posición y en el orden que se muestra en la siguiente figura:



#### **4. CRITERIOS DE ACEPTACION.**

**1). Prueba de movilidad.**

La máxima permitida es de una división mínima (0.0001 g.).

**2). Prueba de linealidad.**

El valor encontrado no debe exceder de  $\pm 0.1\%$  del peso empleado. Por ejemplo si la pesa tiene una masa de 50.0000 g. su límite de peso será:  $50.0000 \pm 0.0500$  g.. Para una pesa de 1.0000 g su límite de peso será de  $1.0000 \pm 0.0010$  g.

**3). Prueba de fidelidad.**

La desviación estándar de las 10 pesadas no debe ser mayor de 1 división mínima de la balanza.

#### **5. FRECUENCIA**

La calibración de la balanza analítica deberá realizarse cada mes.

#### **6. RESULTADOS**

**1). Prueba de movilidad.**

Esta prueba no se efectuó porque no se contaba con pesas menores de 0.1 mg.

**2). Prueba de linealidad.**

Ver resultados de calibración de balanza analítica (Pág. 72).

**3). Prueba de fidelidad.**

Ver resultados de calibración de balanza analítica (Pág. 73).

## RESULTADOS DE CALIBRACION DE BALANZA ANALITICA

### I. LINEALIDAD

MARCA: AND ER-180A  
 ALCANCE MAXIMO: 180.0 g.  
 ALCANCE MINIMO: 0.1 mg.

FECHA DE CALIBRACION: 28/enero/92  
 EFECTUADO POR: Miguel A. Luna O.  
 DEPARTAMENTO: Desarrollo

Peso Nominal (g)	Peso real (g)	L E C T U R A S				X	error
		Ascendente	Descendente	Ascendente			
0.001	0.0009	<u>0.0009</u>	<u>0.0009</u>	<u>0.0009</u>	<u>0.0009</u>	----	
0.002	0.0020	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	----	
0.002	0.0020	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	<u>0.0020</u>	----	
0.005	0.0048	<u>0.0048</u>	<u>0.0048</u>	<u>0.0048</u>	<u>0.0048</u>	----	
0.01	0.0102	<u>0.0102</u>	<u>0.0102</u>	<u>0.0102</u>	<u>0.0102</u>	----	
0.02	0.0200	<u>0.0200</u>	<u>0.0200</u>	<u>0.0200</u>	<u>0.0200</u>	----	
0.02	0.0199	<u>0.0199</u>	<u>0.0199</u>	<u>0.0199</u>	<u>0.0199</u>	----	
0.05	0.0499	<u>0.0499</u>	<u>0.0499</u>	<u>0.0499</u>	<u>0.0499</u>	----	
0.1	0.0998	<u>0.0998</u>	<u>0.0998</u>	<u>0.0998</u>	<u>0.0998</u>	----	
0.2	0.2000	<u>0.2000</u>	<u>0.2000</u>	<u>0.2000</u>	<u>0.2000</u>	----	
0.2	0.1996	<u>0.1996</u>	<u>0.1996</u>	<u>0.1996</u>	<u>0.1996</u>	----	
0.5	0.5013	<u>0.5013</u>	<u>0.5013</u>	<u>0.5013</u>	<u>0.5013</u>	----	
1	1.0028	<u>1.0028</u>	<u>1.0029</u>	<u>1.0029</u>	<u>1.0028</u>	----	
2	2.0042	<u>2.0041</u>	<u>2.0042</u>	<u>2.0041</u>	<u>2.0041</u>	0.0049	
2	2.0020	<u>2.0021</u>	<u>2.0020</u>	<u>2.0020</u>	<u>2.0020</u>	----	
5	5.0020	<u>5.0020</u>	<u>5.0020</u>	<u>5.0020</u>	<u>5.0020</u>	----	
10	10.0107	<u>10.0108</u>	<u>10.0107</u>	<u>10.0107</u>	<u>10.0107</u>	----	
20	20.0126	<u>20.0124</u>	<u>20.0123</u>	<u>20.0125</u>	<u>20.0124</u>	0.0009	
20	20.0105	<u>20.0103</u>	<u>20.0102</u>	<u>20.0102</u>	<u>20.0102</u>	0.0019	
50	50.0075	<u>50.0073</u>	<u>50.0073</u>	<u>50.0076</u>	<u>50.0074</u>	0.0002	
100	100.0134	<u>100.0144</u>	<u>100.0148</u>	<u>100.0147</u>	<u>100.0146</u>	0.0011	
150	150.0209	<u>150.0227</u>	<u>150.0222</u>	<u>150.0223</u>	<u>150.0224</u>	0.0009	

