



27  
24  
Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
UNIDAD ACADÉMICA ZARAGOZA

VALIDACION DE UN METODO  
ANALITICO PARA LA CUANTIFICA-  
CION DE ACIDO FOLICO EN  
TABLETAS

T E S I S

Que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO

P r e s e n t a

*Mendoza Luján Ma. de los Dolores*

Asesor: Q.F.B. Patricia Parra C.



México.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



## **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

I. Introducción	1
II. Fundamentación del tema	3
A. Validación	3
1. Parámetros estadísticos	4
a. Especificidad	5
b. Exactitud	5
c. Precisión	6
1) Repetibilidad	6
2) Reproducibilidad	6
d. Linealidad	7
e. Estabilidad de la muestra	9
B. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible	10
1. Absorción y emisión de radiación elec- tromagnética	11
2. Ley de Beer	12
3. Instrumental	14
4. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	15
C. Características de Acido Fólico	17
1. Físicas y químicas	17
2. Ensayos de identidad	18
3. Farmacología	18
III. Planteamiento del problema	25
IV. Objetivos	26
V. Hipótesis	27
VI. Material y método	28

A. Material	28
1. Principio activo y excipientes	28
2. Reactivos	28
3. Material	29
4. Instrumentos	29
B. Método	30
1. Preparación de soluciones reactivo	30
2. Preparación de solución estándar	31
3. Preparación de solución problema	32
4. Método propuesto	32
VII. Resultados	36
A. Especificidad	36
B. Exactitud	38
C. Precisión	40
1) Repetibilidad	40
2) Reproducibilidad	42
D. Linealidad	43
E. Estabilidad de la muestra	46
VIII. Discusión de resultados	47
IX. Conclusiones	49
Bibliografía	50
X. Apéndice	53

## I. INTRODUCCION

Como una necesidad para la Industria Farmacéutica se lleva a cabo la validación de una serie de métodos analíticos, como el del presente trabajo, en donde se contemplan problemas en el método de uso rutinario empleado en la cuantificación de ácido fólico, debido a las condiciones de trabajo existentes en el laboratorio, para así garantizar la confiabilidad de que el medicamento cubra con todas las especificaciones de calidad y diseño. (6, 9, 11, 12)

La validación general incluye una evaluación de la precisión, exactitud, linealidad y especificidad del método, y la estabilidad de la muestra.

De todo lo anterior se concluye que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos, producto y proceso deben ser probados y controlados para asegurar su calidad.

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble, necesaria para el metabolismo y que es suministrada desde el exterior (alimento o medicamento). Es constituyente del complejo B y existe en hígado, levadura, riñón y en las hojas de vegetales, especialmente espinaca y lechuga. (1)

En 1972 el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Ciencias de la Nutrición decidió que el término Folacina debía ser usado en vez de Ácido Fólico. Sin embargo la USP continúa llamándolo Ácido Fólico y en la práctica común se sigue empleando el mismo término.

La vitamina B<sub>12</sub> y el Acido fólico son esenciales para la dieta humana. La deficiencia de éstas vitaminas produce una síntesis deficiente del DNA en las células que intentan la replicación cromosómica y la división. Como los tejidos de mayor índice de recambio celular muestran los cambios más notables, el sistema hematopoyético es particularmente sensible a la deficiencia de éstas vitaminas. Clínicamente, el primer signo de deficiencia es la anemia megaloblástica, en la cual el trastorno de la síntesis del DNA provoca anomalía morfológica de las células precursoras en la médula ósea. Glóbulos rojos macrocíticos anormales son el producto y el paciente sufre anemia grave. (2)

La técnica espectrofotométrica descrita en las diferentes farmacopeas: Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, USP XX, The Extra Pharmacopeia, British Pharmacopeia (3, 4, 5, 24), indican la adición de una concentración de estándar igual a la muestra, formando una sal de diazonio y la copulación de la sal durante el método de análisis para la cuantificación del ácido fólico en tabletas; sin embargo el presente trabajo implementa el método de cuantificación sin la adición del estándar.

## II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

El incremento en la producción de medicamentos y la elaboración de productos nuevos ha llevado a la Industria Farmacéutica a implementar el término "validación", para así garantizar la confiabilidad de que el medicamento cubra con todas las especificaciones de calidad y diseño. (6, 9, 11, 12)

### A. Validación

La validación es un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en análisis químico. Los parámetros que proporciona la información para decidir si un método es o no funcional son estudiados estadísticamente. Un método que es válido para una situación, puede no serlo en otra. (6)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. (6)

Existen 3 categorías de métodos más comunes que requieren ser validados, estas son:

- Categoría I: Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría II: Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría III: Métodos analíticos para determinar características físicas. Por ejemplo: disolución, liberación del principio activo.

Dependiendo de la categoría del método a validar se evalúan diferentes parámetros estadísticos, ver tabla No. 1

<u>PARAMETRO ANALITICO</u>	<u>CATEGORIA I</u>	<u>CATEGORIA II</u>		<u>CATEGORIA III</u>
		<u>a. Cuantitativo</u>	<u>b. Pruebas límite</u>	
Precisión	✓	✓	---	✓
Exactitud	✓	✓	*	*
Límite de detección	---	---	✓	*
Límite de cuantificación	---	✓	---	*
Especificidad	✓	✓	✓	*
Linealidad	✓	✓	---	*
Estabilidad de la muestra	✓	✓	✓	✓

Tabla No. 1: Datos requeridos para validación de métodos analíticos considerando la categoría a la que pertenecen.

\* Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

### 1. PARAMETROS ESTADISTICOS

Los parámetros estadísticos evaluados para determinar la confiabilidad del método espectrofotométrico para la cuantificación del Acido fólico son los siguientes:

- a. Especificidad
- b. Exactitud
- c. Precisión
  - 1) Repetibilidad
  - 2) Reproducibilidad



d. Linealidad

e. Estabilidad de la muestra

a. Especificidad. Verifica la capacidad del método para determinar el principio activo, sin que exista interferencia por parte de otro principio activo, excipientes, impurezas o productos de degradación. (7)

Se compara la respuesta del producto, excipientes y estándar sometidos a las condiciones seleccionadas (para acelerar el proceso de degradación) con la respuesta del producto, excipientes y estándar que permanecen en condiciones normales. El estándar y el producto después de haber sido sometidos a las condiciones de prueba, si presentan productos de degradación éstos no deberán dar respuesta a las mismas condiciones analíticas del fármaco.

b. Exactitud. Es la medida de cuánto las determinaciones se desvían del valor verdadero. Esto implica el conocimiento exacto del valor verdadero que ha sido comparado con un patrón aceptable y que se utiliza como exacto o verdadero. (8)

Puede realizarse de dos maneras "por placebo añadido" o "por adición de estándar". En el primero, el ingrediente activo de pureza conocida y exactamente pesado, se añade a los excipientes del producto, la mezcla resultante se analiza y los resultados se comparan con los esperados. En el segundo se añade a la muestra en estudio completo, una cantidad conocida del ingrediente activo, se analiza antes y después de la adición y por diferencia se obtiene la cantidad de sustancia añadida.

La exactitud puede variar con las posibles concentraciones, por tanto debe determinarse entre un rango que debe ir del 80 al 120%

del valor teórico esperado o del 80% del valor más bajo aceptado y el 120% del valor más alto aceptado; para algunos autores, los niveles de concentración a los que debe trabajarse serían en el rango del 85 al 115%.

Para fines prácticos se preparan en cantidad suficiente 6 muestras de cada por ciento escogido.

Los resultados se expresan en términos de coeficiente de variación, intervalo de confianza, así como estadísticamente a través de "t" de student.

2. Precisión. Es el grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad que reflejan la variabilidad de la respuesta. Con el método que se está validando, se debe obtener estadísticamente un mismo resultado las veces que se realice la determinación de una cantidad constante, que puede ser bajo las mismas condiciones (repetibilidad) o bien bajo diferentes condiciones (reproducibilidad).

1) Repetibilidad. Se preparan en cantidad suficiente 6 muestras de cada por ciento escogido: 100%, una concentración inferior y una superior a la del 100%.

Se expresan los resultados en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación y estadísticamente a través de "X<sup>2</sup>".

2) Reproducibilidad. Un método es reproducible, cuando los resultados obtenidos en diferentes laboratorios o con diferentes equipos o es realizado por otros analistas son iguales estadísticamente.

