

43
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV EN
MEDIO ALCOHOLICO ACIDO PARA LA
CUANTIFICACION DE DIYODOHIDROXIQUINOLEINA
EN TABLETAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A ;

ESTEBAN SANTAMARIA SANJUAN

ASESOR: QFB. JUAN CHAVARIN GONZALEZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



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.

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
1. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
1.1. GENERALIDADES	5
1.1.1. DEFINICION DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION	5
1.1.2. IMPORTANCIA DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ULTRAVIOLETA Y VISIBLE	5
1.1.3. FUNDAMENTACION DE LA ESPECTROFOTO- METRIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE	6
1.1.4. APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOME- TRIA ULTRAVIOLETA - VISIBLE	8
1.1.5. APARATOS DE MEDICION DE LOS ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA - VISIBLE	11
2. EL GRUPO 8 - HIDROXIQUINOLEINAS HALOGENADAS	15
2.1. MONOGRAFIA DE LA DIYODOHIDROXI- QUINOLEINA	16
2.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS	16
3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	18
3.1. DEFINICION	18
3.2. CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22

	PAG.
5. OBJETIVOS	24
6. HIPOTESIS DE TRABAJO	25
7. MATERIALES	26
7.1. REACTIVOS	26
7.2. MATERIAL	26
7.3. EQUIPO	27
8. PARTE EXPERIMENTAL	28
8.1. IMPLEMENTACION DEL METODO ANALITICO	29
8.2. EVALUACION DEL SISTEMA	29
8.3. EVALUACION DEL METODO	31
9. RESULTADOS	36
9.1. ESPECIFICIDAD	36
9.2. PRECISION DEL SISTEMA	37
9.3. LINEALIDAD DEL SISTEMA	38
9.4. EXACTITUD DEL METODO	42
9.5. LINEALIDAD DEL METODO	43
9.6. REPRODUCIBILIDAD	47
9.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	49
10. ANALISIS DE RESULTADOS	50
11. CONCLUSIONES	54
APENDICE I	55
APENDICE II	56
BIBLIOGRAFIA	62

INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

	PAG.
ESPECTRO DE ABSORCION DE DIYODOHIDROXI QUINOLEINA	36
PRECISION DEL SISTEMA	37
LINEALIDAD DEL SISTEMA	39
ANADEVA LINEALIDAD DEL SISTEMA	40
GRAFICA LINEALIDAD DEL SISTEMA	41
EXACTITUD DEL METODO	42
LINEALIDAD DEL METODO	44
ANADEVA LINEALIDAD DEL METODO	45
GRAFICA LINEALIDAD DEL METODO	46
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO	47
ANADEVA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO	48
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	49

INTRODUCCION

El Control Analítico es un aspecto fundamental dentro de los elementos que integran la fabricación de un medicamento, nos permite determinar en un momento dado, si el producto fabricado está en condiciones de salir al mercado.

La Diyodohidroxiquinolona así como cualquier medicamento debe ser administrado bajo una prescripción cautelosa y responsable, por lo que es necesario contar con métodos de análisis confiables, ya que es de vital importancia medir la cantidad del principio activo durante el proceso de elaboración de la forma farmacéutica, para mantener la cantidad autorizada por la Secretaría de Salud, así como las especificaciones del laboratorio. (14, 18)

Cualquier laboratorio que se aprecie de contar con un control de calidad en sus productos, debe tener técnicas analíticas apropiadas y validadas, para así mantener una garantía en la calidad del producto. (19)

Al implementar un método analítico es necesario validarlo, un método validado y aceptado proporciona datos repetitivos, en condiciones similares ya que ha sido sometido a pruebas de desafío, en las cuales su comportamiento es sumamente parecido al obtenido en condiciones normales. Su linealidad no debe estar fuera de lo especificado y es la que nos permite en un momento dado establecer su efectividad. (19, 20)

La aplicación de la espectrofotometría UV proporciona herramientas valiosas en la implementación del método analítico, nos permite contar con alternativas para la

determinación de un compuesto específico, en identificación y cuantitividad, con reproducibilidad y exactitud. (4, 19, 20)

En México las enfermedades provocadas por parásitos representan un problema de salud pública, es necesario contar con medicamentos apropiados para su tratamiento. La Diyodohidroxiquinoleína es eficaz para tratar la amibiasis intestinal, por lo que es de gran importancia contar con métodos de análisis confiables que garanticen la cantidad especificada de principio activo. (1, 9, 19)

El presente trabajo tiene la finalidad de implementar y validar el método analítico para cuantificar la Diyodohidroxiquinoleína en tabletas.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de la Diyodohidroxiquinoleína, fue posible analizarla por espectrofotometría UV, demostrándose que el método de análisis implementado, es lineal, preciso, exacto, reproducible, específico, rápido y económico, por lo que puede ser empleado como un método de análisis de control de calidad.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La metodología analítica reportada para el análisis cuantitativo de la Diyodohidroxiquinolína tanto para materia prima como para producto terminado (tabletas de 650 mg), indican que este principio activo se cuantifica por el método de combustión, el cual libera al Iodo que después es determinado por titulación con Tiosulfato de sodio 0.02 N. Este método analítico cumple los requisitos de validación. (18)

El método analítico que se implementará en este proyecto es una técnica analítica alternativa en la cuantificación de la Diyodohidroxiquinolína, para mejorar las condiciones del análisis como son: reducir tiempo de análisis, mejorar la confiabilidad en la cuantificación del activo, disminuir cantidad de reactivos y costo de análisis.

En la Tabla No. 1 se presentan las ventajas y desventajas de los métodos analíticos para Diyodohidroxiquinolína.

MÉTODO ANALÍTICO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>POR COMBUSTION</p>	<p>Preciso, Tiempo de análisis 1 hora 30 minutos</p>	<p>Mayor cantidad de reactivos: bisulfito de sodio, hidróxido de sodio, bromo, yoduro de potasio, ácido sulfúrico, tiosulfato de sodio, almidón. Mayor manipulación de la muestra. Peligroso Costo de análisis elevado</p>
<p>Por espectrofotometría ultravioleta</p>	<p>Mayor precisión. Tiempo de análisis 1 hora. Costo de análisis bajo. Menos reactivos.</p>	<p>Costo de reactivos</p>

TABLA N.º 1. Comparación de Métodos Analíticos para Dihidroxiquinolona.

1) GENERALIDADES

1.1.1. DEFINICION DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION

Cualquier átomo o molécula es capaz de absorber energía, dependiendo de la estructura de la sustancia. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética. El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la misma : la cantidad de radiación absorbida está sujeta al número de moléculas que interaccionan con la radiación, a esto se le conoce como espectroscopía de absorción. (4)

1.1.2. IMPORTANCIA DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La espectroscopía de absorción es indudablemente, una de las técnicas analíticas 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. (4)

1.1.3. FUNDAMENTACION DE LA ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La luz ultravioleta y visible proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas. Los espectros visible y ultravioleta se conocen como espectros electrónicos. El más bajo estado de energía de una molécula es el estado fundamental . Las transiciones electrónicas elevan la energía molecular desde el correspondiente estado fundamental hasta uno de los varios estados electrónicos << excitados >>. Cada transición electrónica va asociada con muchas transiciones de vibración, por lo que el espectro electrónico esta formado por bandas de absorción relativamente anchas, o envolturas , que enmascaran la fina estructura de las transiciones individuales.
(4)

Una molécula que ha alcanzado un nivel de energía superior por haber absorbido radiación vuelve rápidamente al estado fundamental, en este proceso se ha de perder energía. La ruta usual es mediante colisiones que transforman la energía interna en energía térmica, la cual se disipa. La molécula excitada puede experimentar fragmentación (disociación en radicales no cargados o ionización), o participar en una reacción química (reacción fotoquímica). Las moléculas en las que se impide el retorno del estado excitado al fundamental por el habitual mecanismo de disipación térmica, pueden perder energía, la cual emiten como radiación. (4)

El análisis espectroscópico cuantitativo se basa en la relación entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente, esta relación es la Ley de Beer, la cual la podemos representar por 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 pasar a través del espesor b de solución, a es la absorptividad y c la concentración del soluto absorbente.