RESULTADO: APROBADO



## RESULTADOS DE CALIBRACION DE BALANZA ANALITICA

### II. FIDELIDAD

MARCA: AND ER-160A  
ALCANCE MAXIMO: 180.0 g.  
ALCANCE MINIMO: 0.1 mg.

FECHA DE CALIBRACION: 28/enero/92  
EFECTUADO POR: Miguel A. Luna O.  
DEPARTAMENTO: Desarrollo

POSICION	LECTURA (g)
1	<u>50.0071</u>
2	<u>50.0068</u>
3	<u>50.0077</u>
4	<u>50.0068</u>
5	<u>50.0068</u>
6	<u>50.0075</u>
7	<u>50.0067</u>
8	<u>50.0068</u>
9	<u>50.0073</u>
10	<u>50.0075</u>

---

X = 50.0071  
DE = 0.0000  
tCV = 0.00

RESULTADO: APROBADO

## ANEXO C. CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO.

### 1. OBJETIVO.

Describir el procedimiento de calibración del espectrofotómetro UV/VIS LAMBDA 2.

### 2. PROCEDIMIENTO.

La calibración del espectrofotómetro comprende dos determinaciones:

a. Verificación de la escala de la longitud de onda.

b. Verificación de la linealidad fotométrica.

a. Verificación de la escala de la longitud de onda.

Por medio de un barrido a un filtro de óxido de holmio se comprueba la posición de sus picos característicos reportados en la literatura.

- 1). Encender el espectrofotómetro y solicitar el método 2. Seleccionar los siguientes parámetros:

MOD0	ABS	GRAFICAR	SI
LONG. DE ONDA MAX.	350.0 NM	ORD. MAX	3.00 ABS
LONG. DE ONDA MIN.	200.0 NM	ORD. MIN	0.00 ABS
VELOCIDAD	120.0 NM/MIN	ESCALA	10.0 NM/CM
APLANAMIENTO	2 NM	REJILLAS	SI
LAMPARA	UV+VIS	ENCIMAR	NO
CORRECCION DE FONDO	NO	IMPRIMIR	SI
ACCESORIOS	MANUAL	UMBRAL	0.1 ABS
MUESTRAS/LOTE	1	METODO AUTO	YES
MUESTRA INICIAL	1	OPERADOR	0
CICLOS	1	MUESTRA	1
TIEMPO/CICLO	1.5 MIN		

2). Una vez que todos los parámetros han sido seleccionados, presione STOP. Sin colocar ninguna celda en los contenedores presione START 2 veces.

3). Los parámetros serán registrados en la impresora.

4) El display pedirá la 1a. muestra, colocar el filtro de holmio en el contenedor de la muestra.

5). Presionar START. El análisis empezará y el barrido será registrado. Al término del barrido presione STOP.

#### b. Verificación de la linealidad fotométrica.

Se emplea una solución patrón de absorbancia conocida: dicromato de potasio  $K_2Cr_2O_7$ , con la cual se obtiene una curva de calibración de absorbancia contra concentración que cumple con la ley de Beer.