El modelo estadístico para el estudio de la reproducibilidad es el siguiente siguiendo un modelo cruzado;

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_k \quad (1j) \quad (ec. 1)$$

donde:

$Y_{ijk}$  = recobro experimental asociado al  $k$ -ésimo placebo adicionado en el  $j$ -ésimo día para el  $i$ -ésimo analista.

$\mu$  = media general

$A_i$  = efecto del  $i$ -ésimo analista sobre el recobro experimental  $i=1...a$

$B_j$  = efecto del  $j$ -ésimo día sobre el recobro experimental  $j=1...b$

$AB_{ij}$  = efecto de la interacción  $i$ -ésimo analista,  $j$ -ésimo día sobre el recobro experimental.

$E_k(ij)$  = error experimental  $k=1...r$

El análisis de varianza es una técnica empleada comúnmente para determinar la magnitud de la variación de los factores sobre la variable de respuesta y es aplicable en muchas situaciones experimentales diferentes, con varios grados de complejidad. (10)

El objeto principal del análisis de la varianza es determinar la influencia de cada factor, individualmente y en combinación sobre cierta variable de respuesta.

Sin embargo, una buena precisión no significa buena exactitud, ya que es posible cometer una y otra vez el mismo error. (8)

d. Linealidad. Es la validación de la cantidad de fármaco recobrado por el método, como una función de la cantidad de fármaco original contenida en la muestra (9). Se demuestra que el método es lineal en un rango mayor a lo que se encuentra especificado para el producto.

Evalúa el error proporcional, que es dependiente de la cantidad de fármaco presente en el placebo (excipientes).

El método debe seguir una línea recta, figura No. 1:

$$y = mx + a \quad (\text{ec. 2})$$

donde:

$y$  = variable dependiente (mg recuperados)

$m$  = pendiente

$x$  = variable independiente (mg adicionados)

$a$  = ordenada al origen

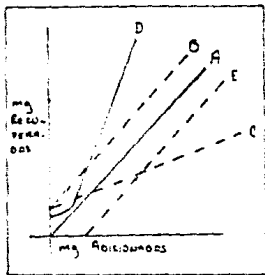


Figura No. 1: Recobros experimentales que muestran los errores proporcionales. Línea A situación ideal. B presenta error sistemático, C muestra error consistente, D muestra un método no lineal.

Por medio de una validación se pueden detectar errores.

Cualquier proceso de medición está sujeto a error. El error de un método analítico debe evaluarse para determinar su exactitud y establecer su precisión.

El método analítico está sujeto a dos tipos de error el sistemático (determinado) y el error aleatorio (indeterminado o incidental). (11)

Error determinado: se debe a una falta de control de calidad de la técnica analítica, dando lugar a medidas incorrectas. Se han

clasificado en errores instrumentales, del método, de operación y personales. Se evalúa por medio del recobro experimental obtenido de un placebo cargado el cual evalúa el error sistemático constante.

Error indeterminado: se debe por las pequeñas diferencias en me diciones sucesivas efectuadas por el mismo analista en condiciones prácticamente idénticas. Da lugar a medidas imprecisas. Permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático. (11)

La linealidad se realiza cuando menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

Los criterios para considerar un método lineal son:

- Ordenada al origen:  $a = 0$
- Pendiente:  $m = 0.99$
- Coefficiente de correlación:  $r^2 = 0.98$

a. Estabilidad de la muestra: Son las condiciones en las cuales la muestra preparada mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado de tiempo (horas, días). Si las muestras presentan algún cambio físico o químico, establecer las condiciones de almacenamiento adecuado para las muestras preparadas. (9)

Para evaluar la estabilidad de las muestras se someten a diferentes condiciones de almacenamiento, como pueden ser a refrigeración, obscuridad o temperatura ambiente, las muestras se analizan antes de ser almacenadas y después de un tiempo determinado dependiendo de nuestro método de análisis, bajo las mismas condiciones de operación.

Procediendo de lo general a lo particular se dice que una técnica es un principio científico que se utiliza para proporcionar la información necesaria y la adaptación de éste con el propósito de se-

leccionar la medición, se denomina método.

La dirección necesaria para la utilización del método es llamado procedimiento y el conjunto de indicaciones que deben seguirse sin excepción, para la acentación de resultados analíticos es denominado protocolo. (6, 12)

### E. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

Es un método fisicoquímico empleado en análisis para la medición de la absorción o emisión de la energía radiante que realizan las moléculas y los átomos. (13, 14)

La energía radiante se define como la energía transmitida en forma de radiación electromagnética. Puede ser emitida por sustancias bajo condiciones de gran excitación, tales como las producidas por altas temperaturas o por descargas eléctricas. Esta energía puede ser absorbida, transmitida, reflectada y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación (sólido, líquido, disolución y gas) si la radiación incidente tiene una longitud de onda apropiada. (13, 14)

Las radiaciones electromagnéticas muestran una doble característica. En difracción y refracción, la radiación tiene propiedad de onda, aunque no necesita de un medio físico para su propagación. En los fenómenos de emisión y absorción, la radiación electromagnética tiene también las propiedades de las partículas, llamadas fotones (pertenecientes a la luz). (15-16)

La energía que incide sobre la muestra es una radiación monocromática de un solo haz, o por razones prácticas, una banda muy estrecha de longitudes de onda; esto es cuando se ha elegido un inter-

valo de confianza.

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. (3)

La banda espectral empleada en la medida de la absorción puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta (190-380nm) y la visible (380-780nm). La espectrofotometría en la zona visible (que antes solía llamarse colorimetría) es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia. (3)

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visibles y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la celda y la concentración, por lo cual la concentración se puede determinar fotométricamente. (15, 16)

#### 1. ABSORCION Y EMISION DE RADIACION ELECTROMAGNETICA

Cuando un átomo o molécula absorbe energía, pasa a un estado de mayor energía o estado excitado. A cada estado excitado puede asignársele un nivel de energía definido y todos los posibles estados son característicos de cada átomo o molécula. En la figura No. 2 se muestra un diagrama simplificado de niveles energéticos para un átomo o molécula.

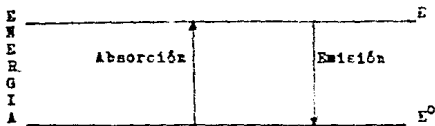


Figura No.2: Diagrama de niveles de energía  
 $E^0$  nivel energético bajo; E nivel energético alto.

Las dos líneas horizontales representan dos niveles energéticos. Si al sistema se le proporciona energía en forma de luz o calor, un electrón pasará del estado  $E^0$  al estado E. Esta absorción hace que la molécula o átomo se encuentre en estado excitado. Una vez en el estado excitado, las especies eliminan el exceso de energía mediante varios procesos; en primer lugar, la partícula energética puede chocar con moléculas de disolvente o con otras moléculas y transferir la energía a su entorno; en segundo, las especies se desactivan emitiendo un fotón (emisión) equivalente a la diferencia energética entre los dos niveles E y  $E^0$ . En ambos casos, la molécula o átomo regresa a su estado electrónico fundamental. (14)

## 2. LEY DE BEER

Cuando un haz de energía radiante monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia (transparente), parte de la energía es absorbida y el resto transmitida. Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda de la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida. (17)



Estas generalizaciones tienen su base cuantitativa en las leyes de la espectrofotometría:

la primera ley, atribuida a Bouger, dice que a una longitud de onda en la que pueda ocurrir absorción, al aumentar el espesor de la muestra absorbente disminuirá la cantidad de luz transmitida a través de ella.

La energía incidente de radiación monocromática se denomina  $P_0$  y la transmitida  $P$ . La absorción está definida como:

$$A = -\log P/P_0 ; \quad (\text{ec. 3})$$

la segunda ley establece que a una longitud de onda en la que pueda ocurrir absorción, al aumentar la concentración de la solución absorbente disminuirá la energía luminosa, transmitida en una forma logarítmica similar a la ley anteriormente mencionada.

$$\ln (P/P_0) = -k'c \quad (\text{ec. 4})$$

donde:  $k'$  = está relacionada con la intensidad de absorción.

Combinando las dos leyes, se obtiene la ecuación de la ley de Beer:

$$A = kbc \quad (\text{ec. 5})$$

donde:  $k$  = es la absorptividad de la muestra

$b$  = es la longitud de la muestra

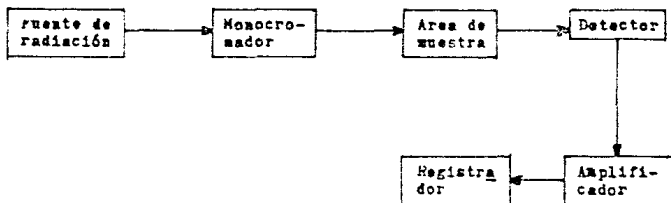
$c$  = es la concentración

Por lo general, la representación de la ley de Beer (absorbancia en función de la concentración) es lineal y la recta pasa por el origen.

