

24/95



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

Validación de un Método Analítico por  
Espectrofotometría para la cuantificación de  
Bromuro de Propantelina (Tabletas) en la  
Prueba de Disolución.

T E S I S

Que para obtener el Título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a  
**MARIA CIRENIA SANDOVAL LOPEZ**



México, D. F

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1988



## **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

	Página
1. Introducción .....	1
2. Fundamentación del tema .....	3
2.1 Validación	
2.1.1 Definición .....	3
2.1.2 Importancia .....	3
2.1.3 Factores involucrados .....	4
2.1.3.1 Especificidad .....	4
2.1.3.2 Exactitud .....	5
2.1.3.3 Precisión .....	6
2.1.3.4 Linealidad .....	10
2.1.3.5 Estabilidad de la muestra ...	12
2.2 Espectrofotometría ultravioleta-visible ...	13
2.2.1 Absorción y emisión de radiación electromagnética .....	13
2.2.2 Ley de Beer .....	14
2.2.3 Transiciones .....	15
2.2.4 Instrumental .....	16
2.3 Bromuro de propantelina .....	18
2.3.1 Propiedades físicas y químicas .....	18
2.3.2 Acción farmacológica .....	19
2.3.3 Métodos de análisis .....	19
3. Planteamiento del problema .....	21
4. Objetivos .....	22
5. Hipótesis .....	23
6. Material y método .....	24

## INDICE

Página

7. Resultados .....	34
8. Discusión de resultados .....	55
9. Conclusiones .....	58
10. Bibliografía .....	59

APENDICE

## 1. INTRODUCCION

El presente trabajo describe la validación de un método espectrofotométrico en la región ultravioleta y visible con el que se cuantifica bromuro de propantelina en tabletas después de la prueba de disolución, con el propósito de utilizarlo como alternativa, a la determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución, indicada en la farmacopea norteamericana (14).

Además, en el contenido de las páginas siguientes, se hace referencia a la importancia de la validación de métodos analíticos y se plantean los factores que involucra. También se presenta un marco teórico de la espectrofotometría en la región ultravioleta y visible; se especifican las características físicas y químicas del bromuro de propantelina y, se comentan otras vías de cuantificación del producto.

Reconociendo las necesidades que pueden presentarse en un laboratorio, el objetivo principal fue determinar si son confiables los resultados obtenidos en la cuantificación.

El método validado se basa en la extracción por par iónico del bromuro de propantelina y naranja de metilo con cloruro de metileno. El método y el material se presentan en el capítulo 6.

Los resultados se evaluarón estadísticamente para concluir que el método es específico, preciso, exacto y lineal. Asimismo, se estableció que el método espectrofotométrico que detecta el bromuro de propantelina en la prueba de disolución es confiable.

## 2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### 2.1 Validación

2.1.1 Definición. La validación de métodos analíticos, es el proceso que determina la aceptabilidad de una metodología para dar datos analíticos útiles, los cuales son confiables, reproducibles y no dan falsos positivos.

La manera clásica para la validación de un método analítico es analizar muestras de referencia, que son similares a muestras problema, comparando los resultados para dar valores certificados.

La validación utiliza métodos de placebo cargado, los cuales pueden ser usados como referencia para determinar la exactitud de ensayos producidos.

El placebo cargado es una mezcla de excipientes más el principio activo (7).

2.1.2 Importancia. La validación es un interés de la industria farmacéutica por el aumento de nuevos productos relacionados con la salud y los cuales requieren de métodos de análisis apropiados.

Por medio de una validación se pueden detectar errores. Un método analítico está sujeto a dos tipos de error, el sistemático y el aleatorio. El primero es el que da lugar a medidas incorrectas que pueden ser asignadas a una causa específica (3).

Las causas del error son las siguientes:

- Instrumental
- Metodología
- Operación
- Analista

La evaluación se hace por medio del recobro experimental obtenido de un placebo cargado el cual evalúa el error sistemático constante, que es independiente de la cantidad de fármaco presente en la muestra.

Otro procedimiento es la linealidad, la cual evalúa el error proporcional, que es dependiente de la cantidad de fármaco presente en el placebo.

El error aleatorio da lugar a medidas imprecisas, éste permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático ( 3 ).

2.1.3 Factores involucrados. La validación de métodos es un juicio de valores donde los parámetros de éste son evaluados para determinar la confiabilidad de los dacos analíticos.

2.1.3.1 Especificidad. En el análisis de productos farmacéuticos es necesario verificar la capacidad del método para determinar el principio activo, sin que exista interferencia por parte de otro fármaco, de excipientes, de impurezas o de productos de degradación ( 6 ).



2.1.3.2 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 (9).

La exactitud se refiere a que en un mínimo de diez determinaciones para placebo cargado, a la misma cantidad de fármaco, el valor que se obtenga sea equivalente estadísticamente al valor real (100 %).

Los resultados se evalúan en porcentaje de recuperación, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100 = \text{porcentaje de recuperación}$$

Se calculan los siguientes terminos:

- Suma de cuadrados de % recuperado ( $\sum Y^2$ )
- Suma de porcentaje recuperado ( $\sum Y$ )
- Media aritmética ( $\bar{Y}$ )
- Desviación estandar del porcentaje recuperado (S)
- Se determina en la tabla de distribución de "t" de student el valor teórico con n-1 grados de libertad y nivel de significancia de 0.975
- Se calcula el intervalo de confianza para el porcentaje de recobro (IC)

$$IC = \bar{Y} \pm t(n-1, 0.975) \frac{S}{n^{1/2}}$$

- Se calcula el valor de "t" de student

$$t = \frac{(\bar{Y} - 100)(n)^{1/2}}{S}$$

- Se compara el valor de "t" calculada con "t" de tablas

Si  $t \geq t(n-1, 0.975)$  el método no es exacto

Si  $t < t(n-1, 0.975)$  el método es exacto

2.1.3.3 Precisión. Es una medida de la reproducibilidad de las determinaciones. Significa que con el método que se esta validando, se obtenga estadísticamente un mismo resultado las veces que se haga la determinación de una cantidad constante, que puede ser bajo las mismas condiciones (repetibilidad) o bien bajo diferentes condiciones (reproducibilidad).

Sin embargo, una buena precisión no significa buena exactitud, ya que es posible cometer una y otra vez el mismo error (9).

El estudio de precisión se hace mediante un diseño completamente al azar. Los cuales son aquellos en los que las condiciones de análisis se asignan en forma aleatoria a las muestras de análisis (placebo cargado, producto terminado, proceso).

Las condiciones de análisis son determinadas por el diseño de tratamientos en el cual se fija el número de factores y los niveles de cada factor que se desean estudiar.

Para la evaluación de precisión son necesarios los conceptos siguientes:

Variable de respuesta. Es la variable que se va a medir en el experimento (recobro experimental, valoración).

Factor. Es la variable que va a ser controlada para determinar si afecta a la variable de respuesta (analista, día, equipo).

Niveles del factor. Son las clasificaciones de éste dentro del experimento (2 o más días, 2 o más analistas, 2 o más equipos).

Tratamiento. Es un conjunto particular de nivel(es) de factor(es) a evaluar experimentalmente (analista, día, equipo).