1). Preparar 1 litro de solución 0.01N de ácido sulfúrico (0.3 ml de  $H_2SO_4$  concentrado en un litro de agua).

2). Pesar exactamente 0.1000 g. de  $K_2Cr_2O_7$ , y transferir a un matraz volumétrico de 500 ml, disolver y aforar con solución 0.01N de  $H_2SO_4$ . Se obtiene así la solución 1.

3) De esta solución tomar las siguientes alícuotas y llevar a matraces de 50 ml, aforar con solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 N. Se obtienen así las siguientes concentraciones:

<u>Alícuota (ml)</u>	<u>Conc. mg/litro</u>
5	20
10	40
15	60
20	80
25	100
30	120
35	140
40	160
45	180
50	200

4). Encender el espectrofotómetro y solicitar el método 4.

Seleccionar los siguientes parámetros:

MODO	ABS	ESTANDARES	SI
LONG. DE ONDA	257 NM	VALOR 1	0.289
# DE ESTANDARES	10	VALOR 2	0.582
UNIDADES CONC.	G/L	VALOR 3	0.875
STD 1	0.02 G/L	VALOR 4	1.176
STD 2	0.04 G/L	VALOR 5	1.475
STD 3	0.06 G/L	VALOR 6	1.775
STD 4	0.08 G/L	VALOR 7	2.076
STD 5	0.10 G/L	VALOR 8	2.385
STD 6	0.12 G/L	VALOR 9	2.721
STD 7	0.14 G/L	VALOR 10	2.973
STD 8	0.16 G/L	CURVA/TIPO	LINEAL
STD 9	0.18 G/L	FACTOR	1
STD 10	0.20 G/L	DIVISOR	1
RESPUESTA	0.5 SEG	IMPRIMIR DATOS	SI
LAMPARA	UV	GRAFICAR ESTANDARES	SI
CORRECCION DE FONDO	SI	IMPRIMIR ESTANDARES	SI
ACCESORIOS	MANUAL	METODO AUTO	SI
MUESTRAS/LOTE	10	OPERADOR	O
MUESTRA INICIAL	1	MUESTRA	1
CICLOS	1	TIEMPO/CICLO	0.01MIN

- 5). Una vez que todos los parámetros han sido seleccionados, presionar STOP. Colocar un blanco (solución 0.01N de  $H_2SO_4$ ) en una celda y colocarla en el contenedor de la celda de referencia. Presionar START.
  
- 6). El display pedirá un blanco; colocar un blanco (solución 0.01N de  $H_2SO_4$ ) en otra celda y transferirla al contenedor de la celda de la muestra. Presionar START y esperar a que se efectúe la corrección con el blanco.
  
- 7). El display pedirá el primer estándar. Retirar la segunda celda, vaciar su contenido y enjuagar con el primer estándar. Llenar la celda con este primer estándar y colocarla en su contenedor. Presionar START dos veces.
  
- 8). El estándar será leído y enseguida el display pedirá el segundo estándar. Enjuagar la celda con el 2o. estándar, leer.
  
- 9). Leer consecutivamente cada uno de los estándares, enjuagando perfectamente la celda después de cada lectura.
  
- 10). Después de la última lectura, los datos y la curva de calibración serán impresos.
  
- 11). Al terminar el análisis presionar STOP.

### 3. CRITERIOS DE ACEPTACION.

#### a. Verificación de la escala de la longitud de onda.

Los valores exactos para la posición de los máximos característicos son:

241.5 ± 1 nm

287.5 ± 1 nm

360.9 ± 1 nm

536.2 ± 3 nm

#### b. Verificación de la linealidad fotométrica.

En la gráfica de absorbancia contra concentración deberán obtenerse los siguientes parámetros:

$$b = 0, \quad m = 1, \quad r^2 \geq 0.98$$

### 4. FRECUENCIA

La calibración del espectrofotómetro deberá realizarse cada mes.