Las desviaciones de la ley de Beer son de dos tipos, positivas y negativas. Los factores que pueden causarla son: condiciones ambientales, errores instrumentales y desviaciones químicas. (14, 17, 18, 19)

### 3. INSTRUMENTAL

Todo espectrofotómetro de ultravioleta y visible está formado de los siguientes componentes:



a. Fuente de radiación: A fin de que sea adecuada para las medidas de absorción, la fuente de radiación debe de cumplir ciertos requisitos. Primero debe generar un haz con energía suficiente para hacer fácil la detección y medida. Segundo, la radiación debe ser continua; esto es, su espectro debe de contener todas las longitudes de onda dentro de la región en la cual es usada.

Dos fuentes de radiación son necesarias para cubrir el rango ultravioleta-visible, una lámpara de tungsteno es una buena fuente de radiación para la región visible, en la región ultravioleta, la fuente de energía más usual es una lámpara de descarga de deuterio o hidrógeno. La lámpara de hidrógeno consiste en un par de electrodos contenidos en una envoltura de vidrio con una ventana de cuarzo.

b. Monocromador. Un monocromador sirve para resolver la radiación procedente de la fuente en sus longitudes de onda componentes y suministrar el aislamiento de éstas en bandas muy estrechas. La luz admitida por medio de una rendija de entrada es colimada con una len-

te o espejo. Entonces es dispersada por medio de una red o prisma. Cualquier porción del espectro resultante puede ser enfocado sobre una rendija de salida, de nuevo con una lente o espejo.

c. Área de muestra. Las celdas que contienen la muestra han de ser transparentes a la radiación, por lo que se emplean celdas de vidrio en la región visible y celdas de sílice en el ultravioleta.

d. Detector. En los espectrofotómetros de ultravioleta-visible se emplean dispositivos electrónicos que se conocen como fototubos, para detectar la intensidad de radiación transmitida por la muestra. Convierte la energía radiante en energía eléctrica.

e. 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. Los espectrofotómetros registradores trazan un registro de la absorbancia sobre papel; con estos instrumentos se registra automáticamente el espectro de absorbancia completo.

#### 4. ESPECTROFOTOMETRO ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El espectrofotómetro ultravioleta-visible (figura No. 3) tiene óptica de cuarzo y puede ser empleado en las regiones ultravioleta y visible del espectro. El instrumento posee fuentes de radiación intercambiables incluyendo una lámpara de deuterio o hidrógeno para las longitudes de onda más bajas (190-380nm) y una lámpara de filamento de tungsteno para las longitudes de 380-780nm. Un par de espejos reflejan la radiación, a través de una ranura ajustable, hacia el compartimiento del monocromador. Después de atravesar toda la longitud del instrumento, la radiación se refleja en un prisma de Littrow; ajustando la posición del prisma, puede enfocarse en la ranura luz de la

longitud de onda deseada. No obstante, la óptica está colocada también para que los haces de entrada y salida estén separados unos de otros sobre el eje vertical; de este modo, el haz de salida pasa por debajo del espejo de entrada y entra en el compartimiento de la celda. Después de pasar a través de la muestra o del disolvente, la luz pasa al compartimiento del fototubo en donde es medida su energía con el más apropiado de un par de fototubos intercambiables. Uno de éstos es sensible a la radiación por encima de 625 milimicras y el otro a las longitudes de onda más cortas. La corriente fotoeléctrica es pasada a través de una resistencia fija, y la caída de potencial a lo largo de esta resistencia medida por medio de un circuito potenciométrico.

Es necesaria la amplificación de las corrientes fuera de equilibrio en el circuito potenciométrico ya que son muy pequeñas. (18, 19)

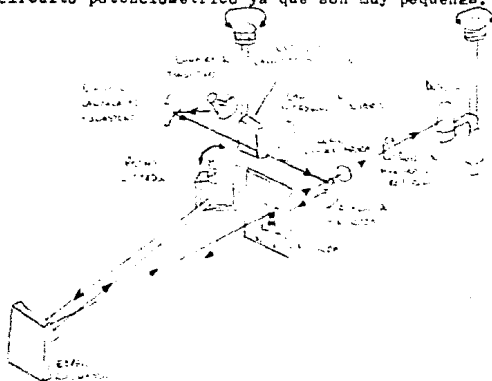
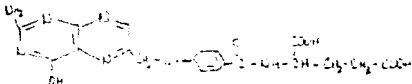


Figura No. 3: Diagrama esquemático del espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.

C. Características de Acido Fólico

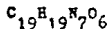
I. FISICAS Y QUIMICAS

Fórmula condensada:



Fórmula molecular:

P.M. = 441.4 g/mol



Contiene no menos del 95 y no más del 102% de  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ , calculado sobre la sustancia anhidra. Contiene 5 a 8.5% de agua.

Sustancia de referencia: Acido Fólico, no secar, determinar el contenido de agua en el momento de utilizarse. (3, 4)

a. Descripción: Polvo cristalino, amarillento o anaranjado, inodoro; soluble en ácido acético, fenol, piridina, en ácidos y álcalis diluidos; apreciablemente soluble en etanol y butanol; insoluble en acetona, cloroformo, éter, benceno, casi insoluble en agua.

b. Estabilidad. Es estable en solución acuosa de pH = 6.0-9.8 en presencia de buffer de fosfatos a pH = 5.0 (20, 21) Soluciones ácidas de ácido fólico son sensibles al calor; soluciones alcalinas del ácido fólico son sensibles a la oxidación. En un medio acuoso a un pH de 3 a 4 el ácido fólico llega a ser insoluble cristalizando.

Mantenerlo en recipientes herméticos y protegidos de la luz.

## 2. ENSAYOS DE IDENTIDAD

### Infrarrojo

Cuantitativo: por cromatografía seguida por espectrofotometría

Absorción ultravioleta: se basa en la formación de una sal de diazonio y por último la copulación de la sal.

Microbiológico: se basa en el crecimiento que provoca el ácido fólico del *Lactobacillus casei* o el *Streptococcus faecalis*, lo que se mide por la cantidad de ácido fólico por dichas bacterias. (1, 21, 22)

## 3. FARMACOLOGÍA

a. Origen y química. El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble, constituyente del complejo B y existe en la levadura, hígado, riñón y en las hojas de los vegetales, especialmente espinaca y lechuga.

Está constituido por unión del aminoácido ácido L-glutámico con el ácido pterico a su vez formado por la unión del grupo pteridilo -derivado de la pteridina- y el ácido p-aminobenzoico. (1, 2, 23)

El ácido fólico es termolabile y resistente a la temperatura del autoclave.

En el organismo, el ácido fólico inactivo por hidrogenación mediante la enzima dihidrofolatorreductasa da origen al ácido tetrahidrofólico, tetrahidrofolato o THF -previo paso por el dihidrofolato o DHF-, y en el primero se han añadido hidrógeno en las posiciones 5, 6, 7 y 8 (figura No. 4). El tetrahidrofolato se transforma en coenzimas activas que son: a) el 5-formiltetrahidrofolato, también denominado ácido folínico, leucovorina o factor citrovorum;

b) el 5formiminotetrahidrofolato; c) el 10-formiltetrahidrofolato; d) el 5,10-metilenotetrahidrofolato; e) el 5,10-meteniltetrahidrofolato; f) el 5-metiltetrahidrofolato. Estas 6 son sustancias formadas por sustitución a nivel 5 y 10 son las farmacológicamente activas y la leucovorina se utiliza en terapéutica.

Al respecto cabe señalarse:

- que estos derivados del ácido fólico, como el 5-metiltetrahidrofolato y sobre todo el 5-formiltetrahidrofolato o leucovorina poseen acción antianémica semejante al que tiene aquel ácido en las angemias megaloblásticas;

- en el plasma sanguíneo se encuentran los citados derivados, sobre todo el 5-metiltetrahidrofolato;

- el ácido fólico o leucovorina actúa en forma más rápida y efectiva para contrarrestar los efectos de las drogas antagonistas del ácido fólico;

-son los derivados del ácido fólico citados los que intervienen en las reacciones metabólicas como coenzimas.