Las cantidades espectroscópicas que se miden son la Transmittancia (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 Bouguer 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 la ecuación de Beer - Lambert) (4, 10)

La absorptividad a es una constante de proporcionalidad que es independiente de la concentración, paso de la luz e intensidad de la radiación incidente. La absorptividad 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 la absorptividad se expresa en litros por gramo-centímetro. Si c es una concentración molar la absorptividad recibe el nombre de absorptividad molar, se representa por ϵ , y sus unidades son litros por mol-centímetro. Cuando se expresa en porcentaje peso/volumen ($g / 100 \text{ ml}$), la absorptividad se escribe $A'_{1\%}$.

Los intervalos de longitud de onda que tienen interés en espectroscopia 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	0,75 - 4 μ m
Infrarrojo	4 - 25 μ m

TABLA No. 2. Regiones de la Espectroscopia (6)

1.1.4. APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA - VISIBLE

- a. Espectros de Absorción
- b. Análisis de un Único Componente
- c. Determinación de Constantes de Equilibrio
- d. Determinaciones de las Constantes de Velocidad

a. Espectros de Absorción

Se determina un espectro de absorción midiendo la absorbancia o transmitancia de una solución como función de la longitud de onda o frecuencia de la luz. Los espectros visible y ultravioleta se presentan trazando la absorbancia en el eje de las ordenadas, con respecto a la longitud de onda (eje de las abscisas). Las longitudes de onda que corresponden al máximo y al mínimo en la gráfica absorbancia - longitud de onda

se simbolizan por $\lambda_{\text{máx}}$ y $\lambda_{\text{mín}}$. (6, 10)

b. Análisis de un Único Componente

Si de una serie de soluciones de la misma sustancia se mide la absorbancia de cada una de ellas a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución, y se representa la absorbancia de cada solución en función de su concentración, obtendremos por lo general una línea recta que pasa por el origen de acuerdo con 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);

Determinada ya la absorptividad de la sustancia (a una longitud de onda fija) se procede fácilmente el 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 desconocida a la longitud de onda analítica, luego se calcula la concentración desconocida a partir de la gráfica de la Ley de Beer, o también, se lee directamente la concentración desconocida a partir de la gráfica de la Ley de Beer. Otro método es medir concomitantemente la solución de la muestra y una solución preparada con un patrón de referencia. El patrón es el mismo compuesto que la muestra, pero cuya pureza se conoce. Por lo tanto la concentración de la muestra problema la

podemos determinar con la siguiente ecuación:

$$C_m = C \frac{A_m}{A}$$

donde C_m es la concentración de la muestra problema, C , la concentración del patrón de referencia y A_m , A , las absorbancias de la muestra y del patrón respectivamente. (4, 18)

c. Análisis de Multicomponentes

Si se tiene una mezcla de dos sustancias, primero se determinan 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 procediendo a superponer los espectros. 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.

La próxima etapa en el análisis consiste en trazar las representaciones de la Ley de Beer, utilizando soluciones de las sustancias puras para cada compuesto a cada longitud de onda. Así se obtienen cuatro gráficas de la Ley de Beer, a partir de las cuales se calculan cuatro absorptividades. Ahora se puede analizar cualquier solución que contenga los compuestos A y B. (4, 18)

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. Como en todos los métodos de análisis espectrofotométrico cuantitativo, esta técnica es una aplicación de la Ley de Beer. (4, 10)

e. Determinación de las Constantes de Velocidad

Generalmente 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 del de su producto, entonces ocurrirá un cambio espectral cuando se produzca la reacción, y la espectrofotometría es un método de análisis apropiado para el estudio de la velocidad de tal reacción. (4,

10)

1.1.5. APARATOS DE MEDICION DE LOS ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA - VISIBLE

Los espectrofotómetros son los instrumentos utilizados en la medida de un espectro. Si la intensidad de luz se mide con una celda fotoeléctrica el instrumento es un

espectrofotómetro. (4)

Todos los espectrofotómetros se componen de los elementos representados en la siguiente figura:

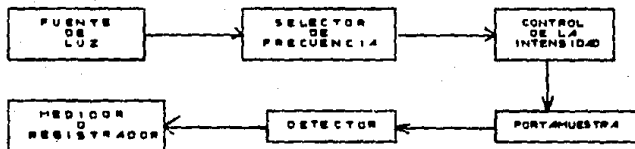


FIGURA No. 1. Representación esquemática de un espectrofotómetro.

A) FUENTE DE LUZ. Una lámpara de tungsteno corriente es una buena fuente de radiación para la región visible. En la región UV 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.

B) SELECTOR DE FRECUENCIAS. 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 escoger a voluntad 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

silice.

La rejilla descompone la luz en sus longitudes de onda componentes, o mejor, en bandas estrechas que contienen muy pocas longitudes de onda. Haciendo girar la rejilla se enfocan diferentes bandas sobre una rendija que admite la luz hasta la próxima etapa del instrumento. Obviamente, la luz no es monocromática (de una sola longitud de onda) pero un buen espectrofotómetro admite muy poca radiación, distinta de la longitud de onda que se desea. La rejilla, con los elementos ópticos asociados, se le conoce como monocrómador.

C. CONTROL DE LA INTENSIDAD. No basta sólo hacer pasar la luz de longitud de onda seleccionada a través de la muestra de la cual debe pasar la suficiente luz para obtener una respuesta medible del detector. La cantidad de luz requerida 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. Debido a que estas son variables en la mayoría de los espectrofotómetros hay uno o más mecanismos de rendijas, accionadas manual o automáticamente, cuya anchura se varía, controlando así la intensidad de luz que alcanza la muestra.

D. PORTAMUESTRA. Todos los estudios espectrales en las regiones UV y Visible se efectúan en soluciones diluidas. Las celdas que contienen la muestra son 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 medidas por encima de los 325 nm, aproximadamente; por debajo de esta longitud de onda el vidrio tiene demasiada absorción.

E. DETECTOR. El ojo humano es un detector muy sensible, pero no adecuado para medidas cuantitativas. En los espectrofotómetros de visible y ultravioleta se emplean dispositivos electrónicos sensibilizadores, que se conocen como

fatotubos y tubos fotomultiplicadores, para detectar la intensidad de luz transmitida por la muestra. Los fatotubos contienen una superficie tratada que emite electrones al chocar contra ella (fotones). Estos electrones se recogen sobre una placa positiva y producen una corriente de placa que es proporcional a la intensidad de la radiación incidente. Si en vez de concentrar los electrones se les acelera por medio de elevado potencial eléctrico y se hacen incidir sobre una segunda superficie fotoactiva, se producirá una emisión múltiple de electrones.