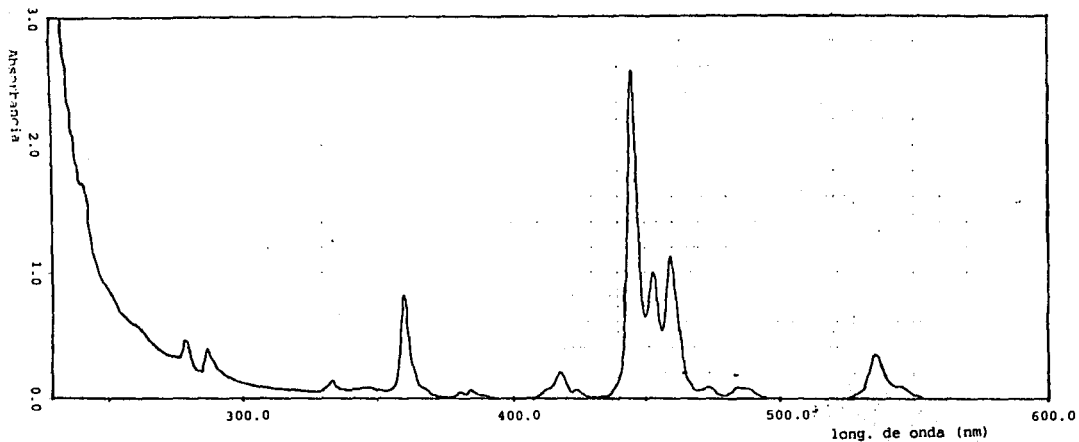
### 5. RESULTADOS.

#### a. Verificación de la escala de la longitud de onda.

De acuerdo al barrido del filtro de óxido de holmio los máximos característicos caen dentro de los límites establecidos (p.79).

Gráfica No. 3. Barrido del filtro de óxido de holmio.

<u>longitud de onda (nm)</u>	<u>Absorbancia</u>
240.3	1.650
278.7	0.468
287.3	0.386
360.5	0.818
418.2	0.203
445.3	2.579
453.0	0.995
459.5	1.123
536.1	0.349



b. Verificación de la linealidad fotométrica.

De acuerdo a la curva de calibración obtenida (p.81), se observa que cumple los parámetros establecidos

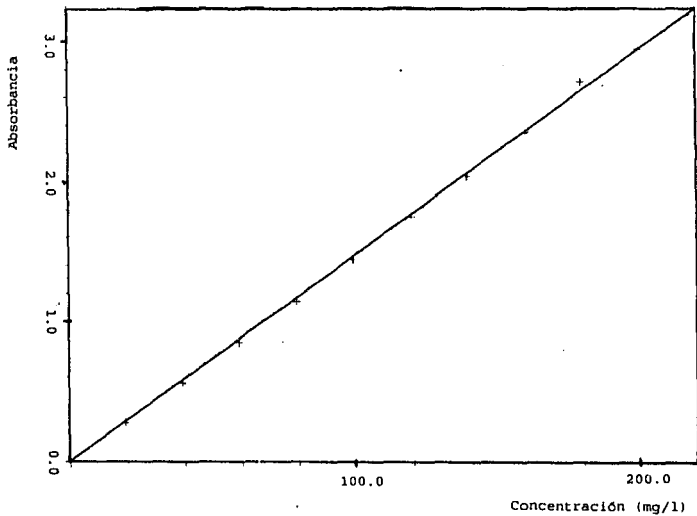
Con ambos resultados se concluye que el aparato está calibrado.



Gráfica No. 4. Curva de calibración para el  $K_2Cr_2O_7$ .