(figura No. 4)

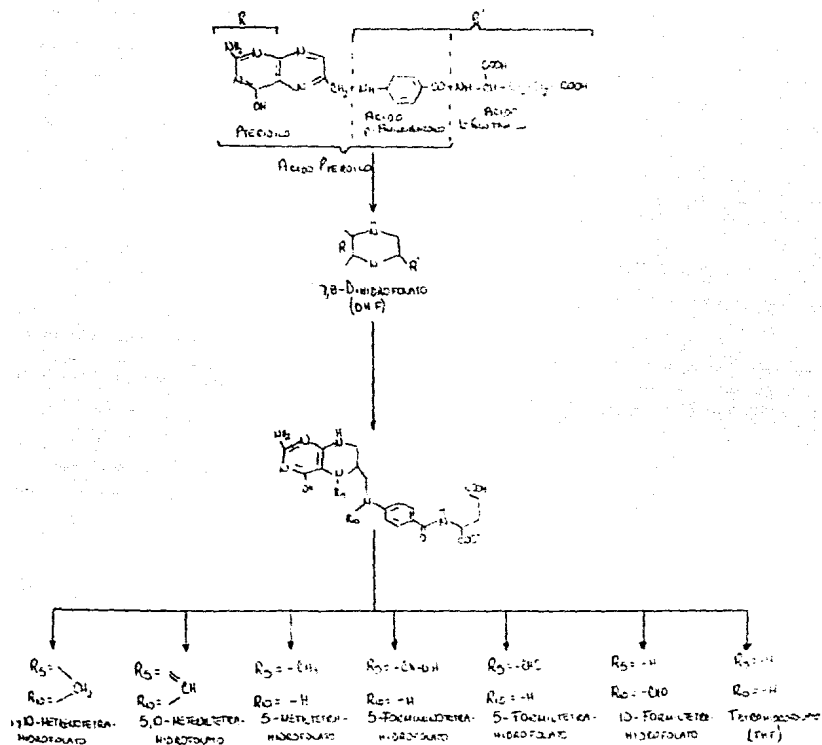


Figura No. 4: Estructura química y biotransformación del ácido fólico.



### b. Farmacodinamia.

1) Carencia de ácido fólico. En las anemias mecrocíticas megaloblásticas tales como la anemia perniciosa, la macrocitita tropical, síndromes de malabsorción, la anemia mecrocítica del embarazo y la megaloblástica infantil, el ácido fólico provoca el aumento del número de eritrocitos y disminución de su tamaño, aumento de la hemoglobina y desaparición de la hiperplasia megaloblástica de la médula ósea.

Si se comparan los efectos producidos por el ácido fólico con los de la vitamina B<sub>12</sub>, puede observarse que en las anemias megaloblásticas diferentes de la anemia perniciosa, la respuesta es superior al utilizar el ácido fólico, que actúa aun en casos en que la vitamina B<sub>12</sub> es ineficaz y produce siempre una remisión absoluta del cuadro, que se debe en estos casos a deficiencia de ácido fólico. En cambio, en la anemia perniciosa, los resultados hematológicos no son como con la vitamina B<sub>12</sub> y requieren dosis elevadas, lo importante es que el ácido fólico no tiene acción sobre las alteraciones neurológicas de la anemia perniciosa.

2) Procesos metabólicos. El ácido fólico interviene fundamentalmente en el transporte y transferencia metabólica de grupos químicos con un átomo de carbono como el grupo formilo y el grupo metilo (figura No. 4) este proceso lo realiza previa transformación en tetrahidrofolato, pasando antes por el dihidrofolato por intermedio de la enzima dihidrofolatorreductasa -en ambos pasos-, siendo el tetrahidrofolato capaz de aceptar aquellos grupos y formar coenzimas dadoras de formilo y metilo principalmente, de manera que estos son transferidos. En esta forma, el ácido fólico o folato interviene en la transformación y síntesis sobre todo de purinas y pirimidinas, esenciales para la síntesis

del ácido desoxirribonucleico y por ende de la eritropoyesis.

El ácido fólico interviene en la transformación y síntesis en el organismo de diversos metabolitos siendo los principales:

- Transformación de 5-aminoimidazol-4-carboximidorribótido en 5-formilamidimidazol-4-carboximidorribótido paso importante en la síntesis de las purinas, intervención principalmente del 10-formiltetrahidrofolato y la enzima transformilasa.
- Transformación de la glicinamidarribótido en formilglicinamidarribótido, paso importante en la síntesis de purinas, intervención del 5,10-meteniltetrahidrofolato y la enzima transformilasa.
- Transformación del ácido desoxiuridílico, la reacción más importante e indispensable en la síntesis de las pirimidinas, intervención del 5,10-metilenotetrahidrofolato y de la enzima timidilatosintetasa.
- Transformación del ácido  $\alpha$ -formiminoglutámico (procedente de la histidina) en ácido glutámico, intervención del 5-formiminotetrahidrofolato.
- Transformación de la glicina en serina y viceversa, intervención de 5,10-metilenotetrahidrofolato y la enzima hidroximetiltransferasa, así mismo correspondiente al metabolismo de los aminoácidos, y estos dos últimos procesos no son de gran importancia biológica.

La vitamina B<sub>12</sub> es necesaria para la síntesis de la base pirimidica uracilo, mientras que el ácido fólico cataliza la metilación de este último a timina. Por lo que el ácido fólico es necesario para la formación de ácido desoxirribonucleico. (figura No. 5)

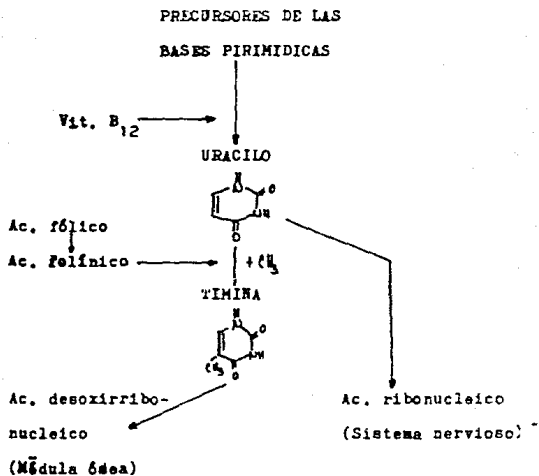


Figura No. 5: Intervención de la vitamina B<sub>12</sub> y el ácido fólico en el metabolismo de las nucleoproteínas (ácidos nucleicos).

### c. Farmacocinética.

1) Absorción y distribución. El ácido fólico se absorbe perfectamente cuando se administra por vía bucal o parenteral y la actividad es la misma por ambas vías, la absorción en el primer caso se efectúa en toda la extensión del intestino delgado.

Una vez absorbido, el ácido fólico a la sangre y el nivel de folato en el sueronormalmente 0.5 a 2mcg/dl, y menor en las anemias megaloblásticas distintas de la anemia perniciosa. En el plasma sanguíneo, la mayor parte del folato se encuentra en forma de 5-metiltetrahydrofolato y combinado con las proteínas.

2. Biotransformación y excreción. El ácido fólico se transforma primero en dihidrofolato, luego en tetrahydrofolato y éste último en las coenzimas activas (Figura 4) anteriormente señaladas. Dichas biotransformaciones tienen lugar en la pared intestinal y en los tejidos sobre todo en el hígado.

La excreción principal se efectúa por el riñón en forma de ácido fólico y sus metabolitos activos

3. Toxicidad. La sobredosis por ácido fólico no se conoce y aun 50 veces la dosis terapéutica no produce trastornos, siendo de por sí una sustancia prácticamente sin toxicidad.

Pero ya se ha señalado que en la anemia perniciosa, el ácido fólico es capaz de precipitar las alteraciones neurológicas. (1,2)

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se encuentra reportado un método espectrofotométrico (3, 4, 5, 24) para la cuantificación del ácido fólico en tabletas, el cual se fundamenta en la formación de una sal de diazotio y la copulación de la sal, así como la adición de una concentración de estándar igual a la muestra; que no es preciso, en las condiciones de trabajo existentes en el laboratorio, específicamente en reproducibilidad y repetibilidad.

Esto causa problemas en el laboratorio ya que pueden rechazar lotes que cumplen con la concentración establecida del ácido fólico por lo que hay pérdidas de tiempo hombre, materia prima, excipientes. Así como problemas con la secretaría de salud, debido a los resultados poco confiables. En cuanto al consumidor, si las tabletas contienen menor concentración de la establecida el cuadro clínico no se podría normalizar por la deficiencia del ácido.

