

88
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



FALLA DE ORIGEN

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE
DOS PRINCIPIOS ACTIVOS: FUROSEMIDA Y CLORHIDRATO
DE AMILORIDA PRESENTES EN TABLETAS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo
P R E S E N T A
HERLINDA MATEOS HIDALGO

MEXICO, D. F.

1990.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1. Introducción.
2. Objetivo.
3. Hipótesis.
4. Generalidades.
 - 4.1. Diuréticos.
 - 4.2. Monografías de los principios activos.
 - 4.2.1. Furosemda.
 - 4.2.2. Clorhidrato de amilorida.
 - 4.3. Espectroscopía de absorción.
 - 4.4. Validación de métodos analíticos.
5. Parte experimental.
 - 5.1. Reactivos y soluciones.
 - 5.2. Método analítico para furosemda.
 - 5.3. Método analítico para clorhidrato de amilorida.
 - 5.4. Resultados de la Validación del método analítico para furosemda y clorhidrato de amilorida en tabletas.
6. Análisis de resultados.
7. Conclusiones.
8. Sugerencias.
9. Bibliografía.

1. INTRODUCCION.

Los avances logrados en la investigación referente a la elaboración y administración de medicamentos así como los aspectos farmacocinéticos de los mismos, han hecho posible la producción de medicamentos de alta seguridad. El control de calidad de los mismos ha sido posible mediante el desarrollo de métodos analíticos y técnicas instrumentales cada vez más confiables y adecuadas.

Dada la complejidad de las diferentes formas farmacéuticas, ha sido necesario determinar el grado de confiabilidad de los métodos analíticos utilizados en el control de calidad de los medicamentos, para que los resultados obtenidos sean indicativos reales de las características de los mismos. Es por esto que se ha visto la necesidad de incluir el proceso de validación de métodos analíticos dentro del esquema total de aseguramiento de calidad de un producto farmacéutico.

En un polifármaco la validación de sus métodos de análisis es aún más compleja que en un monofármaco. Con esta aseguramos que los resultados obtenidos al valorar los fármacos de la formulación correspondan a lo que realmente tiene la tableta de cada uno de ellos.

El medicamento que se estudió en el desarrollo de este trabajo es un diurético que contiene furosemda y clorhidrato de amilorida en forma farmacéutica tabletas.

Aparecen reportados en la literatura, varios métodos de análisis para cuantificar los fármacos antes mencionados, entre los cuales se encuentran métodos volumétricos, espectrofotométricos y cromatográficos (II, IV, IX y XVI).

Se eligió usar métodos espectrofotométricos porque se adaptan al equipo con que cuenta la empresa y además ofrecen una especificidad óptima.

Una vez establecido el método de análisis se procedió a validarlo estadísticamente, lo que implicó determinar los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y estabilidad de la muestra.

Los resultados mostraron que el método es confiable y aplicable al control de calidad del producto estudiado.

2. OBJETIVO.

Desarrollar un método analítico que permita la cuantificación de furosemida y clorhidrato de amilorida en tabletas.

Validar el método analítico empleado para la determinación de los principios activos presentes en tabletas.

3. HIPOTESIS.

El método espectrofotométrico para el análisis de furosemida y clorhidrato de amilorida cumple satisfactoriamente con los puntos comprendidos en la validación y por tanto este puede ser utilizado para el análisis cuantitativo del producto terminado.

4. GENERALIDADES.

4.1. DIURETICOS.

Los diuréticos son fármacos que se emplean para aumentar el volumen de orina; su aplicación médica principal es para suprimir un exceso de líquido extracelular (edema) en estado patológico. Algunos diuréticos tienen usos adicionales. Disminuyen la presión arterial en la hipertensión, disminuyen el volumen de orina en la diabetes insípida.

En términos simples, la formación de la orina a partir de la sangre consiste en la filtración glomerular, la reabsorción selectiva por los tubos y la secreción. A medida que el filtrado glomerular pasa por los túbulos, las sustancias esenciales para la sangre y los tejidos, agua, glucosa, sales y aminoácidos, son reabsorbidas. Otras sustancias presentes en el filtrado glomerular, como la urea, no son tan fácilmente absorbidas por los túbulos. Así, se considera que en el túbulo renal existe un mecanismo específico para el transporte de cada especie iónica.