El modelo estadístico para el estudio de precisión es el siguiente:

$$Y_{ijk} = M + A_i + D_j(i) + E_{k(ij)}$$

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

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

$D_j(i)$  = efecto del j-ésimo día en el i-ésimo analista sobre el recobro experimental  $j = 1 \dots d$

$E_{k(ij)}$  = error experimental  $k = 1 \dots r$

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

TABLA No. 1 Análisis de la varianza para el modelo de precisión

fuentes de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media cuadrática	F <sub>calc.</sub>
A <sub>i</sub>	a-1	$\frac{\sum Y_{i..}^2}{dr} - \frac{Y^2}{adr}$	SC <sub>A</sub> /g <sub>1A</sub>	MC <sub>A</sub> /MC <sub>D</sub>
D <sub>j(i)</sub>	(d-1)a	$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum Y_{i.}^2}{dr}$	SC <sub>D</sub> /g <sub>1D</sub>	MC <sub>D</sub> /MC <sub>E</sub>
E <sub>k(ij)</sub>	(r-1)ad	$\frac{\sum \sum \sum Y_{ijk}^2}{r} - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{dr}$	SC <sub>E</sub> /g <sub>1E</sub>	

A= Analista

SC= Suma de cuadrados

D= Día

MC= Media cuadrática

2.1.3.4 Linealidad. Esta definida como la variación de la cantidad de fármaco recuperado por el método, como una función de la cantidad de fármaco presente en el placebo cargado (7).

Cuando se valida un método de análisis es necesario verificar que se obtengan resultados que se relacionen linealmente a diferentes concentraciones.

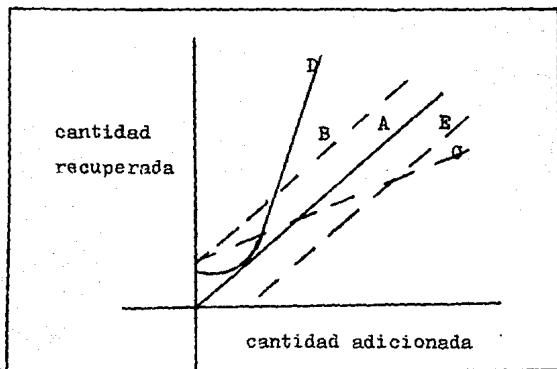


Figura No.1: Recobros experimentales que muestran los errores proporcionales. Línea A situación ideal, B presenta error sistemático, C muestra error consistente, D muestra un método no lineal .

La figura No.1 muestra la relación de recobros experimentales donde la línea A representa una situación ideal, es decir, sin error proporcional, teniendo una pendiente de uno y una ordenada al origen de cero, la línea B

muestra una situación semejante, pero con un aumento en la cuantificación (recobros), teniendo un error sistemático constante equivalente a la cantidad adicionada, la línea C muestra un error consistente donde la pendiente es diferente de uno, al igual que la ordenada al origen de cero, la línea D es un ejemplo típico de un método no lineal, la línea E tiene un error constante y muestra que puede ser lineal pero inadecuado para ensayos de baja concentración.

Linealidad del método de medición. Es la relación que se establece mediante una línea recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada).

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

Linealidad del sistema de medición. Es la relación que se establece mediante una línea recta entre una propiedad física, química o biológica con la cantidad de fármaco.

Los criterios para considerar un método o sistema lineal son los siguientes:

$$b \approx 0$$

$$m \approx 0.99$$

$$r^2 \approx 0.98$$

Para verificar la linealidad se hace con ayuda del análisis de la varianza (ANADEVA) o prueba de F (3).

TABLA No.2 Análisis de la varianza para la linealidad

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media cuadrática	F <sup>calc.</sup>
Regresión	1	$b\sum Y + m\sum XY - \frac{(\sum Y)^2}{n}$	SCR/1	MCR/MCER
Error de regresión	n-2	$\sum Y^2 - (b\sum Y + m\sum XY)$	SCER/n-2	
Falta de ajuste	$E_{reg} - E_{puro}$	$SC_{E_{reg}} - SC_{E_{puro}}$	$\frac{SC_{FA}}{gl_{FA}}$	$\frac{MC_{FA}}{MC_{EP}}$
Error puro	(r-1)c	$\frac{\sum Y_i^2}{r}$	$\frac{SC_{EP}}{(r-1)c}$	

E= Error

SCR= Suma de cuadrados de regresión

SCER= Suma de cuadrados de error de regresión

SCR= Suma de cuadrados de regresión

MCR= Media de cuadrados de regresión

MCER= Media de cuadrados del error de regresión

2.1.3.5 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 químico o físico se establece la condición de almacenamiento para las muestras preparadas.

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.



2.2 Espectrofotometría ultravioleta-visible. La absorción y emisión de energía radiante que realizan las moléculas y los átomos constituyen el fundamento de muchos procedimientos en química analítica.

La posición de una absorción o emisión se expresa mediante tres unidades diferentes; longitud de onda, frecuencia y energía. La unidad de la longitud de onda,  $\lambda$ , es el cm, subdividido en milimicras ( $m\mu = 10^{-7}$  cm), nanómetros ( $nm = 10^{-7}$  cm), angstroms ( $\text{\AA} = 10^{-8}$  cm) y micrómetros ( $\mu m = 10^{-4}$ ). La unidad de frecuencia es el ciclo por segundo (Hz) y las unidades de energía son el electrovoltio (eV, Kev, meV), la caloría (cal, Kcal), el número de ondas ( $cm^{-1}$ ) y el ergio.

2.2.1 Absorción y emisión de radiación electromagnética. 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.

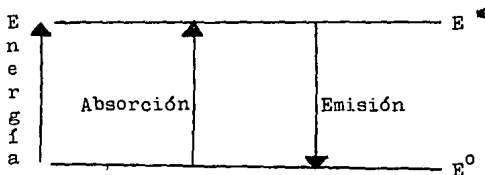


Figura No.2 Diagrama de niveles de energía:  $E^0$  nivel energético bajo;  $E^*$  nivel energético alto .

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 de  $E^0$  al de  $E^*$ . 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 (7,5).

2.2.2 Ley de Beer. La espectrofotometría analítica cuantitativa se basa en dos leyes fundamentales. Estas se refieren al cambio de energía radiante de un haz de luz monocromática al variar el camino óptico de la muestra,  $b$ , y la concentración de la muestra,  $c$ .

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 esta definida como:

$$A = -\log P/P_0$$

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 lu-

minosa, transmitida en una forma logarítmica similar a la ley anteriormente mencionada.

$$\ln (P/P_0) = -k'c$$

$k'$  está relacionada con la intensidad de absorción.

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

$$A = kbc$$

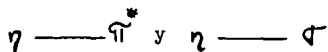
donde  $k$  es la absorptividad de la muestra,  $b$  es el camino óptico y  $c$  es la concentración.

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 (7).

**2.2.3 Transiciones.** La transición ocurre cuando un electrón es promovido de un orbital lleno a uno vacío. Las transiciones electrónicas en moléculas orgánicas casi siempre implican de tipo  $\eta$ ,  $\sigma$  y  $\pi$ .