F. MEDIDOR O REGISTRADOR. La señal del detector se alimenta con un circuito potenciométrico, que se gradúa para obtener un dato o lectura de transmitancia o absorbancia, por lo que se calibra adecuadamente el instrumento en estas unidades en lugar de la señal eléctrica primaria. Algunos instrumentos están provistos de un disco indicador directo de absorbancia. Los espectrofotómetros registradores traen un registro de la absorbancia o la transmitancia sobre papel cuadrículado; en estos instrumentos se registra automáticamente el espectro de absorción completa, y el propio instrumento << explora >> el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva absorbancia - longitud de onda. (4)

2. EL GRUPO 8 - HIDROXIQUINOLEINAS HALOGENADAS

Diversas 8- hidroxiquinoleinas halogenadas son eficaces para tratar la amibiasis intestinal.

Solo actuan sobre amibas que se encuentran en el tubo gastrointestinal, y se utilizan en el tratamiento de infecciones leves o asintomáticas. No se conoce su mecanismo de acción.

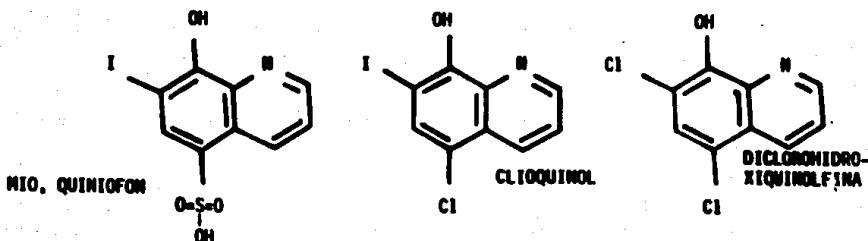


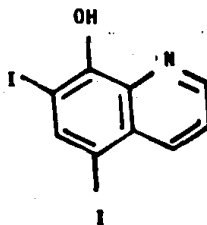
FIGURA No. 2. Estructuras químicas de las 8- hidroxiquinoleinas halogenadas, utilizadas en el tratamiento de amibiasis intestinal. (1, 2, 3)

2.1. MONOGRAFIA DE LA DIYODOHIDROXIQUINOLEINA

NOMBRE QUIMICO: 5, 7- Diiodo- 8- hidroxiquinoleína

FORMULA CONDENSADA: $C_9H_6I_2NO$

FORMULA DESARROLLADA:



MASA MOLECULAR: 396.95

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS: Sustancia sintética derivada de la quinoleína. se presenta como polvo amarillento insoluble en agua y poco soluble en alcohol, éter y acetona. Soluble en piridina caliente y en dioxano caliente.

PUNTO DE FUSION: 200 °C a 215 °C (con descomposición)

2.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

La Diyodohidroxiquinoleína es efectiva en la amibiasis intestinal y especialmente útil en el tratamiento de portadores asintomáticos de quistes. Se ha reportado que tiene algún valor terapéutico en infecciones intestinales debidas a *Diantamoeba fragilis*¹, en casos de lambliasis resistente a la quinacrina y on disenteria balantidiana. También es útil en el tratamiento de diversos desordenes dermatológicos, como la dermatitis seborréica y micosis. (1, 2, 3)

Esta contraindicada en pacientes con daño hepático, en presencia de neuropatía óptica y en casos de intolerancia al yodo. El uso de la Diyodohidroxiquinoleína contra la diarrea crónica en niños ha producido atrofia óptica y pérdida total de la vista. (1, 5)

Reacciones Adversas: Escalofrío, fiebre, dermatitis leve o severa, irritación y prurito anal, malestar abdominal transitorio, diarrea y cefalea. (5)

Dosis: Adultos 650 mg tres veces al día durante 20 días, niños 30 a 40 mg/kg diarios divididos en tres tomas durante 20 días, la dosis máxima por día es de 2000 mg. (5)

El tratamiento inicial no debe repetirse antes de un periodo de reposo de 2 a 3 semanas.

Vía de Administración: Oral. (5)

¹ Amiba binucleada que mide 7-12 μ m de diámetro

3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

3.1. DEFINICION

La validación de un método analítico es el procedimiento mediante el cual se documentan pruebas de un método analítico con los parámetros que se le exigieron, es decir, determinar la confiabilidad del método mediante una metodología de datos analíticos útiles. (10, 14, 15)

Una variedad de procedimientos han sido empleados para validar un método, esto ocasiona una confusión e información heterogénea en los métodos de validación, debido a esta situación se hace necesario establecer dos parámetros principalmente; primero establecer el mínimo de repeticiones, con las cuales sea suficiente para la validación del método; segundo, establecer los criterios o guías a usarse para la validación del método analítico. (15)

3.2. CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Cuando se implementan o desarrollan nuevos métodos analíticos, es necesario el conocimiento de la confiabilidad de los resultados obtenidos, esto nos lleva a la validación estadística de los siguientes criterios o parámetros de validación:

- Especificidad
- Linealidad y Precisión del sistema
- Precisión y Exáctitud del método
- Linealidad del método
- Estabilidad de la muestra
- Sensibilidad

ESPECIFICIDAD

Este parámetro nos reporta el grado en que los resultados obtenidos por el método, están en función solo por la sustancia que se está determinando y no a otras sustancia que pudieran estar presentes en la forma farmacéutica analizada, como son los excipientes o productos de degradación del principio activo. (7, 10, 14)

EXACTITUD

Se entiende por exáctitud a la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia aceptado.

Para la determinación de este parámetro se realiza un análisis de porcentaje de recobro de formulaciones con placebos cargados al 100 % de la cantidad que se estipula en el marbete, el criterio que se utiliza es el estadígrafo de contraste t-student para la comparación de medias. (10, 14, 15)

LINEALIDAD

Este parámetro expresa el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = a + mx$.

donde $a = 0$ y $m = 1$, cuando se trabaja con diferentes concentraciones. Esto significa que se obtiene una línea alrededor de la cual se agrupan los puntos del diagrama de dispersión de las variables sometidas a estudio, se grafican las cantidades adicionadas contra las cantidades recuperadas, y se realiza una prueba de *t-student*, tanto para el intercepto como para la pendiente, obteniéndose también el grado de asociación entre las dos variables (coeficiente de correlación lineal " R "), por otro lado se realiza el análisis de varianza para la falta de ajuste, para determinar si el modelo de regresión lineal es el adecuado para el tratamiento de los datos. (10, 14, 15)

PRECISION

Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales con respecto a un valor central, expresado en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

a) Repetibilidad: Para éste caso se realiza la estimación de la desviación estándar de los datos experimentales, mediante la prueba de Ji- cuadrada (χ^2) y se evalúa la significancia de la variabilidad.

b) Reproducibilidad: En éste diseño se contemplan diferentes analistas así como diferentes días, y para conocer su variabilidad se utiliza el análisis de varianza para dos factores aleatorios, el diseño consiste en desglozar las diferentes fuentes que contribuyen a la variabilidad del fenómeno probando la significación de cada fuente contra el error experimental, cuyo criterio de prueba es el cociente de estadígrafo F de dos varianzas. (10, 14, 15)