La mayoría de los diuréticos bloquean la reabsorción de sodio y/o cloruro en los túbulos renales, lo que causa natriuresis y diuresis, pero el o los mecanismos por los cuales se produce el bloqueo, así como el sitio de acción varía, pudiendo actuar sobre el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, los túbulos colectores o cualquier combinación de estos sitios.

La administración concurrente de diuréticos y otros fármacos provoca algunas de las interacciones entre fármacos que se encuentran con mayor frecuencia. Un ejemplo común es la prescripción de un glucósido cardíaco

Junto con un diurético; la hipokalemia inducida por este último potencia la cardiotoxicidad del glucósido. Esta interacción adversa puede ser reducida aumentando la ingesta de potasio (suplementos de potasio, dieta, diuréticos que conservan el potasio) o administrando el diurético en forma intermitente (permite que los mecanismos homeostáticos corrijan el desequilibrio). Otro ejemplo incluye la pérdida del control del azúcar en sangre en los pacientes diabéticos que reciben tiazidas, furosemida o ácido etacrinico.

Los agentes diuréticos pueden ser divididos en dos grupos:

1) diuréticos osmóticos y

2) diuréticos inhibidores de los túbulos renales.

Se incluye un tercer grupo, el de los agentes renales diversos, donde se coloca el probenecid, un agente que si bien no es un diurético inhibe la reabsorción de ácido úrico por los túbulos renales y bloquea la excreción renal de numerosas sustancias. (Figura 1 y 2). (VI y VIII).

En la clasificación dada no se anexa a los diuréticos mercuriales orgánicos, esto es porque los fármacos que se han introducido en las tres últimas décadas son efectivos por vía oral y algunos también lo son cuando hay gran disminución del flujo sanguíneo renal y del índice de filtración, atributos que no poseen los mercuriales. En consecuencia, estos últimos han desaparecido casi totalmente de la práctica clínica (X).

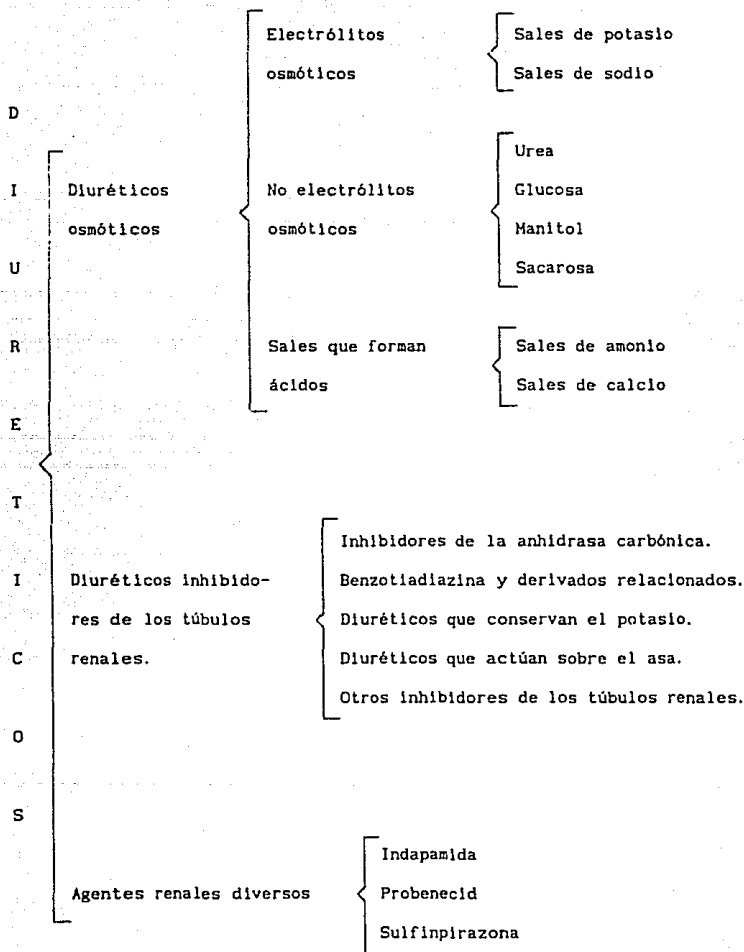


Figura 1. Clasificación de diuréticos (X).

Diuréticos
Inhibidores
de los túbu-
los renales.

Inhibidores de
la anhidrasa
carbónica.

Acetazolamida
Acetazolamida sódica
Diclorofenamida
Etóxizolamida
Metazolamida

Benzotiadiazina y
derivados relacionados.