Los electrones  $\sigma$  se localizan en los enlaces  $\sigma$ ; un ejemplo es el enlace de valencia simple entre dos átomos de carbono de un hidrocarburo saturado.

Los electrones  $\eta$  son electrones no enlazantes que se encuentran en átomos como N, O, halógenos o S. Estos pueden sufrir dos tipos de transiciones:



Los enlaces no saturados sbarcan cuatro electrones, dos  $\pi$  y dos  $\sigma$ .

Los grupos orgánicos que sufren transiciones  $\eta \longrightarrow \pi^*$  y  $\pi \longrightarrow \pi^*$  se clasifican cromóforos (grupos productores de

color).

Muchas sustancias inorgánicas son transparentes a la radiación visible y UV sin embargo, con ligandos adecuados puede transformarse en complejos que absorban en esas regiones.

La mayoría de los ligandos son moléculas orgánicas, por lo que se observan transiciones tales como:  $n \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , todas en las regiones UV y visible.

2.2.4 Instrumental. Todo espectrofotómetro de UV y visible esta formado de los siguientes componentes:

Fuente de radiación  $\rightarrow$  Monocromador  $\rightarrow$  Area de muestra  $\rightarrow$  Detector  $\rightarrow$

Amplificador  $\rightarrow$  Registrador

1- Fuente de radiación. Dos fuentes de radiación son necesarias para cubrir el rango UV-visible, una lámpara de tungsteno es una buena fuente de radiación para la región visible, en la región UV, la fuente de energía más usual es una lámpara de descarga de deuterio o hidrógeno.

2- Monocromador. Este dispositivo se utiliza para convertir la radiación policromática en una forma monocromática adecuada.

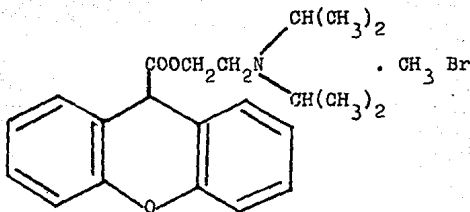
El mecanismo de dispersión controla el carácter monocromático de la radiación que incide sobre la muestra. Los mecanismos de dispersión más comunes son los prismas y las redes, se pueden emplear al efectuar un espectro de barrido.

3- Area 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.

4- Detector. En los espectrofotómetros de UV-VIS se emplean dispositivos electrónicos que se conocen como fototubos y fototubomultiplicadores, para detectar la intensidad de radiación transmitida por la muestra.

5- 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, y el propio instrumento explora el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva absorbancia-longitud de onda.

2.3 Bromuro de propantelina, 2-propanamina, N-metil-N-(1-metil etil)-N-(2-((9H-xanteno-9-carbonil)oxi)etil) bromuro. La estructura química es la siguiente:

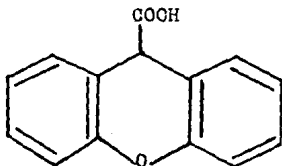


P.M. 448.42 g

2.3.1 Propiedades físicas y químicas. El bromuro de propantelina es un polvo blanco, cristalino, de sabor amargo, con punto de fusión de 159-161°C.

Muy soluble en agua, alcohol y cloroformo, prácticamente insoluble en éter y benceno.

Es inestable al medio ambiente, sufre hidrólisis degradándose a ácido xantanoico, la estructura química es la siguiente (15).



2.3.2 Acción farmacológica. El bromuro de propantelina es un agente anticolinérgico derivado del amonio cuaternario, es efectivo tanto para disminuir las secreciones, como para inhibir los espasmos y la movilidad intestinal y gástrica, de las vías biliares y urinarias. Por su intensa acción antiespasmódica, el bromuro de propantelina, alivia rápidamente el dolor causado por gastritis y úlcera péptica al reducir la secreción gástrica, si se administra en forma continua y por tiempo suficiente, se facilita la curación de la mucosa gastro-duodenal.

La toxicidad es baja, ya que en las ratas la dosis letal media (DL50) por vía oral es de 620 mg por kg lo cual equivaldría aproximadamente a unos 30 a 40 g para el hombre (1).

El bromuro de propantelina se presenta en tabletas de 15 mg la dosis en la mayoría de los casos basta administrar una tableta cada 6 horas.

2.3.3 Métodos de análisis. El bromuro de propantelina esta formado por un compuesto cuaternario de amonio y un carboxílico xanteno.

Una de las formas de detectar las sales cuaternarias de amonio es por medio fotométrico utilizando hexanitrodifenilamina, con la cual forman un complejo el cual puede ser extraído con cloruro de metileno (11).

Indicadores como el verde de bromocresol forman alternativas para la determinación absorptométrica de sales de amonio en solución acuosa extraídas por un solvente (8).

Otra forma de analizarlo es por cromatografía de líquidos de alta resolución (14).

El método validado para la determinación de bromuro de propantelina es por espectrofotometría UV-VIS en el cual utilizando naranja de metilo en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0, se forma un compuesto colorido entre el bromuro de propantelina y el naranja de metilo, el cual se extrae utilizando cloruro de metileno (4), este método de extracción es por par iónico.



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El bromuro de propantelina es un fármaco que se cuantifica en muestras de disolución por cromatografía de líquidos de alta resolución de acuerdo a la farmacopea USP XXI (14) , el cual es un método que necesita de equipo especial para poder realizarlo, por esta razón se estableció la necesidad de validar un método alternativo que permita cuantificar por espectrofotometría UV-VIS el bromuro de propantelina.

#### 4. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron determinar:

- 1- Especificidad del método analítico
- 2- Linealidad del sistema
- 3- Exactitud
- 4- Linealidad del método analítico
- 5- Precisión del método analítico
- 6- Estabilidad de la muestra

## 5. HIPOTESIS

Un método analítico es válido si cumple con las características de precisión, exactitud, linealidad y especificidad, por lo que el método para la cuantificación de bromuro de propantelina se dice que es válido si cumple con las características mencionadas.

## 6. MATERIAL Y METODO

### Material:

- Matraces volumétricos de 100 ml
- Matraz volumétrico de 200 ml
- Embudos de tallo corto para filtración
- Pipetas volumétricas de 10 ml
- Matraces volumétricos de 50 ml
- Bureta de 50 ml
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensaye de 50 ml
- Gradilla
- Papel Whatman No. 41

### Equipo:

- Balanza analítica digital Sartorius tipo 2403
- Balanza granataria Mettler PC 180
- Espectrofotómetro SP3-400 UV/VIS PYE UNICAM
- Refrigerador IEM Westinghouse 705
- Potenciómetro Conductronic pH 20

### Sustancias:

- Bromuro de propentelina grado farmacéutico (Vita Drog.)
- Fosfato de potasio monobásico (Productos Químicos Monterrey)
- Cloruro de metileno (J.T. Baker)
- Naranja de metilo (J.T. Baker)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
- Agua deionizada

Soluciones preparadas según USP XXI(14) utilizadas en la validación del método analítico.

Solución de fosfato de potasio monobásico 0.2 M :

Se disolvió 27.22 g de fosfato de potasio monobásico en agua y se diluyó a 1000 ml.