Debido a lo anterior surge la necesidad de modificar y validar el método, eliminando la adición del estándar a cada una de las muestras como lo señala la literatura; para garantizar la confiabilidad de que las tabletas cubran con la concentración de ácido fólico específica.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. General

Adecuar y validar un método alternativo al reportado en las farmacopeas, para la determinación de ácido fólico en tabletas.

##### B. Particulares

1. Determinar:
  - a. Especificidad del método
  - b. Exactitud del método
  - c. Precisión del método
    - Repetibilidad
    - Reproducibilidad
  - d. Linealidad del método
  - e. Estabilidad de la muestra para la validación del método.

#### V. HIPOTESIS

Si el método analítico propuesto cumple con los parámetros estadísticos de precisión, exactitud, especificidad, linealidad y estabilidad podrá validarse y utilizarse en control de calidad como un método de rutina altamente confiable.

VI. MATERIAL Y METODOSA. Material1. PRINCIPIO ACTIVO Y EXCIPIENTES

Acido fólico (grado USP)  
Alcohol 96° (grado USP)  
Almidón de maiz (grado USP)  
Estearato de magnesio (grado USP)  
Lactosa (grado USP)  
Polivinilpirrolidona (grado USP)  
Talco (grado USP)

2. REACTIVOS

Acido clorhídrico 5N (grado reactivo; J.T. Baker)  
Alcohol isobutílico (grado reactivo; J.T. Baker)  
Cloruro de sodio (grado reactivo; J.T. Baker)  
Solución de diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (1:1000)  
(grado reactivo; Merck)  
Solución de fosfato de potasio dibásico 1:33 (grado reactivo;  
J.T. Baker)  
Solución de hidróxido de amonio 6N (grado reactivo; J.T. Baker)  
Solución de nitrito de sodio 1:50 (grado reactivo; J.T. Baker)  
Solución de permanganato de potasio 1:250 (grado reactivo;  
J.T. Baker)  
Solución de sulfamato de amonio 1:20 (grado reactivo; J.T. Baker)



3. MATERIAL

Bureta	50ml	Pyrex
Embudo de vidrio		Pyrex
Gradilla		
Matraz erlenmeyer	250ml	Pyrex
Matraz volumétrico	250ml	Pyrex
Matraz volumétrico	200ml	Pyrex
Matraz volumétrico	100ml	Pyrex
Matraz volumétrico	50ml	Pyrex
Mortero con pistilo		
Papel filtro Whatman	No. 41	
Pinza de tres dedos con nuez		
Pipeta volumétrica	10ml	Pyrex
Pipeta volumétrica	5ml	Pyrex
Pipeta volumétrica	4ml	Pyrex
Pipeta volumétrica	2ml	Pyrex
Pipeta volumétrica	1ml	Pyrex
Soporte universal		
Tripie		
Tubos de ensayo	60ml	Pyrex

4. INSTRUMENTOS

Balanza analítica (Mettler AM 100, sensibilidad 0.1mg)  
 Cronómetro (Gladox)  
 Espectrofotómetro (Beckman DU-55)  
 Karl-Fisher (Beckman KF4B)  
 Agitador de tubos (Mixer)

B. Método1. PREPARACION DE SOLUCIONES REACTIVOa. Acido clorhídrico (5N).

P.M. = 36.465gr/mol      Pureza: 37.5%      Densidad: 1.185gr/ml

Tomar 20.5ml de ácido clorhídrico, transferirlos a un matraz volumétrico de 50ml y aforar con agua destilada.

b. Solución de diclorhidrato de N-1-naftiletildiamina (1:1000).

Pesar 50mg de diclorhidrato de N-1-naftiletildiamina.

Transferir a un matraz volumétrico de 50ml. Disolver y aforar con agua destilada.

c. Solución de fosfato de potasio dibásico (1:33).

Pesar 30.3030gr de fosfato de potasio dibásico.

Transferir a un matraz volumétrico de 1000ml.

Disolver y aforar con agua destilada.

d. Solución de hidróxido de amonio (6N).

P.M. = 35.048gr/mol      Pureza: 29.4%      Densidad: 0.896gr/ml

Tomar 40.0ml de hidróxido de amonio, transferirlos a un matraz volumétrico de 50ml y aforar con agua destilada.

e. Solución de nitrito de sodio (1:50).

Pesar 1.0gr de nitrito de sodio.

Transferir a un matraz volumétrico de 50ml.

Disolver y aforar con agua destilada.

f. Solución de permanganato de potasio (1:250).

Pesar 0.2g de permanganato de potasio.

Transferirlos a un matraz volumétrico de 50ml.

Disolver y aforar con agua destilada.

Hervir la solución por 15min, y dejarla enfriar.

Filtrar por papel whatman No. 41

g. Solución de sulfamato de amonio (1:20).

Pesar 2.5gr de sulfamato de amonio.

Transferir a un matraz volumétrico de 50ml.

Disolver y aforar con agua destilada.

2. PREPARACION DE SOLUCION ESTANDAR

a. Preparación del patrón de referencia. Determinar el contenido de agua del patrón de referencia de ácido fólico como se indica a continuación:

Colocar de 30 a 40ml de metanol en el vaso de reacción y neutralizar el agua que pudiera contener con el reactivo de Karl-Fisher. Este gasto de reactivo no deberá tomarse en consideración para los cálculos. Rápidamente agregar una porción de la muestra exactamente pesada, agitar vigorosamente y titular con el reactivo de Karl-Fisher. Calcular el contenido de agua en por ciento en la muestra de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de agua} = 100S (F/P) \quad (\text{ec. } 6)$$

donde:

S = es el volumen de reactivo de Karl-Fisher

F = es el factor de equivalencia de agua del reactivo

P = es el peso de la muestra en mg. (3)

b. Solución concentrada. Pesar 25mg del patrón de referencia de ácido fólico y transferirlos a un matraz volumétrico de 50ml.

Disolver completamente con una mezcla de 1ml de hidróxido de amonio (6N) y 25ml de agua destilada. Aforar con agua destilada y mezclar.

Agregar 2 gotas de tolueno como conservador, guardar en un lugar frío, protegido de la luz.

c. Solución estándar. Transferir una alícuota de 2ml de la solución concentrada a un matraz volumétrico de 100ml, aforar con solución 1:33 de potasio dibásico y mezclar.

### 3. SOLUCION PROBLEMA

a. Solución de la muestra. Pesar 20 tabletas y calcular su peso promedio. Triturar hasta polvo fino. Pesar una cantidad de polvo lo más exacto posible a 50mg de ácido fólico y transferir a un matraz volumétrico de 250ml (identificarlo como matraz A).

En otro matraz volumétrico de 200ml (identificado como matraz B) agregar 2ml de hidróxido de amonio (6N), aforar con agua destilada. Disolver completamente con la solución del matraz B al ácido fólico del matraz A y homogenizar. Filtrar a través de papel whatman No. 41 en un matraz erlenmeyer, desechar los primeros 30ml del filtrado. Del segundo filtrado transferir una alícuota de 4ml a un matraz de 100ml, aforar con solución 1:33 de fosfato de potasio dibásico y mezclar.

La solución estándar y la solución de la muestra contienen 10mcg/ml aproximadamente de ácido fólico.

### 4. METODO PROPUESTO

Preparar 4 tubos de ensayo de 60ml, marcarlos como: blanco, estándar y 2 tubos de muestra. Adicionar a cada uno de los tubos, los volúmenes indicados en la tabla No. 1, respetando el orden y los tiempos de reposo requeridos. Utilizar pipetas volumétricas, para la adición de todos los reactivos líquidos excepto el alcohol isobutílico que se adiciona con bureta.

REACTIVOS	Beo	Std	Mta 1	Mta 2
Fosfato de potasio dibásico (1:33)	5ml	---	---	---
Estándar (10mcg/ml)	---	5ml	---	---
Muestra (10mcg/ml)	---	---	5ml	5ml
Permanganato de potasio (1:250)	1ml	1ml	1ml	1ml
Mezclar, reposo 3min.				
Nitrito de sodio (1:50)	1ml	1ml	1ml	1ml
Acido clorhídrico (5N)	1ml	1ml	1ml	1ml
Mezclar, reposo 3min.				
Sulfamato de amonio (1:20)	1ml	1ml	1ml	1ml
Agitar hasta eliminar el dióxido de nitrógeno				
Diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (1:1000)	1ml	1ml	1ml	1ml
Mezclar, reposo 10min.				
Cloruro de sodio	4gr	4gr	4gr	4gr
Mezclar				
Alcohol isobutílico	10ml	10ml	10gr	10gr

Tabla No.2: Orden de adición de reactivos y tiempos de reposo del método propuesto para la cuantificación de ácido fólico en tabletas.