Bendroflumetiazida
Benzotiazida
Ciclotiazida
Clorotiazida
Clorotalidona
Hidroclorotiazida
Hidroflumetiazida
Meticlotiazida
Metolazona
Polítiazida
Quinetazona
Triclorometiazida

Diuréticos que conser-
van el potasio.

Clorhidrato de amilorida
Espironolactona
Triamtereno

Figura 2. Parte A. Inhibidores de los túbulos renales.

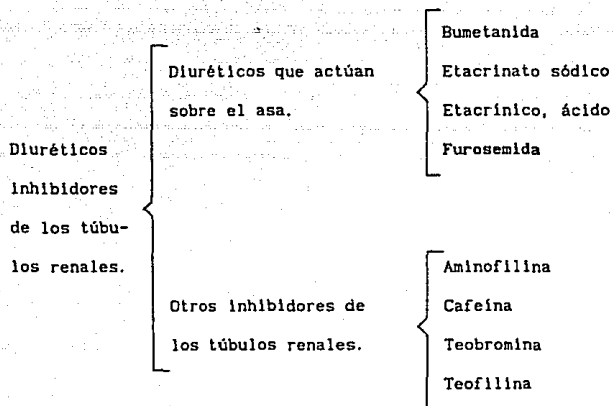
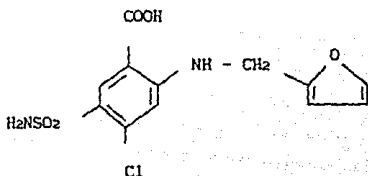


Figura 2. Parte B. Inhibidores de los túbulos renales.

4.2. MONOGRAFIAS.

4.2.1. FUROSEMIDA.

Furosemda. Acido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranilico;
 $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$; peso molecular 330.77 . La fórmula estructural puede ser representada de la siguiente manera:



DESCRIPCION. Polvo cristalino blanco a levemente amarillo, inodoro y prácticamente insípido. (I).

CONSTANTE DE DISOCIACION (III). pK_a 3.9

SOLUBILIDAD. Prácticamente insoluble en agua. Soluble en acetona, metanol, dimetilformamida y en soluciones acuosas superiores a pH 8 . Menos soluble en etanol, poco soluble en éter y muy poco soluble en cloroformo. (III).

IDENTIFICACION.

Punto de fusión: 206°C con descomposición.

Espectrofotometría ultravioleta: en solución de hidróxido de sodio 0.1 N (normal) presenta 3 máximos de absorción en las siguientes longitudes de onda (III):

226 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1147)$
273 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 557)$
336 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 133)$

y en alcohol etílico al 95 % (III):

228 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 945)$
276 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 588)$
336 nm	$(E_{1\text{cm}}^{1\%} = 144)$

Espectroscopía infrarroja: los picos principales se presentan en las frecuencias: 1143, 1241, 1323, 1561, 1590 y 1669 cm^{-1} . (III). (Figura 3).

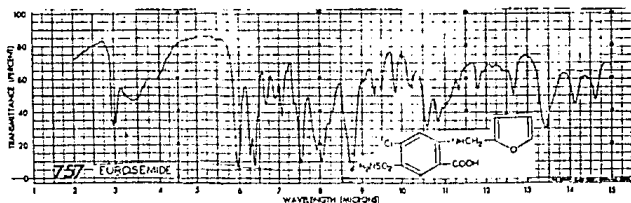


Figura 3. Espectro infrarrojo de furosemida.

MÉTODOS DE ANÁLISIS.

a) Análisis espectrofotométricos.

- Espectrofotometría ultravioleta. La furosemda puede ser cuantificada por comparación de las absorbancias de la muestra en hidróxido de sodio 0.1 N a 271 nm con la obtenida de una sustancia de referencia (S.Ref.) en hidróxido de sodio 0.1 N , de concentración conocida, a la misma longitud de onda. (II).

- Espectrofotometría visible. Mediante el desarrollo de color producido por el producto de condensación de floroglucinol con el furfuraldehído formado por la hidrólisis ácida de la furosemda se puede cuantificar este principio activo. (XVI).

b) Titulación ácido - base. Neutralización del ácido presente en la molécula con hidróxido de sodio 0.1 N . Se utiliza como disolvente dimetilformamida y como indicador azul de bromotimol.(IV).