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método analítico la definimos como la capacidad que tiene el método para cuantificar la sustancia que se desea analizar (ej: miligramos, microgramos, etc) .
(10, 14, 15)

EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso de tiempo. (11)

Consiste en :

- Almacenar las muestras analizadas a temperatura ambiente o en condiciones normales de trabajo, por el tiempo acostumbrado o por algunas horas.
- Después de transcurrido este tiempo reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la Industria Farmacéutica existe gran interés en desarrollar e implementar nuevos métodos analíticos debido al incremento de nuevos productos y validar los métodos existentes, ya que los medicamentos requieren de métodos de análisis apropiados. (14, 15, 20)

Debido a que solo contamos con el método por combustión para cuantificar la Diyodohidroxiquinoleína es necesario contar con un método alternante que nos ayude a analizar tanto como producto intermedio (granulado) y producto terminado (tabletas) a este principio activo, además de tratar de mejorar las condiciones del análisis como son : reducir cantidad de reactivos, tiempo y costo de análisis.

La Diyodohidroxiquinoleína tiene baja solubilidad en los solventes comunes por lo que es necesario encontrar aquellos que favorezcan su disolución y cuantificarlo por espectrofotometría UV. Las características moleculares de la Diyodohidroxiquinoleína hacen que presente absorción en la región ultravioleta por la presencia de los electrones π en su molécula, los cuales con la energía que proporciona la luz ultravioleta pasan de un estado fundamental a un estado excitado. La espectrofotometría UV por ser un método rápido, sencillo, específico y sensible puede aplicarse al análisis de la Diyodohidroxiquinoleína, por lo que una parte integral del desarrollo o implementación de este método analítico es la verificación o validación del mismo, es decir el método debe

probarse para determinar su confiabilidad. En el presente trabajo se realizará una evaluación de la precisión, linealidad y exactitud para proporcionar una medida del comportamiento del método analítico. (4.50, 11)

5. OBJETIVOS

A. GENERALES :

a. Implementar un método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de la Diyodohidroxiquinoleína en tabletas

b. Validar el método analítico para la cuantificación de la Diyodohidroxiquinoleína presente en tabletas

B. ESPECIFICOS :

a. Reducir tiempo de análisis

b. Mejorar la confiabilidad del método

c. Disminuir costo de análisis

d. Utilizar este método como alternativo para el análisis de rutina de la Diyodohidroxiquinoleína en producto intermedio y producto terminado

6. HIPOTESIS DE TRABAJO

A. La disolución de la Diyodohidroxiquinoleína es favorecida por la acidez del medio disolvente permitiendo a nuestro método analítico cumplir con los criterios de validación

B. La luz ultravioleta proporciona suficiente energía para las transiciones electrónicas de la molécula de Diyodohidroxiquinoleína por lo que la cantidad de luz absorbida (a una frecuencia dada) esta relacionada con el número de moléculas que absorben la radiación

C. El método analítico por espectrofotometría UV satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas

7. MATERIALES

7.1. REACTIVOS

- Metanol absoluto Grado Analítico (G.A) (J.T. Baker)
- Etanol al 95 % Grado Reactivo (G.R) (Alcoholera Portales)
- Acido clorhídrico concentrado (G.R) (J. T. Baker)

7.2. MATERIAL

- Matraz volumétrico 200 ml (Pyrex)
- Matraz volumétrico 100 ml (Pyrex)
- Matraz volumétrico 50 ml (Pyrex)
- Pipetas volumétricas 10 ml (Pyrex)
- Pipetas volumétricas 5 ml (Pyrex)
- Embudos de tallo corto
- Vasos de precipitados 100 y 200 ml
- Papel Whatman # 2
- Celdas de vidrio de 1 cm (Beckman)
- Barras magnéticas
- Agitadores eléctricos (TekPro Mod. S8252-1)

7.3: EQUIPO

- Espectrofotómetro Beckman Modelo 25
- Campana de extracción
- Graficador Beckman Modelo 25
- Balanza analítica Sartorius Modelo T-100 (capacidad 100 g)

8. PARTE EXPERIMENTAL

La implementación y validación del método analítico se realizó siguiendo el diagrama de flujo que se muestra en la siguiente figura :

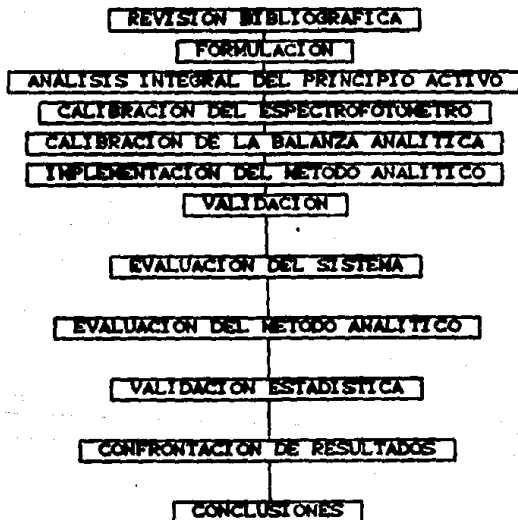


FIGURA No. 3. Diagrama de flujo del proyecto

8.1. IMPLEMENTACION DEL METODO ANALITICO

Para la implementación del método se procedió a encontrar las condiciones adecuadas bajo las cuales exista una disolución completa de la Diyodohidroxiquinoleina; los parámetros manejados para esta disolución son :

- a) Cantidad en gramos de principio activo
- b) Calidad de reactivos a utilizar
- c) Tiempo de agitación de la muestra
- d) Longitud de onda (384 nm)
- e) Diluciones de la muestra
- f) Condiciones del medio de disolución

8.2. EVALUACION DEL SISTEMA

A. PRECISION

Se realizaron 6 análisis a una sola concentración (100%) La metodología a seguir fué la siguiente :

Pesar exactamente 50 mg de principio activo y colocarlos en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 60 ml de Solución A (Ver Apendice I) y agitar mecánicamente durante 30 minutos. Diluir hasta el volumen con Solución A y mezclar. Tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un matraz volumétrico de 50 ml diluyendo al volumen con Solución B (Ver Apendice I). La concentración final es de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Preparar un estándar de la misma concentración que la muestra utilizando los mismas soluciones como en la muestra

problema.

Leer la muestra y el estándar en celdas de 1 cm a una longitud de onda de 364 nm en la región UV utilizando la Solución B como blanco.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Desviación estándar relativa : $DER \leq 1.5 \%$

Coefficiente de Variación : $CV_{\%} \leq 3 \%$

Estadígrafo de Contraste : $\chi^2_{\text{calc}} \leq \chi^2_{\text{Tab}} (\alpha = 0.05)$

B. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se realizarón 5 niveles (80, 90, 100, 110 y 120 %) con respecto a la concentración central, cada nivel por triplicado.

La metodología a seguir fue la siguiente :

Pesar 100 mg de principio activo y colocarlos en un matraz volumétrico de 200 ml. Adicionar 100 ml de Solución A y agitar mecánicamente durante 30 minutos. Llevar al volumen con la Solución A y mezclar. Tomar alicuotas de 5, 10, 15, 20 y 25 ml llevando cada una a matraz volumétricos de 100 ml y diluyendo al volumen con la Solución B.