Solución de hidróxido de sodio 0.2 M :

Se pesó 0.8 g de hidróxido de sodio, se disolvió en agua y se diluyó para 100 ml.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 :

Se transfirieron 50 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico 0.2 M en un matraz volumétrico de 200 ml, y se adicionaron 46.1 ml de la solución de hidróxido de sodio 0.2 M .

Una vez preparada la solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0, se ajustó el pH en el potenciómetro con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 0.1 N, teniendo un rango de variación de  $\pm 0.02$  .

Solución de naranja de metilo al 3.7 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 :

Se pesó 3.7 mg de naranja de metilo y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvió y aforó con solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 .

En el siguiente diagrama de flujo se muestra la metodología analítica a validar

Se prepara una solución de bromuro de propantelina a 16.6 mg/ml con placebo. (A)

Filtrar la solución

Transferir 10 ml del filtrado (A) a un matraz de 100 ml y aforar (B).

Transferir 10 ml de (B) a un matraz de 50 ml volumétrico y adicionar 10 ml de solución de naranja de metilo en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0 .

Reposar 10 min.

Adicionar 20 ml de cloruro de metileno y reposar 10 min.

Separar la fase acuosa, filtrar la fase orgánica y leerla al espectro a 420 nm.

### 6.1 Especificidad

El bromuro de propantelina es un fármaco que se hidroliza fácilmente, dando como producto de degradación ácido xantanoico, por lo que la especificidad se realizó para verificar que no había interferencia debido a éste, así como al placebo.

#### Método:

- 1- Se pesaron 16.6 mg de bromuro de propantelina y se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 2 ml de hidróxido de sodio 0.1 N, se calentaron hasta sequedad, se les agregó agua aproximadamente 40 ml, se agitaron hasta disolver, se les agregó agua hasta la marca del aforo y se mezclaron.
- 2- Se pesaron 260.1 mg de placebo por triplicado, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 40 ml de agua aproximadamente, se agitó hasta disolver, se aforaron y mezclaron cada uno de los matraces.
- 3- Se pesaron 16.6 mg de bromuro de propantelina y se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se les agregó agua, aproximadamente 40 ml, se agitaron, se disolvieron, se aforaron y se mezclaron cada uno de los matraces.
- 4- Se filtró el contenido de los matraces a través de papel whatman No.41, eliminando los primeros mililitros de cada uno.
- 5- Se transfirieron 10 ml de cada matraz a matraces volu

métricos de 100 ml, adicionando agua hasta la marca del aforo seguido de agitación.

- 6- Se transfirieron 10 ml de cada matraz a matraces volumétricos de 50 ml y se les adicionó 10 ml de naranja de metilo al 3.7 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0, se dejaron reposar 10 min, se les adicionó 20 ml de cloruro de metileno con ayuda de una bureta y se agitaron manualmente por un min.
- 7- Se transfirieron a tubos de ensaye y se dejaron reposar 10 min.
- 8- Se separó la fase acuosa con ayuda de una pipeta graduada y una Pasteur, se filtraron las fases orgánicas con papel whatman No.41 desechando los primeros mililitros del filtrado.
- 9- Se leyeron las muestras a una longitud de onda de 420 nm en el espectrofotómetro, usando el cloruro de metileno como blanco.
- 10-Para asegurar la degradación del bromuro de propantelina, se hizo una cromatografía en capa fina, usando silica gel GF<sub>254</sub> utilizando placas de vidrio de medida 2.5 X 7 cm.  
Se pesaron 16.6 mg de bromuro de propantelina y se le adicionó 2 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y se llevaron a 10 ml con metanol, una vez evaporada la muestra a sequedad, se aplicaron 50  $\mu$ l en la placa y se eluyo en metanol-ác. fórmico-agua (75:10:15), una vez eluida se reveló con lámpara de luz U.U.



## 6.2 Linealidad del sistema de medición

- 1- Se pesó 33.2 mg de bromuro de propantelina, se transfirió a un matraz volumétrico de 200 ml, se agregó agua para disolver y se llevó a la marca del aforo seguido de agitación.
- 2- Se filtró el contenido del matraz a través de papel filtro wathman No.41, eliminando los primeros mililitros.
- 3- Se tomaron por triplicado las siguientes partes alícuotas; 6, 8, 10 y 12 ml, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó agua hasta la marca del aforo y se agitó.
- 4- Se transfirieron 10 ml de cada matraz a matraces volumétricos de 50 ml, se les adicionó a cada uno 10 ml de naranja de metilo en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0, se dejarón reposar 10 min, se les adicionó 20 ml de cloruro de metileno con ayuda de una bureta y se agitarón manualmente durante un minuto, se transfirieron a tubos de ensaye, se dejaron separar las fases reposando durante 10 minutos.
- 5- Se separó la fase acuosa con ayuda de una pipeta graduada y una Pasteur, se filtró la fase orgánica a través de papel Whatman No.41, desechando los primeros mililitros del filtrado, se determinó la absorbancia de la fase orgánica a 420 nm en el espectrofotómetro, utilizando cloruro de metileno como blanco.

### 6.3 Exactitud

- 1- Se pesó 16.6 mg de bromuro de propantelina y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se adicionó 260.1 mg de placebo, se agregó agua para disolver y se llevó a la marca del aforo seguido de agitación.
- 2- Se filtró el contenido del matraz eliminando los primeros mililitros.
- 3- De la solución anterior se transfirieron 10 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, se adicionó agua hasta la marca del aforo y se agitó.
- 4- Se transfirieron 10 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml, se adicionó 10 ml de naranja de metilo (al 3.7 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0), y se dejó reposar 10 min, se adicionó 20 ml de cloruro de metileno y se agitó manualmente durante un minuto, se transfirió a un tubo de ensaye y se dejó reposar 10 min.
- 5- Se separó la fase acuosa con ayuda de una pipeta graduada y una Pasteur, se filtró la fase orgánica, desechando los primeros mililitros y se determinó la absorbancia del filtrado a 420 nm en el espectrofotómetro, utilizando cloruro de metileno como blanco.
- 6- Se realizó una solución estándar siguiendo los pasos 1, 2, 3, 4 y 5.
- 7- Se efectuó 1, 2, 3, 4 y 5 por dectuplicado.

#### 6.4 Linealidad del método analítico.

- 1- Se pesaron 10 mg de bromuro de propantelina por triplicado, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 260.1 mg de placebo.
- 2- Se pesaron 13.3 mg de bromuro de propantelina por triplicado, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 260.1 mg de placebo.
- 3- Se pesaron 16.6 mg de bromuro de propantelina por triplicado, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 260.1 mg de placebo.
- 4- Se pesaron 19.9 mg de bromuro de propantelina por triplicado, se transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó a cada uno 260.1 mg de placebo.
- 5- Se agregó agua para disolver a 1, 2, 3 y 4, se llevaron hasta la línea de aforo y se agitaron.
- 6- Se filtró cada una de las soluciones anteriores a través de papel Whatman No. 41.
- 7- Se transfirió 10 ml de cada solución a matraces volumétricos de 100 ml, se adicionó agua hasta la línea de aforo y se agitó.
- 8- Se transfirió 10 ml de cada solución a matraces volumétricos de 50 ml, se adicionó 10 ml de naranja de metilo (al 3.7 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0), se dejó reposar 10 min, se adicionó 20 ml de cloruro de metileno, y se agitó manualmente

durante un minuto, se transfirieron las soluciones a tubos de ensaye y se dejaron reposar 10 minutos.