Agitar vigorosamente en un agitador hasta que la fase colorida quede en la superficie (alcohol isobutílico).

Determinar la absorbancia de la fase colorida a una longitud de onda de 550nm.

**NOTA:** Ya que es demasiado inestable el complejo formado al agregar el diclorhidrato de N-1-naftiletildiazina, es necesario determinar la absorbancia de este antes de 25min.

**Cálculos:**

Calcular la cantidad en mg de ácido fólico de la porción tomada de tabletas por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{mg/tab} = \frac{\text{Asta}}{\text{Astd}} (C) (10) \frac{0.170\text{gr}}{\text{peso mta (g)}} \quad (\text{ec. 7})$$

dónde:

Asta = absorbancia de la muestra

Astd = absorbancia del estándar

C = concentración final del estándar hasta los 10ml de alcohol isobutílico

0.170gr = peso teórico de cada tableta

10 = factor de dilución de la muestra u conversión de mcg a mg de la concentración final del estándar

10 = Volumen final de la muestra

Alícuota de la mta (1000)

En la figura No. 6, se muestra la reacción que se lleva a cabo durante el método espectrofotométrico para la cuantificación del ácido fólico en tabletas.

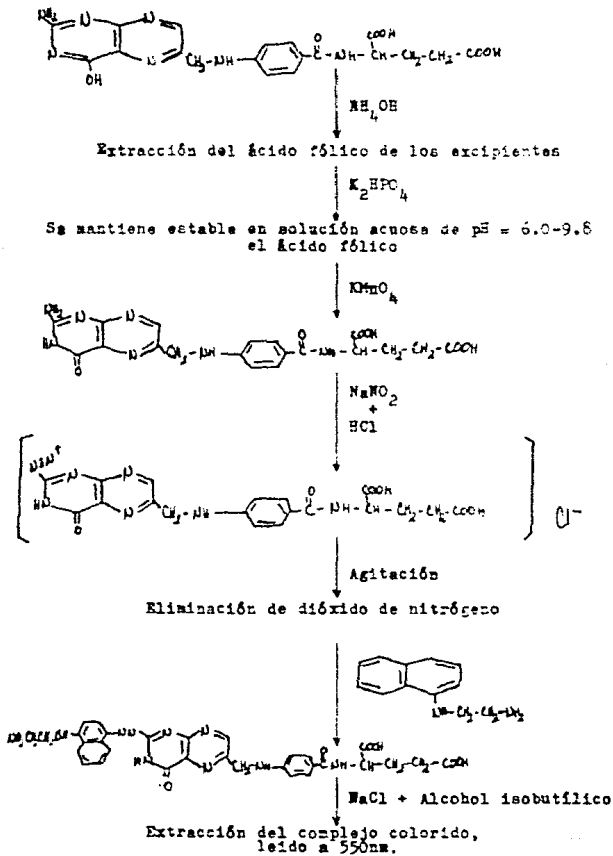


Figura No. 6: Reacción que se lleva a cabo en el método propuesto, para la cuantificación del ácido fólico en tabletas.

## VII. RESULTADOS

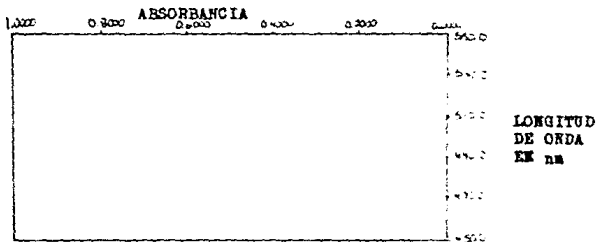
### A. Especificidad.

Para verificar la capacidad del método propuesto en la determinación del ácido fólico en tabletas, se enfrentó a los excipientes.

Por ser un método espectrofotométrico se presentan a continuación los espectros del producto (principio activo + excipientes), estándar y excipientes.

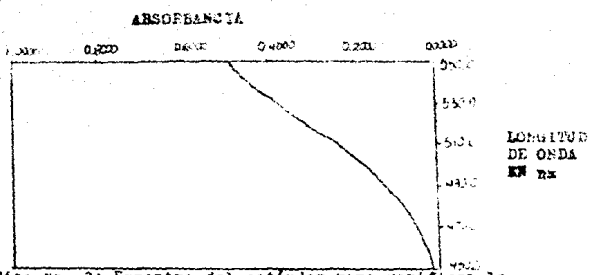
Excipientes	% de recobro	
	Estándar	Producto
0.0	99.99	100.10

Tabla No. 3: Resultados de especificidad del método para la cuantificación de ácido fólico en tabletas.

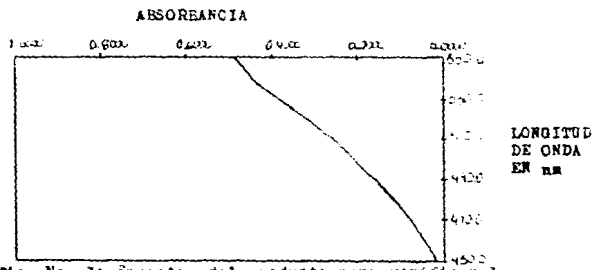


Gráfica No. 1: Espectro de los excipientes para verificar la capacidad del método propuesto en la determinación del ácido fólico en tabletas.





Gráfica No. 2: Espectro del estándar para verificar la capacidad del método propuesto en la determinación del ácido fólico en tabletas.



Gráfica No. 3: Espectro del producto para verificar la capacidad del método propuesto en la determinación del ácido fólico en tabletas.

### Exactitud.

Se realizó por placebo añadido: el ácido fólico de pureza conocida y exactamente recido, se añadió a las excipientes del producto, esto se analizó con el método propuesto.

Se trabajó con 3 concentraciones diferentes, por cada concentración se pesaron 6 muestras.

Muestra %	mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
80	40.4	40.3599	99.99
	40.0	40.0416	100.10
	40.6	40.6348	100.08
	40.2	40.2440	100.11
	40.4	40.3857	99.95
	40.6	40.5889	99.97
100	50.4	50.3783	99.95
	50.4	50.0890	99.37
	50.2	50.2733	100.14
	50.6	50.5124	99.63
	50.6	50.6513	100.10
	50.2	49.8604	99.32
120	60.4	60.2727	99.79
	60.8	60.8548	100.09
	60.4	60.5729	99.91
	60.6	60.4848	99.82
	60.2	60.2838	100.14
	60.0	59.9959	99.99

Tabla No. 4: Resultados para exactitud y repetibilidad.

- Contraste de hipótesis:

$$H_0 \mu = 100\%$$

$$H_a \mu \neq 100\%$$

- Decisión estadística:

$$n = 18$$

$$S = 0.2408$$

$$\bar{X} = 99.91\%$$

$$t_{(0.975, n-1)} = 2.1098$$

$$t_{\text{calc}} = -1.5183$$

$$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$$

$$-1.5183 < 2.1098$$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$99.88 < 99.91 < 99.93\%$$

E. Precisión.1. Repetibilidad:

Se utilizaron los resultados de la exactitud.

Muestra %	mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
30	40.4	40.3557	99.12
	40.0	40.0416	100.10
	40.6	40.6348	100.08
	40.2	40.2440	100.11
	40.4	40.3857	99.96
	40.6	40.5879	99.97
100	50.4	50.3763	99.95
	50.4	50.0870	99.37
	50.2	50.2738	100.14
	50.6	50.5124	99.63
	50.6	50.6513	100.10
	50.2	49.8604	99.32
120	60.4	60.2777	99.75
	60.8	60.8544	100.09
	60.6	60.5720	99.95
	60.6	60.4942	99.32
	60.2	60.2338	100.14
	60.0	59.9959	99.99

Tabla No. 5: Resultados para repetibilidad

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0: \bar{T} \leq 1.50$$

$$H_a: \bar{T} > 1.50$$

- Decisión estadística:

$$n = 18$$

$$S = 0.2468$$

$$\bar{x} = 99.9116$$

$$C.V. = 0.2470$$

$$x_{1\text{ calc}}^2 = 0.4603$$

$$x_{1\text{ (0.975, n-1)}}^2 = 30.2$$

$$x_{1\text{ calc}}^2 \leq x_{1\text{ (0.975, n-1)}}^2$$

$$0.4603 < 30.2$$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$0.4260 < 0.4603 < 0.4956$$

2. Reproducibilidad.

	DIA	
	I	II
A	100.34	99.95
H I	98.53	98.12
A	100.66	99.34
L	100.20	100.97
I	99.84	97.75
S	100.78	100.59
T II		
A		

Tabla No. 6: Resultados para reproducibilidad, en % de recobro.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	$F_{calc}$	$F_{tab}$	Area de Aceptación
Día	1	1.0931	1.0981	35.420	161.4	$F_{calc}$ $F_{tab}$
Analista	1	0.8480	0.8480	27.350	161.4	$F_{calc}$ $F_{tab}$
Día-Analista	1	0.0310	0.0310	0.022	5.32	$F_{calc}$ $F_{tab}$
Error	8	11.0176	1.3772	-----	-----	-----

Tabla No. 7: Análisis de varianza con 2 criterios de clasificación (día-analista).