Preparar un estándar cuya concentración final sea de 100 µg/ml, empleando las mismas soluciones para cada dilución como en las muestras problema.

Leer las muestras y el estándar a una longitud de onda de 364 nm en la región UV utilizando la Solución B como blanco.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Desviación Estándar Relativa : $DER \leq 0.7 \%$

Coefficiente de Correlación Lineal R : $R = 0.99$

Pendiente m : $m = 1$

Ordenada al origen a : $a = 0$

Coefficiente de Variación : $CV_{\bar{x}} \leq 3\%$

6.3. EVALUACION DEL METODO ANALITICO

A. EXACTITUD DEL METODO

Se realizaron 10 análisis a una concentración (100 $\mu\text{g/ml}$)
La metodología fue la siguiente :

Pesar exactamente 50 mg de principio activo y 15.4 mg de placebo (excipientes), transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de Solución A y agitar mecánicamente durante 30 minutos, diluir hasta el volumen con Solución A y mezclar. Filtrar sobre papel Whatman # 2 desechando los primeros 10 ml del filtrado. Tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un volumen de 50 ml diluyendo con Solución B. La concentración es de 100 $\mu\text{g/ml}$. Preparar un estándar con una concentración igual a la de la muestra utilizando las mismas soluciones.

Leer la muestra y el estándar a una longitud de onda de 384 nm en la región UV empleando la Solución B como blanco.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Estadígrafo de Contraste t- student :

$$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}} (\alpha = 0.05)$$

B. LINEALIDAD DEL METODO

Se realizarón 5 niveles : 80, 90, 100, 110 y 120 % con respecto a la concentración central. Cada nivel se analizará por triplicado. La metodología fue la siguiente :

Pesar las siguientes cantidades de principio activo y placebo:

Nivel 1 80 % : 40 mg de principio activo + 25.4 mg de placebo

Nivel 2 90 % : 45 mg de principio activo + 20.4 mg de placebo

Nivel 3 100 % : 50 mg de principio activo + 15.4 mg de placebo

Nivel 4 110 % : 55 mg de principio activo + 10.4 mg de placebo

Nivel 5 120 % : 60 mg de principio activo + 5.4 mg de placebo

Transferir cada muestra a un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 60 ml de Solución A agitando mecánicamente durante 30 minutos, diluir hasta el volumen con la misma solución y mezclar. Filtrar sobre papel Whatman # 2 desechando los primeros 10 ml del filtrado, tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un volumen de 50 ml diluyendo con la Solución B. Preparar un estándar con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ empleando las mismas soluciones como en la preparación de la muestra.

Leer las muestras y el estándar a una longitud de onda de 384 nm en la región UV empleando la Solución B como blanco.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Ordenada al Origen a : $a = 0$

Pendiente m : $m = 1$

Coefficiente de Correlación lineal R : $R = 0.99$

Estadigrafo de contraste t -student para la ordenada al origen a : $t_{\text{Calc}} \leq t_{\text{Tab}} ; \alpha = 0.05$

Estadigrafo de contraste t -student para la pendiente m :

$$t_{\text{Calc}} \leq t_{\text{Tab}} (\alpha = 0.05)$$

C. REPRODUCIBILIDAD

Se realizaron 3 análisis en días diferentes y con 2 diferentes analistas.

Pesar 50 mg de principio activo y 15.4 mg de placebo, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de Solución A y agitar mecánicamente durante 30 minutos, diluir hasta el volumen con la misma solución y mezclar. Filtrar sobre papel Whatman # 2 desechando los primeros 10 ml del filtrado. Tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un volumen de 50 ml diluyendo con la Solución B. La concentración es de 100 $\mu\text{g/ml}$. Preparar un estándar con una concentración igual a la de la muestra utilizando las mismas soluciones..

Leer las muestras y el estándar a una longitud de onda de 384 nm en la región UV utilizando la Solución B como blanco.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Regla de decisión a través del Estadígrafo de Contraste F con dos factores aleatorios :

$$F_{\text{Calc Analista } \alpha_i} \leq F_{\text{Tablas}} (\alpha = 0.05)$$

$$F_{\text{Calc Día } \beta_j} \leq F_{\text{Tablas}} (\alpha = 0.05)$$

$$F_{\text{Calc } \alpha_i \beta_j} \leq F_{\text{Tablas}} (\alpha = 0.05)$$

D. ESPECIFICIDAD

Pesar muestras de placebo (solo excipientes), placebo con principio activo, de tal manera que el peso total para cada muestra sea de 65.4 mg. Realizar para cada muestra el siguiente procedimiento :

Transferir la muestra a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 60 ml de Solución A y agitar mecánicamente durante 30 minutos, diluir hasta el volumen con la misma solución y mezclar. Filtrar sobre papel Whatman # 2 desechando los primeros 10 ml del filtrado. Tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un volumen de 50 ml diluyendo con la Solución B. Preparar un estándar con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ empleando las mismas soluciones como en la preparación de la muestra.

Leer las muestras y el estándar a una longitud de onda de 384 nm en la región UV empleando la Solución B como blanco.

Realizar para cada muestra un barrido desde una longitud de onda de aproximadamente 400 nm hasta 300 nm.

CRITERIO DE ACEPTACION :

- a) Placebo : No debe dar respuesta .
- b) Placebo cargado (excipientes + principio activo) :
Debe dar respuesta igual a la del Patrón de Referencia
- c) Principio Activo : Debe dar respuesta a la longitud de onda donde se encuentra el máximo de absorción del Patrón de Referencia.

E. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Se realizarán 3 análisis a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, almacenando las muestras y reanalizándolas a diferentes horas. El procedimiento de análisis es el mismo como para la exactitud del método. Después de leer las muestras, almacenarlas y reanalizarlas a diferentes horas.

CRITERIO DE ACEPTACION :

Estadígrafo de Contraste t - de Dunnet (t_D) :

$$t_{D \text{ Calc}} \leq t_{D \text{ Tablas (n, \alpha = 0.05)}}$$

9. RESULTADOS

9.1. ESPECIFICIDAD

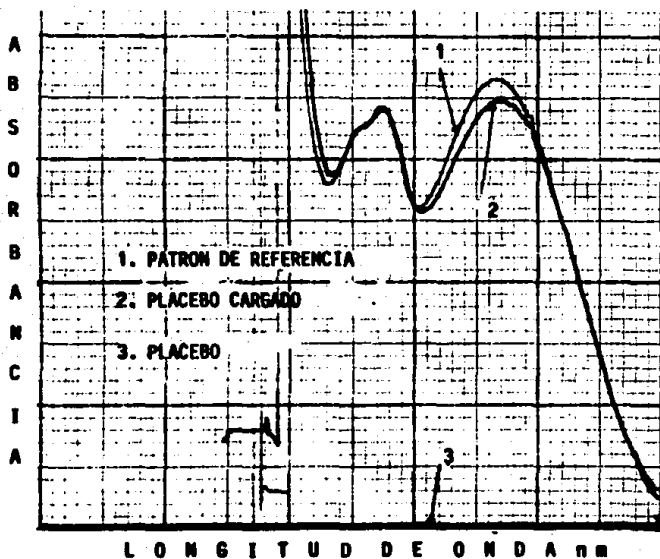


FIGURA No. 4. Espectro de absorción de la Dihydroxi-quinoleina.