ESTABILIDAD. La furosemda (A) es inestable en medio ácido y estable en medio alcalino. En condiciones ácidas se hidroliza formando el ácido 4-cloro-5-sulfamoiiantranílico (B) y alcohol furfurílico (C). En solución de hidróxido de sodio en presencia de peróxido de hidrógeno o luz, se obtiene el ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico (D). De igual manera, el ácido 4-cloro-5-sulfamoiiantranílico en presencia de peróxido de hidrógeno forma el compuesto antes mencionado. (Figura 4). (XVIII y XIX).

MECANISMO DE ACCION. Inhibe la resorción de sodio y cloruro en la porción proximal del asa ascendente de Henle. (VIII)

ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION. Se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal y se une fuertemente a las proteínas plasmáticas. Su excreción urinaria se efectúa principalmente por secreción tubular proximal, pero casi un tercio del fármaco puede excretarse por las heces, y una pequeña fracción se metaboliza por desdoblamiento de la cadena lateral. (X).

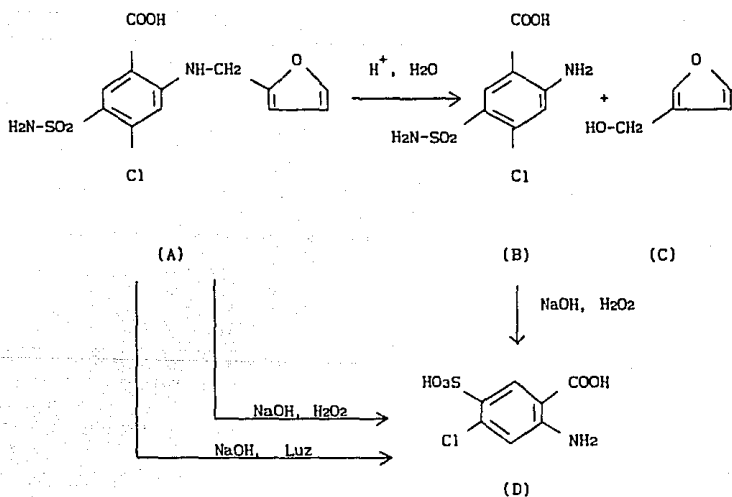


Figura 4. Productos de degradación de furosemda.

USOS. Diurético. Está indicada para el tratamiento del edema asociado con insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática y enfermedad renal, incluyendo el síndrome nefrótico. Está particularmente indicada cuando se necesita un potencial diurético mayor que el obtenido cuando se emplean los diuréticos comunes. También es útil en el manejo de ciertos pacientes con hipertensión.

INTERACCION CON OTROS FARMACOS. Aumenta la toxicidad del litio, de la digital y de la teofilina. Disminuye la respuesta arterial de la norepinefrina, antagoniza el efecto relajante sobre el músculo esquelético de la tubocumarina y puede potenciar la acción de la succinilcolina. La administración concomitante de la indometazina puede reducir el efecto natriurético y antihipertensivo de la furosemida. Este efecto también puede ocurrir con otros fármacos antiinflamatorios no esteroides como el ibuprofeno y el naproxeno. La metolazona actúa en forma sinérgica con la furosemida estimulando una profunda diuresis en pacientes resistentes a esta última.

CONTRAINDICACIONES. Está contraindicada en anuria, coma hepático y en pacientes con sensibilidad conocida al fármaco. Además en mujeres con posibilidades de embarazo.

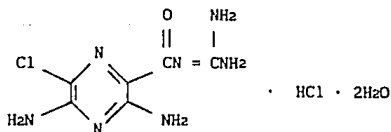
EFFECTOS ADVERSOS. Reducción del flujo sanguíneo renal, cerebral y cardiaco, pérdida de potasio que provoca anomalías cardíacas y neuromusculares, elevación de los niveles sanguíneos de ácido úrico y glucosa, reacciones alérgicas, con poca frecuencia dermatitis exfoliativa, prurito y discrasias sanguíneas (trombocitopenia y leucopenia). También

pueden presentarse parestesia, visión borrosa, hipotensión postural, náuseas, vómitos o diarrea. Además se han observado casos de sordera y tinnitus reversibles.

DOSIS. Adultos, oral 20 a 80 mg diarios; usual, 40 a 80 mg una vez por día; intramuscular o intravenosa, 20 a 40 mg, luego de por lo menos 1 hora aumentar en 20 mg para obtener el efecto deseado. (VI).