Este parámetro se realizó por placebo añadido, con 2 analistas diferentes en dos días diferentes y 3 determinaciones por día cada analista. Los analistas no sabían la cantidad pesada de las muestras.

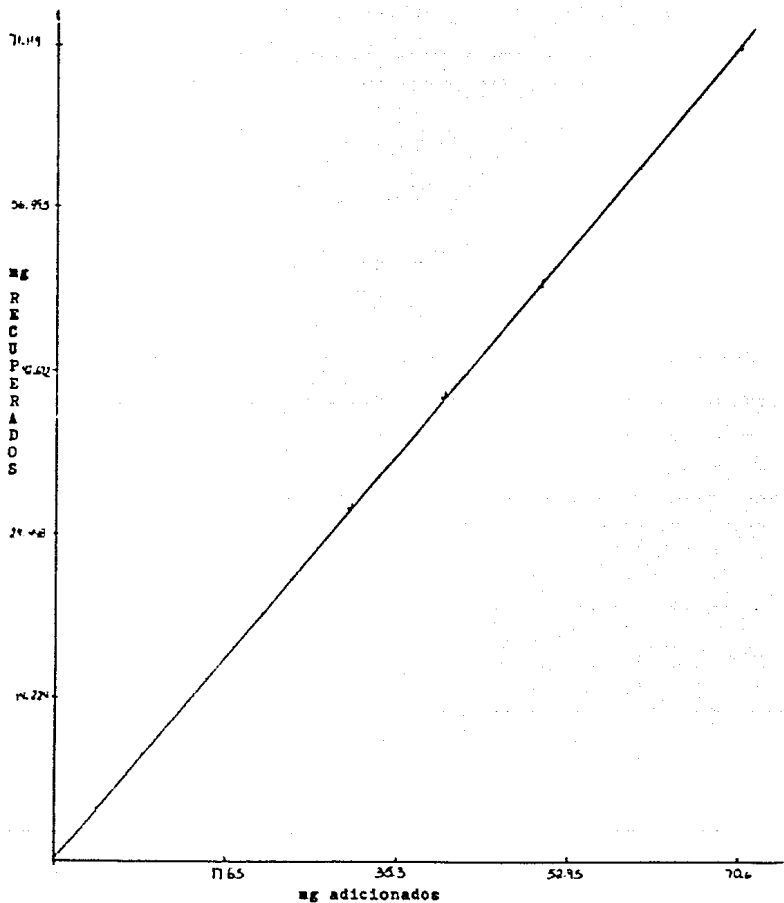
D. Linealidad.

Se realizó por placebo añadido: el ácido fólico de pureza conocida y exactamente pesado, se añadió a los excipientes del producto, esto se analizó con el método propuesto.

Se trabajó con 5 concentraciones diferentes, por cada concentración se analizaron 6 muestras.

Muestra %	mg adicionados	mg recuperados	% de recobro
60	30.8	30.7201	99.74
	30.8	30.9738	100.56
	30.4	30.5467	100.48
	30.8	30.5201	99.00
	30.8	30.8738	100.24
	30.6	30.5827	99.94
80	40.4	40.3624	99.90
	40.4	41.0050	101.49
	40.2	40.0841	99.71
	40.2	40.3841	100.45
	40.6	40.5548	100.13
	40.0	40.0000	100.00
100	50.2	49.9990	99.60
	50.2	50.0030	99.61
	50.4	50.1127	99.42
	50.4	50.5319	100.26
	50.6	50.6256	100.05
	50.2	50.0494	99.70
120	60.2	59.5933	98.99
	60.4	60.3852	99.97
	60.4	60.1620	99.60
	60.2	59.2309	99.47
	60.2	60.5081	100.51
	60.6	60.5708	99.95
140	70.4	70.6986	100.42
	70.4	70.9940	100.84
	70.6	70.7724	100.24
	70.6	70.7346	100.19
	70.8	70.7388	99.91
	70.8	70.6300	99.75

Tabla No. 6: Resultados para linealidad de 5 niveles de concentración con 6 repeticiones cada uno en la validación del método para la cuantificación de ácido fólico en tabletas.



Gráfica No. 4: Representación de la linealidad del método para la cuantificación de ácido fólico en tabletas.



- Evaluación de la ordenada al origen ( $\alpha$ ):

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 \alpha = 0$$

$$H_a \alpha \neq 0$$

- Decisión estadística:

$$\bar{X} = 50.4533$$

$$\bar{Y} = 50.4566$$

$$\alpha = -0.0242$$

$$t_{tab} = 2.0484$$

$$t_{calc} = -0.2555$$

$$t_{calc} \leq t_{tab}$$

$$-0.2555 < 2.0484$$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$-0.4469 < -0.2555 < 0.3985$$

- Evaluación de la pendiente ( $\beta$ ):

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 \beta = 1$$

$$H_a \beta \neq 1$$

- Decisión estadística:

$$\bar{X} = 50.4533$$

$$\bar{Y} = 50.4566$$

$$\beta = 1.0005$$

$$t_{tab} = 2.0484$$

$$t_{calc} = 0.0027$$

$$t_{calc} \leq t_{tab}$$

$$0.0027 < 2.0484$$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$-0.0092 < 0.0027 < 0.0146$$

- Coeficiente de correlación:

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9996$$

**K. Estabilidad de la muestra.**

Dada la inestabilidad de la muestra, como se indica en la página No. 34, el parámetro estabilidad de la muestra no fué realizado.

### VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La especificidad del método fue probada sometiendo excipientes, estándar y producto al método propuesto, presentando una absorbancia de cero los excipientes y una absorbancia similar entre el estándar y el producto, lo cual se puede observar en las gráficas No. 1,2,3.

La exactitud se trató con 3 concentraciones diferentes (80%, 100% y 120%), por cada nivel se pesaron 6 muestras como se muestra en la tabla No. 4. Se evaluó con el porcentaje recuperado, por medio de la evaluación estadística y comparando con el estadígrafo de contraste "t" de student, el método es exacto por ser menor  $t_{\text{calc}}$  que  $t_{\text{tab}}$  y la media cae dentro del intervalo de confianza.

En cuanto a la repetibilidad se utilizaron los resultados de la tabla No. 5, la evaluación estadística y el estadígrafo de contraste nos indica que el método es preciso debido a que  $Xi^2_{\text{calc}}$  es menor que  $Xi^2_{\text{tab}}$ .

La reproducibilidad del método se determinó realizando un análisis de varianza con 2 criterios de clasificación (día-analista). La tabla No. 6 muestra los porcentajes recuperados por 2 analistas en 2 diferentes días.

La tabla No. 7 muestra que no existe efecto por analista, no existe efecto por día, no existe efecto por la interacción día-analista por lo que se puede considerar al método propuesto como reproducible.

La tabla No. 8 muestra los resultados de linealidad del método donde se tabularon 10 (mg) adicionados y los (mg) recuperados repre-

sentados en la gráfica No. 4. Por los resultados obtenidos del valor de la ordenada al origen y de la pendiente se puede considerar al método como lineal.

### IX. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que el método evaluado es específico, exacto, repetitivo, reproducible y lineal.

Por lo anterior, el método espectrofotométrico (Folitab) propuesto para la cuantificación del ácido fólico en tabletas se puede utilizar en control de calidad como un método de rutina confiable.