9.2 PRECISION DEL SISTEMA (REPETIBILIDAD)

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro
50	49.4080	98.816
50	49.7215	99.443
50	49.6115	99.223
50	49.7950	99.590
50	51.0340	102.068
50	50.2945	100.589
50	50.2205	100.441
50	49.7035	99.407
50	49.5555	99.111
50	50.1100	100.220

PARAMETROS ESTADISTICOS

EXPERIMENTALES

$$n = 10$$

$$\bar{x} = 99.99$$

$$\sigma = 0.9150$$

$$s = 0.9545$$

$$x_i^2 = 3.721$$

$$CV_n = 0.905$$

TEORICOS

$$\leq 1.5$$

$$x_i^2 (0.025), 9 = 2.70$$

$$x_i^2 (0.975), 9 = 19.02$$

$$\leq 3\%$$

INTERVALO DE CONFIANZA

$$0.6634 < \sigma < 1.7809$$

TABLA No. 3. Precisión del Sistema

9.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro
25	24.964	99.856
25	24.891	99.564
25	24.964	99.856
50	49.854	99.708
50	50.000	100.00
50	49.781	99.562
75	74.964	99.952
75	74.307	99.076
75	73.942	98.589
100	98.906	98.906
100	98.687	98.687
100	99.052	99.052
125	124.381	99.505
125	123.432	98.747
125	124.381	99.505

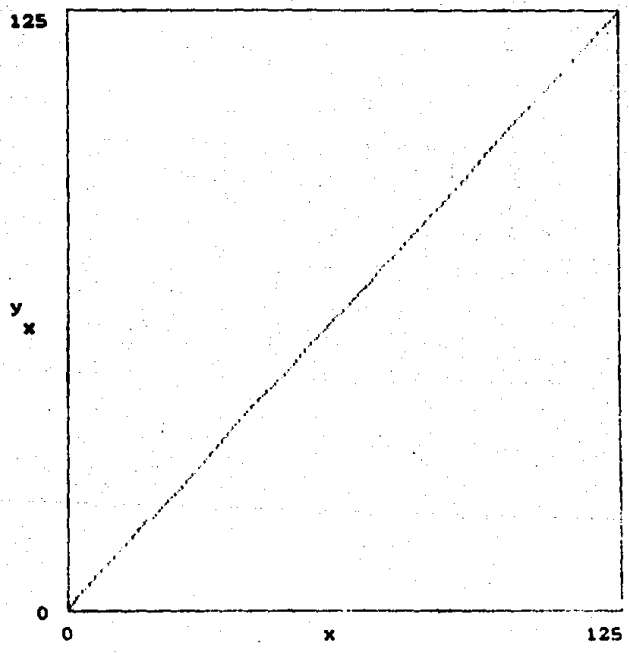
PARAMETROS ESTADISTICOS	
EXPERIMENTALES	TEORICOS
$n = 15$	
ordenada al origen $a = 0.2577$	$= 0$
pendiente $m = 0.9943$	$= 1$
coeficiente de correlación lineal $R = 0.999$	$= 0.99$
coeficiente de variación $CV_n = 0.489$	$\leq 3\%$
$t_{(ordenada\ al\ origen)} = 1.093$	$t_{(0.975, 13)} = 2.1604$
$t_{(pendiente)} = -0.100$	$t_{(0.025, 13)} = -2.16$
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN	
$-0.2518 < a < 0.766$	
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE	
$0.993 < m < 1.0066$	

TABLA No. 4. Linealidad del Sistema

F.V.	GL.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	13	18339.92	1410.763	119298.34	3.96
ERROR DE REGRESION	13	1.9983	0.1537	-	-
FALTA DE AJUSTE	3	0.3667	0.1222	0.7490	3.71
ERROR PURO	10	1.6318	0.1631	-	-

TABLA No. 5. ANADEVA de la Linealidad del Sistema

x := 0.25 ..125
y := 0.9943 x + 0.2618
x



Cantidad adicionada (x)
Cantidad recuperada (y)
x

Gráfica No. 1 Linealidad del Sistema

9.4. EXACTITUD DEL METODO

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro
50	49.733	99.466
50	49.733	99.466
50	50.102	100.384
50	49.997	99.995
50	49.238	98.477
50	49.415	98.831
50	50.446	100.893
50	50.466	100.933
50	49.925	99.851
50	50.502	101.005

PARAMETROS ESTADISTICOS	
EXPERIMENTALES	TEORICOS
$n = 10$	
$\bar{x} = 99.846$	
$s = 0.852$	
$s = 0.899$	
$t_{\text{calc}} = -0.5419$	$t_{(0.975), 9} = 2.262$
	$t_{(0.025), 9} = -2.262$
$CV_N = 0.899$	$\leq 3\%$
INTERVALO DE CONFIANZA	
99.204 < 99.846 < 100.488	

TABLA No. 8. Exactitud del Método

9.5 LINEALIDAD DEL METODO

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro
40	40.342	100.855
40	40.303	100.757
40	40.031	100.078
45	44.647	99.217
45	44.570	99.044
45	44.841	99.648
50	50.190	100.380
50	49.730	99.460
50	49.730	99.460
55	55.147	100.268
55	55.222	100.404
55	55.109	100.199
60	59.931	99.885
60	59.861	99.768
60	59.720	99.533

PARAMETROS ESTADISTICOS	
EXPERIMENTALES	TEORICOS
$n = 10$	
ordenada al origen $a = 0.2635$	$= 0$
Pendiente $m = 0.9939$	$= 1$
Coefficiente de	
Correlación Lineal $R = 0.994$	$= 0.99$
Coefficiente de	
Variación CV $= 0.545$	$\leq 3\%$
t (ordenada al origen) $= 0.553$	t (0.975, 10) $= 2.160$
t (pendiente) $= -0.547$	t (0.025, 10) $= -2.160$
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN	
$-0.764 < a < 1.201$	
INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE	
$0.9735 < m < 1.014$	

TABLA No.7. Linealidad del Método

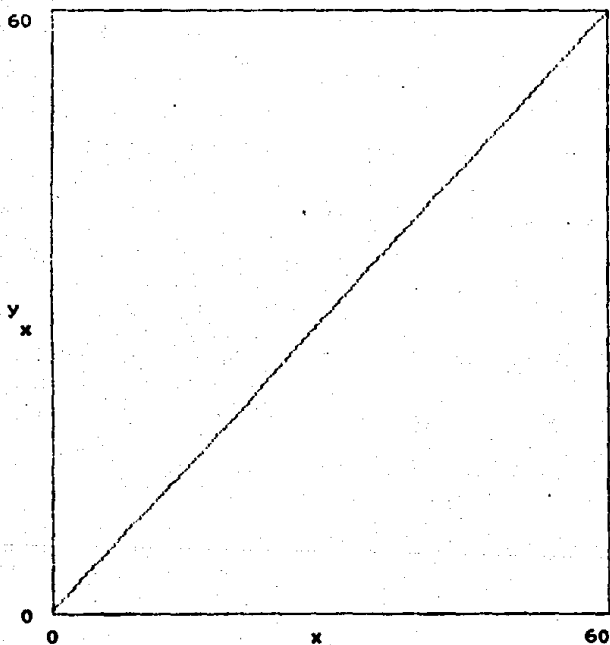
F.V.	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEIA DE CUADRADOS	$F_{\text{CALCULADA}}$	F_{TABLAS}
REGRESION	13	740.935	56.995	955.9093	3.82
ERROR DE REGRESION	13	0.8056	0.0665	-	-
FALTA DE AJUSTE	3	0.5085	0.1695	7.4688	3.71
ERROR PURO	10	0.2671	0.0267	-	-