- 9- Se separó la fase acuosa, se filtraron las fases orgánicas y se determinó la absorbancia a 420 nm, utilizando cloruro de metileno como blanco.
- 10- Se preparó una solución estándar siguiendo los pasos 3, 5, 6, 7, 8 y 9.

#### 6.5 Precisión

- 1- Se pesó 16.6 mg de bromuro de propantelina y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se adicionó 260.1 mg de placebo, se disolvió en agua, se llevó a la marca de aforo y se agitó.
- 2- Se filtró la solución anterior a través de papel whatman No. 41 desechando los primeros mililitros.
- 3- Se transfirió 10 ml de la solución a un matraz de 100 ml, se adicionó agua hasta aforo y se agitó.
- 4- Se transfirió 10 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml, se adicionó 10 ml de naranja de metilo (al 3.7 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.0) dejando reposar 10 min, se adicionó 20 ml de cloruro de metileno con ayuda de una bureta, se agitó manualmente durante un minuto y se transfirió a tubos de ensaye dejando reposar 10 min.
- 5- Se separó la fase acuosa, se filtró la fase orgánica y se determinó la absorbancia a 420 nm, utilizando

cloruro de metileno como blanco.

- 6- Se preparó una solución estándar siguiendo los pasos 1, 2, 3, 4 y 5.
- 7- Se efectuó 1, 2, 3, 4, 5 y 6 por triplicado por dos diferentes analistas y dos diferentes días.

#### 6.6 Estabilidad de la muestra

- 1- La metodología es la misma que en precisión, siguiendo los pasos 1, 2, 3, 4 y 5 hasta la separación de la fase acuosa, se filtró la fase orgánica depositandola en tubos de ensaye.
- 2- Se realizó lo anterior 12 veces.
- 3- Se taparon los tubos con papel aluminio para evitar evaporación, se colocaron 6 tubos en luz blanca, 6 en obscuridad y 6 en refrigeración.
- 4- Se determinaron las absorbancias inicialmente y a las 6, 9 y 24 horas de 2 muestras diferentes de cada condición, a 420 nm utilizando como blanco cloruro de metileno y comparando contra una solución estándar recién preparada para cada lectura a diferente tiempo.

7. RESULTADOS

Resultados de especificidad

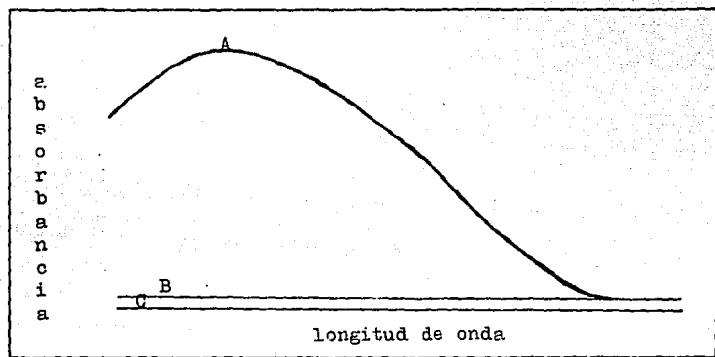


Figura No.3 Gráfica que muestra la especificidad del método, (A) bromuro de propantelina, (B) bromuro de propantelina degradada, (C) placebo de bromuro de propantelina.

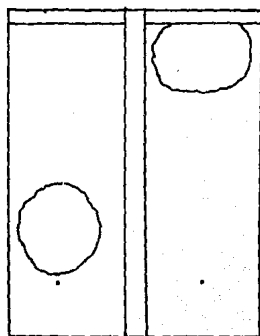


Figura No.4 muestra (A) bromuro de propantelina, (B) bromuro de propantelina degradada .

(A)  $R_f=0.22$  (B)  $R_f=0.91$

TABLA 4. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION PARA DETECCION DE BROMURO DE PROPANTELINA POR ESPECTROFOTOMETRIA EN LA PRUEBA DE DISOLUCION.

Lecturas obtenidas a 420 nm.

% adicionado	mg adicionados	Absorbancias obtenidas		
		A1	A2	A3
60	0.996	0.233 , 0.267 , 0.243		
80	1.328	0.364 , 0.312 , 0.355		
100	1.66	0.467 , 0.441 , 0.470		
120	1.992	0.582 , 0.553 , 0.591		

Cálculo de la pendiente

$$\Sigma X = 17.928$$

$$\Sigma Y = 4.878$$

$$\Sigma Y^2 = 2.167776$$

$$\Sigma X^2 = 28.437792$$

$$\Sigma XY = 7.834863$$

$$m = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

$$m = \frac{12(7.835) - (17.928)(4.878)}{12(28.438) - (17.928)^2}$$

$$m = 0.33096$$

Cálculo de la ordenada al origen

$$b = \frac{\Sigma Y - m(\Sigma X)}{n}$$

$$b = \frac{4.878 - 0.33096(17.928)}{12}$$

$$b = -0.08795$$

Cálculo del coeficiente de correlación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y))^2}{(n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2)(n(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2)}$$

$$r^2 = \frac{(12(7.834863) - 17.928(4.878))^2}{(12(28.437792) - (17.928)^2)(12(2.167776) - (4.878)^2)}$$

$$r^2 = 0.97939$$



Elaboración de la tabla del análisis de la varianza

Cálculo de la suma de cuadrados de regresión (SCr)

$$SCr = m(\sum XY) + b(\sum Y) - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$SCr = 0.33096(7.835) + (-0.08795)(4.878) - \frac{(4.878)^2}{12}$$

$$SCr = 0.1811445$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error de regresión

$$SCer = \sum Y^2 - m(\sum XY) - b(\sum Y)$$

$$SCer = 2.167776 - 0.33096(7.835) - (-0.08795)(4.878)$$

$$SCer = 3.776 \times 10^{-3}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error puro (SCep)

$$SCep = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{r}$$

$$SCep = 2.168 - \frac{(6.493)^2}{3}$$

$$SCep = 3.666 \times 10^{-3}$$

Cálculo de la suma de cuadrados de la falta de ajuste

$$SCfa = SCer - SCep$$

$$SCfa = 3.776 \times 10^{-3} - 3.66 \times 10^{-3}$$

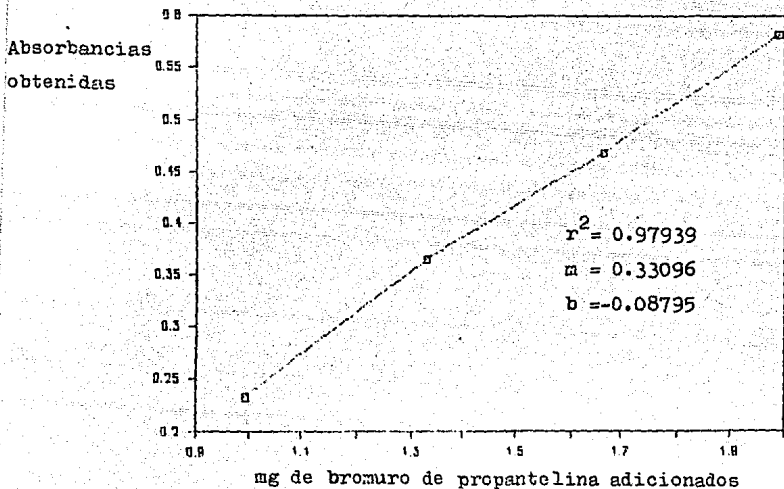
$$SCfa = 1.1 \times 10^{-3}$$

TABLA 5. ANALISIS DE LA VARIANZA

Evaluación de la linealidad del sistema de medición

Fuente de Variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F <sub>calc.</sub>
Regresión	1	0.1811445	0.1811445	479.73
Error de regresión	10	$3.776 \times 10^{-3}$	$3.776 \times 10^{-4}$	-
Falta de ajuste	2	$1.1 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-5}$	0.12002
Error puro	8	$3.666 \times 10^{-3}$	$4.583 \times 10^{-4}$	-