BIBLIOGRAFIA

1. Litter, M.; "Farmacología experimental y clínica"; 7a edición; Editorial El Ateneo; Argentina; (1986)
2. Goodman y Gilman; "Las bases de la terapéutica"; 7a edición; Editorial Médica Panamericana; pag. 1257-1259; (1986)
3. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos; 5a edición; pag. 151-154; (1988)
4. USP XX; pag. 341-342, 921; (1980)
5. Martindale; "The Extra Pharmacopoeia"; 27a edición; The Pharmaceutical Press London; pag. 1685-1686; (1977)
6. Taylor, J.K.; "Validation of analytical methods"; Anal. Chem.; 55 (6) 600-608A (1983)
7. Fontani, F.; "Criteris di convalida del metodi d'analisi"; Boll. Chim. Farm.; 126 (2) 66-74, (1987)
8. Fictrzyk, D.J.; "Química Analítica"; 2a edición; editorial Interamericana; México, D.F.; pag. 48, 373-403 (1983)
9. Guerra, J.; "Validation of analytical methods by FDA laboratories"; Pharm. Tech.; 10 (3) 76-82 (1986)
10. Remington, R.L. y Schork, M.A.; "Estadística biométrica y sanitaria"; 2a edición; editorial Prentice/Hall Internacional; España pag. 250-263 (1977)

11. Cavenaghi, et. al; "Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of the medicines"; Drug Developments and Industrial; J. Pharmacy; 13 (14) 2571-2595 (1987)
12. Glaser, J.A.; "Guide for use of terms in reporting data"; Anal. Chem.; 47 (1) 2527 (1973)
13. Ayres, G.H.; "Análisis químico cuantitativo"; 2a edición; editorial Harla; Madrid; pag. 279-286, 299-327 (1970)
14. Connor, K.A.; "Curso de análisis farmacéutico, ensayo del medicamento"; 2a edición; Editorial Reverte; México, D.F.; pag. 52-72 (1980)
15. Martin, P.A.; "Métodos físicoquímicos de análisis"; Editorial Urso, S.A.; España; pag. 57-58 (1975)
16. Katty, M.B.; "Química analítica"; Editorial Alhambra Mexicana; México, D.F.; pag. 427-443 (1982)
17. Pecsok, R.L.; "Métodos modernos de análisis químicos"; editorial Limusa; México, D.F.; pag. 161-167 (1983)
18. Skoog, D.A.; "Análisis instrumental"; 2a edición; Nueva Editorial Interamericana, S.A.; México, D.F.; pag. 158-197 (1987)
19. Skoog, D.A.; "Fundamentos de química analítica"; editorial Reverte; Barcelona; pag. 737-757 (1981)
20. The Merck Index, Tenth Edition; pag. 602-603 (1983)

21. Clarke, E.; "Isolation and identification of drugs"; The Pharmaceutical Press London; pag. 349 (1969)
22. Higuchi, T.; "Pharmaceutical Analysis"; Chapter XI Vitamins; pag. 699-702 (1951)
23. Bowman, F.C.; "Farmacología"; 2a edición; Nueva editorial Interamericana, S.A.; México, D.F.; (1985)
24. British Pharmacopoeia (B.P.) pag. 257-258 (1988)



XI, APENDICEA. Exactitud

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 \mu = 100\%$$

$$H_a \mu \neq 100\%$$

- Evaluación estadística:

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X}\% - \mu}{S\% / \sqrt{n}}$$

- Decisión estadística:

$$\text{Si } t_{(0.025, n-1)} < t_{\text{calc}} < t_{(0.975, n-1)}$$

el método se considera exacto.

- Intervalo de confianza al 95%:

$$\bar{X}\% \pm t_{(0.975, n-1)} \frac{S\%}{\sqrt{n}}$$

B. Precisión.1. Repetibilidad.

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 \quad \bar{V} \leq 1.5\%$$

$$H_a \quad \bar{V} > 1.5\%$$

- Evaluación estadística:

$$X1_{\text{calc}} = \frac{(n-1) (S\%)^2}{\bar{V}^2}$$

- Decisión estadística:

$$\text{Si } X1^2_{\text{calc}} \leq X1^2(0.975, n-1)$$

el método se considera preciso en cuanto a repetibilidad.

Intervalo de confianza al 95%:

$$\frac{(n-1) S^2}{X1^2(0.025, n-1)} < T < \frac{(n-1) S^2}{X1^2(0.975, n-1)}$$

- Coeficiente de variación:

$$\% \text{ C.V.} = \frac{S\%}{\bar{X}_s} (100)$$

$$\% \text{ C.V.} \leq 1.5\%$$

## 2. Reproducibilidad:

- Matriz de tratamientos para reproducibilidad, cuando se utilizan 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

		DIA	
		I	II
ANALISTA I	A	$Y_{111}$	$Y_{211}$
	L	$Y_{112}$	$Y_{212}$
	S	$Y_{113}$	$Y_{213}$
ANALISTA II	A	$Y_{121}$	$Y_{221}$
	L	$Y_{122}$	$Y_{222}$
	S	$Y_{123}$	$Y_{223}$

a=2=1  
b=2=2  
r=3=3

### - Modelo matemático

$$Y_{ijk} = A_i + D_j + AD_{ij} + E_k(ij)$$

donde:

$Y_{ij}$ = porcentaje de recobro por el i-ésimo analista en el j-ésimo día en la k-ésima repetición.

$A_i$ = efecto del i-ésimo analista sobre el porcentaje de recobro.

$D_j$ = efecto del j-ésimo día sobre el porcentaje de recobro.

$AD_{ij}$ = efecto de la interacción analista-día.

$E_k(ij)$ = error experimental.

Tabla de Análisis de Varianza con dos criterios de clasificación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medida de cuadrados	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>	Área de aceptación
A <sub>i</sub> (Ma)	(a-1)	$\frac{Y_{i..}^2 - Y_{...}^2}{br \quad abr}$	$SC_A = \frac{Y_{i..}^2 - Y_{...}^2}{(i-1)}$	$MC_A \quad MC_{AD}$	$F_{0.95},$ $SL_A,$ $SL_{AD}$	$F_{calc_A} \quad F_{0.95}$
D <sub>j</sub> (Analista)	(b-1)	$\frac{Y_{.j}^2 - Y_{...}^2}{ar \quad abr}$	$SC_C = \frac{Y_{.j}^2 - Y_{...}^2}{(j-1)}$	$MC_D \quad MC_{AD}$	$F_{0.95},$ $SL_D,$ $SL_{AD}$	$F_{calc_D} \quad F_{0.95}$
AD <sub>ij</sub> (Analista-día)	(a-1) (B-1)	$\frac{Y_{ij}^2 - Y_{i..}^2}{r \quad br}$ $-\frac{Y_{.j}^2 - Y_{...}^2}{ar \quad abr}$	$SC_{AD} = \frac{Y_{ij}^2 - Y_{i..}^2}{(i-1)(j-1)}$	$MC_{AD} \quad MC_E$	$F_{0.95},$ $SL_{AD},$ $SL_E$	$F_{calc_{AD}} \quad F_{0.95}$
E <sub>k</sub> (ij) (Error)	(r-1)ab	$\frac{Y_{ijk}^2 - Y_{ij}^2}{r}$	$SC_E = \frac{Y_{ijk}^2 - Y_{ij}^2}{ij}$	—	—	—

C. Linealidad.1. Evaluación de la ordenada al origen (a):

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 a = 0$$

$$H_a a \neq 0$$

- Evaluación estadística:

$$t_{\text{calc}} = \frac{a - 0}{\widehat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

$$\widehat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - a \sum Y - n \sum XY}{n} \cdot \frac{n}{n-2}}$$

- Decisión estadística:

$$\text{Si } t(0.025, n-2) < t_{\text{calc}} < t(0.975, n-2)$$

se considera  $a = 0$  estadísticamente

- Intervalo de confianza al 95%:

$$a \pm t(0.975, n-2) \widehat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

2. Evaluación de la pendiente (m):

- Hipótesis a contrastar:

$$H_0 = m = 1$$

$$H_a = m \neq 1$$

- Evaluación estadística:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(n-1) S_{y/x} \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - a \sum Y - m \sum XY}{n}}$$

- Decisión estadística:

$$\text{Si } t(0.025, n-2) < t_{\text{calc}} < t(0.975, n-2)$$

se considera  $m = 1$  estadísticamente.

- Intervalo de confianza al 95%:

$$m \pm t(0.975, n-2) \frac{\widehat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Si ambas hipótesis, tanto para "a" como para "m" son aceptadas el método es lineal.

- Coeficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2 - \sum (Y_i - a - b) (X_i - \bar{X})^2}{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}$$