TABLA No. 8. ANADEVA de la Linealidad del Método

$$x := 0,5 \dots 60$$

$$y := 0,9939 \cdot x + 0,263$$

x



Cantidad adicionada (x)
Cantidad recuperada (y)
x

Gráfica No. 2 Linealidad del Método

9.6. PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

	ANALISTA 1 (% de Recobro)	ANALISTA 2 (% de Recobro)
DIA 1	99.702	99.887
	99.578	99.708
	99.791	100.01
DIA 2	100.754	100.893
	99.757	100.822
	100.398	99.750

TABLA No.9. Resultados de la Reproducibilidad del Método

F.V.	GL.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{Calculada}	F _{Tablas}
ANALISTA α_i reproducibilidad	1	2.4×10^{-8}	2.4×10^{-8}	0.02084	161.4
DIA β_j diferencia	1	0.5808	0.5808	6.4000	161.4
ANALISTA-DIA $\alpha \beta_{ij}$ interacción	1	0.0694	0.0694	0.2048	5.32
ERROR EXPERIMENTAL $E_{n(t)p}$	8	3.4927	0.4366	—	—

TABLA No.10. ANADEVIA de la Reproducibilidad del Método

9.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

% INICIAL	CONDICION = TIEMPO			
	T. A. ° horas			
	% 1 h	% 3 h	% 6 h	% 24 h
99.436	99.578	99.472	99.300	99.365
99.436	99.578	99.401	99.328	99.294
99.720	99.721	99.757	99.470	99.436

TABLA No.11. Estabilidad de la Muestra

PARAMETROS ESTADISTICOS	
EXPERIMENTALES	TEORICOS
$n = 4$	
$x_1 = 99.626$	
$x_2 = 99.543$	
$x_3 = 99.300$	
$x_4 = 99.365$	
$t_{D_1} = 0.607 ; t_{D_2} = 0.343$	$t_{D_1} (2,0.99) = 2.85$
$t_{D_3} = -0.114 ; t_{D_4} = -0.222$	≤ 2.85

TABLA No.12. Estabilidad de la Muestra

10. ANALISIS DE RESULTADOS

A. PRECISION DEL SISTEMA

El análisis de los datos para la precisión del sistema se presenta en la Tabla No 3, en la cual observamos que la desviación estándar relativa encontrada es menor del 1.5 %, el coeficiente de variación menor del 3 % y la evaluación estadística a través de estadígrafo de contraste χ^2 demuestra que nuestro sistema es preciso al encontrar una χ^2 de cálculo menor a la χ^2 de tablas es decir la desviación de los datos no es significativa con respecto al valor promedio encontrado experimentalmente en nuestro sistema de trabajo.

B. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los resultados se presentan en la Gráfica No 1 y su análisis en la Tabla No 4, observando que nuestro sistema posee una ordenada al origen (a) de 0.2577, la pendiente (m) de 0.0043 y el coeficiente de correlación lineal R igual a 0.999. El análisis estadístico a través de la prueba t de Student y el análisis de varianza de la prueba F de la Tabla No.5 demuestra que no existe diferencia estadística por lo que se establece

que la linealidad de nuestro sistema de estudio presenta un modelo lineal para describir la relación entre la propiedad medida (absorbancia) y la cantidad de principio activo.

C. EXACTITUD DEL METODO

La exactitud de nuestro método se evaluó estadísticamente a través del porcentaje de recobro, empleando el estadígrafo de contraste t de Student. El análisis de los datos se presenta en la Tabla No 6. Los resultados obtenidos se encuentran dentro del criterio de aceptación, demostrando que el método de análisis es exacto y que no existe diferencia estadística significativa.

D. LINEALIDAD DEL METODO

La linealidad de nuestro método de análisis, como observamos en la Gráfica No 2 y en los datos de la Tabla No. 7, el método tiene una ordenada al origen (a) de 0.263, una pendiente (m) de 0.0030 y el coeficiente de correlación lineal (R) igual a 0.994. El análisis estadístico a través de la prueba t de Student demuestra que no existe diferencia estadística. En la Tabla No. 8 el análisis de varianza a través de la prueba F , encontramos que nuestro modelo de regresión lineal no es el adecuado para el tratamiento de los datos.

E. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

La variabilidad de nuestro método se realizó a través del % de Recobro, analizando por triplicado a una misma concentración del 100 % por dos analistas y en dos diferentes días. El tratamiento estadístico de los datos se llevo a cabo mediante el análisis de varianza. Como se observa en la Tabla No.10, el valor del estadígrafo de contraste F calculado para los diferentes tratamientos (Analista, Día, Analista - Día) es menor que el valor de F teórica con un nivel de significancia α de 0.05, por lo que demostramos estadísticamente que nuestro método de análisis es reproducible.

F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

La estabilidad de la muestra se evaluó con el % de Recobro, reanalizando las muestras a diferentes horas, bajo las mismas condiciones de operación. El tratamiento estadístico para demostrar la estabilidad de la muestra fue la prueba de Dunnet (t_D). En los datos de la Tabla No.12, se observa que los valores de la prueba t_D para los diferentes tiempos de reanálisis de la muestra son menores a la t_D teórica, por lo que establecemos que nuestra muestra de análisis es estable a Temperatura Ambiente y protegida de la luz dentro de un período de 24 horas.

G. ESPECIFICIDAD DEL METODO

En la Figura No 4, observamos el espectro de absorción de la Diyodohidroxiquinoleína. En el solamente absorbe el placebo cargado, los excipientes no presentan absorción, por lo cual establecemos que nuestro método da respuesta solo a la presencia de la sustancia de interés, y entonces puede ser empleado como técnica analítica alternativa de análisis de para control de calidad.

11. CONCLUSIONES

Podemos establecer, de acuerdo a los resultados obtenidos que implementamos un método analítico por espectrofotometría UV, que cumple los parámetros de linealidad en un rango de 40 a 60 $\mu\text{g/ml}$, exacto entre el intervalo de confianza de $99.204 < \mu < 100.488\%$, repetible y reproducible entre analistas y días, específico para ser empleado como método de rutina en análisis de control de calidad para tabletas.

El método de análisis implementado y validado presenta características de rapidez, sencillez, economía (en comparación con el método por combustión farmacopeico), por lo que se propone que se considere como un método alternativo en el análisis de la Dihydrohidroxiquinoleína tanto en la etapa de *granulado* como en producto terminado (*tabletas*).

APENDICE I**A. PREPARACION DE SOLUCIONES :****SOLUCION A**

Transferir aproximadamente 200 ml de metanol absoluto (G.A.) a un matraz de 1000 ml. Adicionar lentamente y con precaución 84 ml de ácido clorhídrico concentrado (G.R.), diluir a un volumen de 1000 ml con metanol absoluto (G.A.) y mezclar. Almacenar la solución en recipientes de vidrio color ambar perfectamente cerrados.