Estandar	Concentración (mg/l)	Absorbancia
01	20.0	0.28410
02	40.0	0.56562
03	60.0	0.85716
04	80.0	1.14806
05	100.0	1.45216
06	120.0	1.75268
07	140.0	2.04919
08	160.0	2.35364
09	180.0	2.71696
10	200.0	2.94988

$m = 1.0237$   
 $b = -0.0237$   
 $r^2 = 0.9997$



## XII. BIBLIOGRAFIA

1. Couriel Benito. Validación de procesos farmacéuticos, Editado por la Asociación Farmacéutica Mexicana S.A.; Méx. 1982.
2. Chemo Ibérica S. A. Editado por la Dirección de Sanidad. España:
  - a. Memoria farmacológica, terapéutica y clínica de la especialidad para el bezafibrato. Hoja 1-4.
  - b. Memoria analítica de la especialidad para el bezafibrato. Hoja 1-8.
  - c. Memoria Analítica de la especialidad para el bezafibrato. Hoja 1-7.
3. The Merck Index, An encyclopedy of chemicals, drugs, and biologicals. 10a. edición. Merck and Co. Inc., U.S.A. 1988.
4. Diccionario de especialidades farmacéuticas, Ediciones P.L.M. S.A. de C.V.; 38a. ed. Méx. 1992.
5. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, Editado por la S.S.A. 5a. ed. Méx. 1988,
6. Connors, K., Curso de análisis farmacéutico, Edit. Reverté, España. 1981.

7. Larry, P., "USP Perspectives on Analytical Methods Validation", Pharm. Tech. 15(3), 130-141 (1991).
8. Jimenez, V.E., "Un acercamiento a la validación de Métodos Analíticos", 1a. parte. Pharma News 2(6), 16-17 (1990).
9. Jimenez, V.E., "Un acercamiento a la validación de Métodos Analíticos", 2a. parte. Pharma News 3(6), 15-20 (1990).
10. The United States Pharmacopeia. XXII Ed., The National Formulary. U.S.P. Convention, Inc. Washington. U.S.A. 1990.
11. Validación de Métodos Analíticos. Editado por el Comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, S.S.A. México.
12. Martindale, The Extra Pharmacopoeia. 30a. edición. The Pharmaceutical Press. Inglaterra, 1993.
13. Endeke, R. "A gas chromatographic method for the determination of Bezafibrate in serum and urine". J. Chromatogr. 154 (1978). 261-263.
14. Castoldi, D. et. al." Determination of Bezafibrate in human Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography". J. Chromatogr. 344 (1985), 259-265.

15. Garrido, V. F. y Juarez, A. J. "Parámetros estadísticos y procedimientos de validación, criterios de aceptación". Pharma News, 1 (6) 1990. 15-20.
16. Velazquez, P.P. et al. "Desarrollo y Validación de un método analítico por espectrofluometría para el control de calidad y estabilidad en tabletas que contienen ácido acetilsalicílico". Rev. Mex. de Ciencias Farmacéuticas, 12 (20) 1988. 19-22.
17. Guerra, V. F. y Juarez, A. J. "Un acercamiento a la Validación de Métodos analíticos". Pharma News, 1 (5) 1990. 12-16.
18. Cavenaghi, L. et al., "Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of the medicines". Drug Development & Industrial Pharmacy, 13 (14), 2571-2615 (1987).
19. Alcántara A. P. Validación de Métodos Analíticos, Curso. México, marzo de 1993.
20. Rampazzo, P., "Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry". IL Farmaco, 6 (45), 807-815 1990.
21. Pharmaceutical Process Validation, Editado por James Swarbrick y Robert A. Nash, U.S.A. 1984.

22. Inman, E.L. et al., "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples", J. Pharm. Chrom. (25), 242-256 (1987).
23. Electronic analytical balances ER Series, Manual de instrucciones. Editado por A&D Company. U.S.A.
24. Lambda 2 UV/VIS Spectrometer, Manual del operador. Editado por Perkin Elmer. R.F.A. 1988.
25. Norma NOM-CH-35-1982. Instrumentos de medición, aparatos para pesar. Clasificación y sus definiciones.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-Z-55-1986. Metrología, vocabulario de términos fundamentales y generales.