F<sub>glr</sub>, g<sub>ler</sub> : 0.99F<sub>glfa</sub>, g<sub>lep</sub> : 0.95F<sub>1, 10</sub> : 10.04F<sub>2, 8</sub> : 4.46



Gráfica No.1: Linealidad del sistema de medición para la detección de bromuro de propantelina por espectrofotometría UV-VIS .

TABLA 6. RESULTADOS DE LA EXACTITUD AL 100 %, DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE BROMURO DE PROFANTELINA POR ESPECTROFOTOMETRIA.

% adicionado	% recuperado
100	102.84
100	101.10
100	97.81
100	100.22
100	97.37
100	103.28
100	100.30
100	98.47
100	100.43
100	100.85

Cálculos de la evaluación de la exactitud:

$$\sum Y = 1002.67$$

$$\sum Y^2 = 100569.13$$

$$\bar{Y} = 100.267$$

$$S = 1.95$$

$$t(n-1, 0.975)$$

$$t(9, 0.975) = 2.2622$$

Intervalo de confianza

$$IC = \bar{Y} \pm t(n-1, 0.975) \frac{S}{n^{1/2}}$$

$$IC = 100.267 \pm 2.2622 \frac{1.95}{10^{1/2}}$$

$$IC = 98.872 \text{ ————— } 101.662$$

Cálculo del estadígrafo de contraste "t"

$$t = \frac{(\bar{Y} - 100)(n^{1/2})}{S}$$

$$t = \frac{(100.267 - 100)(10^{1/2})}{1.95}$$

$$t = 0.433$$

Regla de decisión :

$$t_{\text{calc.}} 0.433 < t(9, 0.975) 2.2622$$

TABLA 7 .RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL METODO DE MEDICION PARA LA CUANTIFICACION DE BROMURO DE PROPANTELINA POR ESPECTROFOTOMETRIA EN LA PRUEBA DE DISOLUCION.

mg adicionados	mg recuperados	% de recuperación
10	9.67, 9.5, 9.6	96.76, 95, 96
13.3	13.16, 13.23, 13.09	98.95, 99.47, 98.42
16.6	16.53, 16.85, 16.6	99.58, 101.51, 100
19.9	19.97, 20.33, 20.15	100.35, 102.16 101.26

Cálculos para la evaluación de linealidad del método:

$$\Sigma X = 179.400$$

$$\Sigma Y = 178.680$$

$$\Sigma X^2 = 2845.380$$

$$\Sigma Y^2 = 2846.341$$

$$\Sigma XY = 2845.407$$

$$\Sigma Y_i^2 = 8538.586$$

Cálculo de la pendiente (m)

$$m = \frac{12(2845.407) - (179.400)(178.680)}{12(2845.380) - (179.400)^2}$$

$$m = 1.06606$$

Cálculo de la ordenada al origen (b)

$$b = \frac{178.680 - 1.06606(179.400)}{12}$$

$$b = -1.047597$$

Cálculo del coeficiente de correlación ( $r^2$ )

$$r^2 = \frac{(12(2845.407) - (179.400)(178.680))^2}{(12(2845.380) - (179.400)^2)(12(2846.341) - (178.680)^2)}$$

$$r^2 = 0.99919$$

Desviación estándar de la regresión

$$S_{yx} = \left[ \frac{(2846.341) - 1.06606(2845.407) - (-1.047597)(178.68)}{10} \right]^{1/2}$$

$$S_{yx} = 2.28147 \times 10^{-4}$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

Error estándar para la pendiente

$$S_m = 2.28147 \times 10^{-4} \left[ \frac{1}{(2845.380) - (179.4)^2} \right]^{1/2}$$

$$S_m = 1.7850 \times 10^{-5}$$

$$t(n-2, 0.975) = 2.228$$

$$IC_m = 1.06606 \pm 2.228(1.7850 \times 10^{-5})$$

$$IC_m = 1.06602 \text{ ————— } 1.06609$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

Error estándar para la ordenada al origen

$$S_b = 2.28147 \times 10^{-4} \left[ \frac{1}{12} + \frac{14.89}{12(2845.380) - (179.4)^2} \right]^{1/2}$$

$$S_b = 6.8796 \times 10^{-5}$$

$$t(n-2, 0.975) = 2.228$$

$$IC_b = -1.047597 \pm 2.228(6.8796 \times 10^{-5})$$

$$IC_b = -1.04775 \text{ ————— } -1.04744$$



Elaboración de la tabla del análisis de la varianza:

Suma de cuadrados del error (SCr)

$$SCr = 1.06606(2845.407) - 1.047597(178.680) - \frac{(178.68)^2}{12}$$

$$SCr = 185.64475$$

Suma de cuadrados del error de regresión

$$SCer = 2846.341 - 1.06606(2845.407) + 1.047597(178.68)$$

$$SCer = 0.1510455$$

Suma de cuadrados del error puro

$$SCep = 2846.341 - \frac{(8538.586)}{3}$$

$$SCep = 0.14566$$

Suma de cuadrados de la falta de ajuste

$$SCfa = 0.1510455 - 0.14566$$

$$SCfa = 5.3855 \times 10^{-3}$$

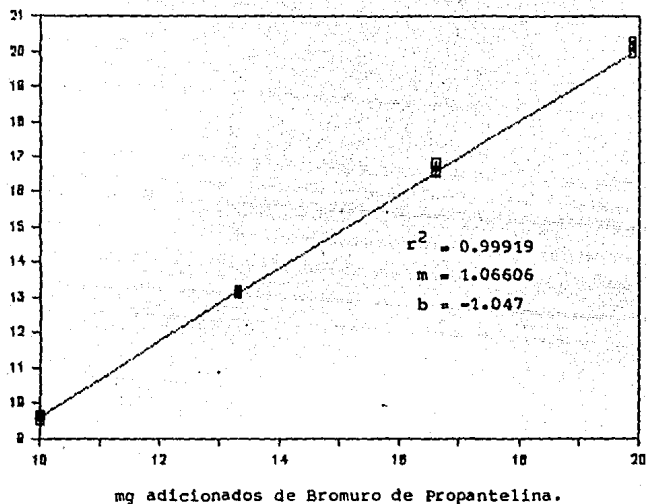
TABLA 8 . ANALISIS DE LA VARIANZA

Evaluación de la linealidad del método de medición

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F <sub>calc.</sub>
Regresión	1	185.64475	185.64475	12290.692
Error de regresión	10	0.1510455	0.0151045	—
Falta de ajuste	2	$5.3855 \times 10^{-3}$	$2.6927 \times 10^{-3}$	0.14789
Error puro	8	0.14566	0.018207	—

F<sub>glr, gler</sub>: 0.99F<sub>glfa, glep</sub>: 0.95F<sub>1, 10</sub> : 10.04F<sub>2, 8</sub> : 4.46

mg recuperados  
de Bromuro de  
Propantelina.