G.A.: Grado Analítico; G.R.: Grado Reactivo

SOLUCION B

Transferir aproximadamente 200 ml de etanol al 95 % (G.R.) a un matraz de 1000 ml. Adicionar lentamente y con precaución 84 ml de ácido clorhídrico concentrado (G.R.), diluir a un volumen de 1000 ml con etanol al 95 % (G.R.) y mezclar. Almacenar la solución en recipientes de vidrio color ambar perfectamente cerrados.

APENDICE II

PRECISION

- Se propone la siguiente hipótesis

$$H : \sigma \leq 1.5 \%$$

$$H_1 : \sigma > 1.5 \%$$

- Estadígrafo de Contraste Ji- cuadrada (χ^2)

$$\chi^2_{\text{calculado}} = \frac{(n-1) s^2}{\sigma^2}$$

n = número total de datos

s = desviación estándar

σ = varianza poblacional

Nivel de significancia = $\alpha = 0.05$

Grados de libertad = gl = n - 1

- Area de aceptación :

$$\chi^2_{\frac{\alpha}{2}} \quad \chi^2_{1 - \frac{\alpha}{2}}$$

- Criterio de Aceptación :

Si χ^2 de cálculo es $\leq \chi^2$ de tablas se dice que el método es preciso.

EXACTITUD

Estadígrafo de contraste t :

$$t_{\text{calculo}} = \frac{\bar{X} - t}{s / \sqrt{n}}$$

\bar{X} = media poblacional

s = desviación estandar

n = número total de datos

LINEALIDAD DEL SISTEMA Y METODO

Nos interesa que el sistema y el método se acerque a una línea recta del modelo siguiente :

$$Y = A + BX$$

donde

A = ordenada al origen

B = pendiente

Y = cantidad recuperada

X = cantidad adicionada

Ordenada al origen A :

• Se propone la siguiente hipótesis

$$H : A = 0$$

$$H_1 : A \neq 0$$

$$A = \frac{(\sum Y)(\sum X) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Pendiente B :

• Se propone la siguiente hipótesis

$$H : B = 1$$

$$H_1 : B \neq 1$$

$$B = \frac{n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Inferencia para A :

$$t_{\text{calculo}} = \frac{A - A_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - A (\sum Y) - B (\sum XY)}{n}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

$S_{y/x}$ = Error típico

$\hat{S}_{y/x}$ = Error típico modificado

• Area de aceptación

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{calculo}} \leq t_{1 - \frac{\alpha}{2}}$$

• Criterio de aceptación

Si t de cálculo caé dentro del área de aceptación se considera que el método tiene una ordenada al origen cercana a cero.

• Intervalo de Confianza

$$A = t_{1 - \frac{\alpha}{2}} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

Inferencia para B :

$$t_{\text{calculo}} = \frac{(B - B_0) S_x \sqrt{n - 1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

t_{tablas} con un nivel de significancia (α)
 $\alpha = 0.05$ con $n - 2$ grados de libertad
 (gl)

• Área de aceptación

$$t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{\text{calculo}} \leq t_{1 - \frac{\alpha}{2}}$$

• Criterio de Aceptación

Si t de cálculo caé dentro del área de aceptación, se considera que el método tiene una pendiente

cercana a uno

• Intervalo de Confianza

$$B = t_{1 - \frac{\alpha}{2}} \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n - 1}}$$

REPRODUCIBILIDAD

Modelo de análisis de varianza para 2 factores aleatorios.

Simbología :

- Y_{ijk} = Porcentaje cuantificado por el i -ésimo analista
 en el j -ésimo día de la k -ésima repetición
 α_i = i -ésimo analista
 β_j = j -ésimo día
 K = repetición
 $\alpha\beta_{ij}$ = Efecto debido a la interacción analista - día
 E_{ijk} = Error experimental

F.V.	GL.	SUMA DE CUADRADOS	MEIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
ANALISTA α_i columnas	a-1	$\frac{\sum Y_{i..}^2}{bc} - \frac{Y^2}{abc}$	$SC_A / a-1$	MC_A / MC_{AD}
DIA β_j filas	b-1	$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{ac} - \frac{\sum Y^2}{abc}$	$SC_D / b-1$	MC_D / MC_{AD}
ANALISTA-DIA $\alpha\beta_{ij}$ interacción	a-1 b-1	$\frac{\sum Y_{ij.}^2}{c} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{bc} - \frac{\sum Y_{.j.}^2}{ac} + \frac{\sum Y^2}{abc}$	$SC_{AD} / (a-1)(b-1)$	MC_{AD} / MC_{error}
ERROR EXPERIMENTAL $E_x(ij)$	ab (c-1)	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ij.}^2}{c}$	$SC_E / ab(c-1)$	-----

TABLA de ANADEV A de la Reproducibilidad del Método

BIBLIOGRAFIA

1. Bowman, W., Farmacología: Bases Bioquímicas y Patológicas, 2^a ed., Edit. Interamericana, México, 36.21 (1985)
2. The Merck Index, tenth edition, Merck & Co. Rahway, U.S.A.
3. Godman, L., y Gulman, A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 6^a ed., Edit. Medica Panamericana, México 1984.
4. Connors, K., Curso de Análisis Farmacéutico, Edit. Reverté, España , 195-253 (1981)
5. Rodriguez, R., Vademécum Académico de Medicamentos, Edit. UNAM, Tomo I, México , 279-280 (1984)
6. Spiegel, R., Estadística, Edit. Mc Graw-Hill, México (1978)
7. Secretaría de Salud, Avances de los Trabajos del Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación, México, julio 1988.
8. Secretaría de Salud, Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Conclusiones de las mesas redondas sobre los requisitos mínimos para las Pruebas de Estabilidad de Medicamentos, Rev. Mex. Cien. Farm, Vol 8. No 3, sep. 1987, pág. 20-28.

9. Sidney, W., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Fourteenth edition, Edit. Arlington, 720 (1984)
10. Guerra, J., Finkelson, M., Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories, Pharm. Tech. March 1986, pag. 74-78.
11. Boehleret, J., Assay Development in Stability Test Methods, Drug. Dev. Ind. Pharm. 10 (8 & 9) 1984, pag 1343-1371.
12. Secretaria de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5^a ed., México , 1160-1162 (1988)
13. The United States Pharmacopeia, Twenty first Revision, United States Pharmacopeial Convention, Inc. Washinton, pag. 550-551 (1980)
14. *Idem*, Twenty second Revision, 1710-1712 (1990)
15. Aguilar, G., Alcántara, A., Hernández, C., Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos A.C., México 1988.
16. Ya-Lun, Análisis Estadístico, 2^a ed., Edit. Interamericana México, 771- 778 (1986)
17. Remingtons, D., Schork, A., Estadística Biométrica y Sanitaria, Edit. Prencice/Hall International, España (1977)

18. Rao, C., Espectroscopia " Ultravioleta y Visible ", Edit. Alhambra, México, 268-270 (1979)
19. CIPAM, Guía de Prácticas Adecuadas para Laboratorios Analíticos, México, agosto 1988.
20. Taller de Validación : Validación de Métodos Analíticos.
Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C., México, septiembre 1989.
21. CIPAM, Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica, 3^a ed., México (1989)