Gráfica No. 2: linealidad del método analítico para la determinación de Bromuro de Propantelina por espectrofotometría al visible.

TABLA 9. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE BROMURO DE PROFANTELINA .

Resultados en % de recuperación

	Analista 1	Analista 2
Día 1	100.1	97.43
	101.31	96.35
	102.18	98.28
Día 2	99.36	97.0
	95.75	97.64
	101.91	99.14

Evaluación de la precisión:

$Y_{11}$ . 303.59

$Y_{1..}$ . 600.6

$Y_{12}$ . 297.01

$Y_{2..}$ . 585.84

$Y_{21}$ . 292.06

$Y_{...}$ . 1186.44

$Y_{22}$ . 293.78

$\sum Y_{i..}^2$ . 703928.87

$\sum \sum Y_{ij}^2$ . 351987.56

$\sum \sum \sum Y_{ijk}$ . 117354.88

Elaboración de la tabla del análisis de la varianza

Cálculo de la suma de cuadrados del aralista (SCa)

$$SCa = (\sum Y_{i..}^2)/6 - (Y_{...})^2/12$$

$$SCa = \frac{703928.87}{6} - \frac{(1189.44)^2}{12}$$

$$SCa = 18.155$$

Cálculo de la suma de cuadrados del día (SCd)

$$SCd = (\sum \sum Y_{ij.}^2)/3 - (\sum Y_{i..}^2)/6$$

$$SCd = \frac{351987.56}{3} - \frac{703928.87}{6}$$

$$SCd = 7.7091$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error

$$SCe = (\sum \sum \sum Y_{ijk}^2) - (\sum \sum Y_{ij.}^2)/3$$

$$SCe = 117354.88 - \frac{351987.56}{3}$$

$$SCe = 25.6933$$

TABLA 10. ANALISIS DE LA VARIANZA

Evaluación de la reproducibilidad del método

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F
Analista	1	18.155	18.155	4.71
Día/Analista	2	7.7091	3.8545	1.2
Error	8	25.6933	3.2117	-

Analista

$$F_{0.95}(1, 2) = 18.51$$

$$F_{0.99}(1, 2) = 98.50$$

Día

$$F_{0.95}(2, 8) = 4.46$$

$$F_{0.99}(2, 8) = 8.65$$

Repetibilidad del método:

$$\text{Rep} = \pm (1.96)(\text{MCE})^{1/2}$$

$$\text{Rep} = \pm (1.96)(3.2117)^{1/2}$$

$$\text{Rep} = \pm 3.51$$

Reproducibilidad interanalista:

$$\text{Rep-a} = \pm (1.96)((\text{MCA}-\text{MCD})/6)^{1/2}$$

$$\text{Rep-a} = \pm (1.96)(\frac{18.155-3.8545}{6})^{1/2}$$

6

$$\text{Rep-a} = \pm 3.03$$

Reproducibilidad interdia:

$$\text{Rep-d} = \pm \frac{(1.96)(\text{MCD-MCe})^{1/2}}{2}$$

$$\text{Rep-d} = \pm \frac{(1.96)(93.8456-3.2117)^{1/2}}{2}$$

$$\text{Rep-d} = \pm 1.11$$

### RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

TABLA 11. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA REALIZADA EN REFRIGERACION, LUZ BLANCA Y OSCURIDAD DURANTE 6, 9 Y 24 HORAS.

Resultados dados en porciento de recuperación

tiempo	Refrigeración	obscuridad	luz blanca
6	101.29	101.28	99.19
horas	101.93	101.07	99.35
9	94.42	99.78	92.02
horas	99.69	102.78	99.14
24	94.84	98.28	86.90
horas	94.42	90.12	92.91

TABLA 12. RESULTADOS DE LA SUMA DE LAS DUPLICACIONES DE CADA TRATAMIENTO EN LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Horas	Refrigeración	Oscuridad	Luz blanca
6	203.22	202.35	198.54
9	184.11	202.56	191.2
24	189.26	188.4	173.81

Cálculos para la evaluación en la estabilidad de la muestra.

$$\sum Y_i^2 = 336792.05$$

$$\sum Y^2 = 168488.46$$

Suma de cuadrados del error

$$SCe = \frac{\sum Y^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{r}}$$

$$SCe = 168488.46 - \frac{336792.05}{2}$$

$$SCe = 92.435$$

Media cuadrática del error

$$MCE = \frac{SCe}{(r-1)t} = \frac{92.435}{9} = 10.27$$

$$MCE = 10.27$$



Cálculo del valor de "t" de Dunnet para cada combinación

$$t = \frac{(Y_i./r)-100}{((MCE)_2/r)^{1/2}}$$

$$t_1 = \frac{(203.22/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = 0.50$$

$$t_2 = \frac{(184.11/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = -2.48$$

$$t_3 = \frac{(189.29/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = -1.68$$

$$t_4 = \frac{(202.35/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = 0.37$$

$$t_5 = \frac{(202.56/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = 0.40$$

$$t_6 = \frac{(188.4/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = -1.81$$

$$t_7 = \frac{(198.54/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = -0.23$$

$$t_8 = \frac{(191.2/2)-100}{(10.27)^{1/2}} = -1.27$$

$$t_9 = \frac{(179.81/2) - 100}{(10.27)^{1/2}} = -3.15$$

TABLA 13. "t" DE DUNNET OBTENIDAS A DIFERENTES CONDICIONES Y DIFERENTES TIEMPOS, EN LA EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Horas	Refrigeración	Obscuridad	Luz blanca
6	0.50	0.37	-0.23
9	-2.48	0.40	-1.37
24	-1.68	-1.81	-3.15

"t" de Dunnet de tablas con  $\alpha = 0.05 = \pm 2.96$

## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

La especificidad del método fue probada degradando el bromuro de propantelina a ácido xantanóico, el cual fue sometido al método de medición a validar, al igual que el placebo, donde la muestra de bromuro de propantelina (A), es la única que presenta absorción a la longitud de onda de 420 nm, lo cual se puede observar en la figura No.3

La tabla No.4 muestra las absorbancias obtenidas a 420 nm, a cuatro diferentes concentraciones, donde su comportamiento lineal esta representado en la gráfica No.1, de acuerdo a la tabla No.5 de análisis de la varianza, en esta se muestra una F calculada para regresión altamente significativa y debido a que es mayor que F de tablas, el sistema es lineal. La F para la falta de ajuste es menor que la de tablas indicando que el modelo lineal describe la relación entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

El valor del coeficiente de correlación indica igualmente la relación lineal entre la concentración y la absorbancia, donde  $r^2 = 0.97939$

La exactitud se evaluó elaborando 10 muestras al 100 % y midiendo su porcentaje de recuperación como se muestra en la tabla No.6, donde al hacer la evaluación estadística y comparando con el estadígrafo de contraste t de student, el método es exacto por ser menor  $t_{\text{calc.}}$  que  $t_{\text{tab.}}$

La tabla No.7 muestra los resultados de linealidad del método donde se tabularon los mg adicionados y los mg recuperados, donde se representan en la gráfica No.2 para determinar la linealidad del método se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.99919 demostrando que existe una relación lineal. Para reforzar este resultado se hizo un análisis de la varianza, como se muestra en la tabla No.8, donde se observa que la  $F_{\text{calc.}}$  de la regresión es mayor que la  $F_{\text{tab.}}$  esto indica que el método es lineal y describe la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, ya que la falta de ajuste no es significativa.

La reproducibilidad del método se determinó realizando un análisis de varianza con dos criterios de clasificación entre analista y día.

La tabla No.9 muestra los recobros obtenidos por dos diferentes analistas y dos diferentes días.

La tabla No.10 muestra que no se ve afectada la reproducibilidad por el día, por el analista se observa una variación de  $\pm 3.03$

La estabilidad de la muestra se evaluó a diferentes condiciones y a diferentes tiempos como se ve en la tabla

No. 11, la evaluación se hizo comparando contra un control que es la "t" de Dunnet donde muestra que las muestras a luz blanca son estables durante 9 horas, las muestras en refrigeración y obscuridad son estables durante las 24 horas.

Las muestras preparadas, por el porcentaje de recuperación obtenido, se muestran estables durante un máximo de 6 horas, en todas las condiciones.

## 9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que el método expuesto es lineal en un rango de concentración de 0.01 mg/ml a 0.0199 mg/ml; repetible entre concentraciones; exacto; específico; la muestra tiene máxima estabilidad de 6 horas.

El método espectrofotométrico UV-VIS para la detección de bromuro de propantelina en la prueba de disolución es un método confiable.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1- Beerman, B.;" On the metabolism of propantheline in man "; Chemical Pharmaceutical and Therapeutics; 13 (2) 212-219 (1973)
- 2- Brannon, et.al.;" Identification tests for propantheline bromide "; J. Assoc. off Anal. Chem.; 62 (4) 808-811 (1979)
- 3- Cavenaghi, et.al.;" Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of the medicines "; Drug Development and Industrial J. Pharmacy; 13 (14) 2571-2595 (1987)
- 4- Chatten, L.G.;" Assay of quaternary ammonium compounds in various dosage forms by acid-dye method" Journal of Pharmaceutical Sciences; 62 (8) 1328-1331 (1973)
- 5- Connors, K.A.; A. TEXTBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS 3rd. Edition Jhon Wiley & Sons, USA, 1982, pp 173-205
- 6- Fontani, F.;" Criteri di convalida del metodi d'analisi"; Boll. Chim. Farm.; 126 (2) 66-74 (1987)

- 7- Guerra, J.;" Validation of analytical methods by FDA laboratories "; Pharmaceutical Technology ; 10 (3) 76-82 (1986)
- 8- Markham, I.;" The determination of small amounts of long-chain tertiary alkylamines and quaternary ammonium salts "; Analytica Chimica Acta; 39 February 7-12 (1957)
- 9- Pietrzyk, D.J.; QUIMICA ANALITICA, 2a. ed. Editorial Interamericana, México D.F. 1983, pag. 48, 378-403, 558
- 10- Remington R.D. y Schork M.A.; ESTADISTICA BIOMETRICA Y SANITARIA; 2a. ed. Editorial Prentice/Hall Internacional, España, 1977 pag. 256-263
- 11- Schill, G.;" Photometric determination of quaternary ammonium compounds with hexanitrodiphenylamine II "; Analytica Chimica Acta; 21 (March) 341-352 (1959)
- 12- Taylor, J.;" Validation of analytical methods " Analytical Chemistry ; 55 (6) 601A-608A (1983)



## 13- The Merk Index

Merck & CO.INC. Ninth edition N.J. 1976

## 14- The United States Pharmacopeia XXI

Twenty-first revision, Official from January 1,

1985 pp 893-894

## 15- Yoshioka, S.; " Kinetics and mechanism of the

solid-states decomposition of propantheline bromide"

Journal of Pharmaceutical Sciences; 75 (1) 92-96

(1985)

## APENDICE

## DESVIACION ESTANDAR

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

## REGLA DE DECISION PARA LA LINEALIDAD

Si  $F_{\text{calc}} \geq F_{\text{tablas glnum/gldenom}} \quad 95 \%$

Los datos se relacionan

Si  $F_{\text{calc}} < F_{\text{tablas glnum/gldenom}} \quad 95 \%$

Los datos no se relacionan

Si  $F_{FA} < F_{\text{tablas glnum/gldenom}} \quad 95 \%$

No hay falta de ajuste o sea es una linea recta

Si  $F_{FA} > F_{\text{tablas glnum/gldenom}} \quad 95 \%$

Es decir los datos se ajustan a un modelo lineal

MATRIZ DE TRATAMIENTOS PARA PRECISION, CUANDO SE UTILIZAN 2 DIAS, 2 ANALISTAS Y 3 DETERMINACIONES.

## ANALISTA

		1	2
DIA	1	$Y_{111}$ $Y_{112}$ $Y_{113}$	$Y_{211}$ $Y_{212}$ $Y_{213}$
	2	$Y_{121}$ $Y_{122}$ $Y_{123}$	$Y_{221}$ $Y_{222}$ $Y_{223}$

$$Y_{...} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + \dots + Y_{223}$$

$$\sum Y^2 = Y_{111}^2 + Y_{112}^2 + Y_{113}^2 + \dots + Y_{223}^2$$

$$\bar{Y} = Y_{...}/n$$

n = Número de determinaciones en total

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_1 = Y_{11} + Y_{12}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_2 = Y_{21} + Y_{22}$$

$$Y_{21} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

MATRIZ DE TRATAMIENTOS PARA TABULAR SUMA DE COMBINACIONES  
CONDICION-TIEMPO

## C O N D I C I O N

T I E M P O	$Y_{111}$ $Y_{112}$ $Y_i.$	$Y_{211}$ $Y_{212}$ $Y_i.$	$Y_{311}$ $Y_{312}$ $Y_i.$
	$Y_{121}$ $Y_{122}$ $Y_i.$	$Y_{221}$ $Y_{222}$ $Y_i.$	$Y_{321}$ $Y_{322}$ $Y_i.$
	$Y_{131}$ $Y_{132}$ $Y_i.$	$Y_{231}$ $Y_{232}$ $Y_i.$	$Y_{331}$ $Y_{332}$ $Y_i.$

## REGLA DE DECISION PARA "t" DE DUNNET

Si  $t_D \leq t_{g|e,m, 0.95}$  La muestra es estable

Si  $t_D > t_{g|e,m, 0.95}$  La muestra es inestable