4.2.2. CLORHIDRATO DE AMILORIDA.

Clorhidrato de amilorida. Clorhidrato dihidratado de 3,5-diamino-N-(diaminometileno)-6-cloro-pirazinacarboxamida; $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl \cdot 2H_2O$; peso molecular 302.12. La fórmula estructural puede ser representada de la siguiente forma:



DESCRIPCION. Polvo cristalino amarillo o amarillo verdoso, inodoro.

(1).

CONSTANTE DE DISOCIACION (III). pKa 8.7

SOLUBILIDAD. Prácticamente insoluble en acetona, cloroformo, eter etílico, acetato de etilo; muy ligeramente soluble en alcohol etílico; ligeramente soluble en isopropanol y agua; escasamente soluble en metanol y libremente soluble en dimetilsulfóxido. Soluble en soluciones acuosas con pH ácido.

IDENTIFICACION.

Punto de fusión. Del compuesto anhidro es 293.5°C con descomposición, y dihidratado es aproximadamente de 288°C con descomposición.

Espectrofotometría ultravioleta. En solución de ácido clorhídrico 0.1 N presenta 2 máximos de absorción en las siguientes longitudes de onda (III):

284 nm $\{E_{1\text{cm}}^{1\%} = 639\}$

362 nm $\{E_{1\text{cm}}^{1\%} = 699\}$

Espectroscopía infrarroja. Los picos principales se presentan en las siguientes frecuencias: 1235, 1515, 1538, 1587, 1639 y 1695 cm^{-1} . (III). (Figura 5).

METODOS DE ANALISIS.

a) Análisis espectrofotométrico.

- Espectrofotometría ultravioleta. El clorhidrato de

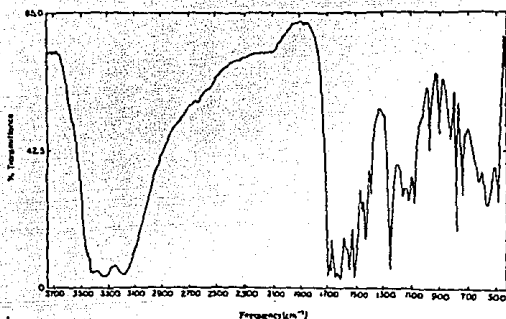


Figura 5. Espectro infrarrojo de clorhidrato de amilorida.

amilorida puede ser cuantificado por comparación de las absorbancias de la muestra en ácido clorhídrico 0.1 N a 360 nm con la obtenida de una sustancia de referencia en el mismo medio, de concentración conocida y a la misma longitud de onda. (IX).

- Extracción líquido - líquido con espectrofotometría ultravioleta. Una solución acuosa alcalina de clorhidrato de amilorida se extrae con fosfato de tributilo. La amilorida se encuentra en la fase orgánica mientras que las impurezas se localizan en la fase acuosa. La base libre es determinada por espectrofotometría ultravioleta a 363 nm. (II).

b) Titulación no acuosa. Determinación del compuesto con ácido perclórico utilizando ácido acético glacial, 1,4-dioxano, acetato mercúrico y como indicador cristal violeta. (IV).

c) Cromatografía de líquidos de alta resolución. Se utiliza fase reversa empleando como fase móvil una solución al 85 % de hexano sulfonato de sodio 0.01 M en acetonitrilo. La velocidad de flujo es de 2.0 ml/min. y se detecta por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm. (IX).

ESTABILIDAD. En estado sólido, el compuesto es estable a temperatura ambiente. Expuesto a 100°C por una semana y ausencia de humedad excesiva, no sufre degradación. Solamente una exposición prolongada (> 1 semana) a una humedad muy alta (humedad relativa > 90%) y una temperatura mayor que 60°C produce degradación.

En soluciones acuosas a temperatura ambiente es estable.

En un estudio de estabilidad de clorhidrato de amilorida (A) en soluciones acuosas a temperaturas elevadas y a varios niveles de pH se identificaron tres productos de degradación (Figura 6). A pH < 1 domina el compuesto B, a pH cercano a 5 están presentes los compuestos C y D y en soluciones alcalinas (pH > 13) predomina el compuesto D. (IX).

MECANISMO DE ACCION. Inhibe la resorción de sodio y la excreción de potasio por acción directa en el tubo distal. (VIII).

ABSORCION, DISTRIBUCION Y METABOLISMO. Después de la administración oral, el 15 al 26% de la droga se absorbe en el tracto gastrointestinal. Cuando se administra por vía parenteral, la amilorida se excreta casi totalmente por la orina. El producto urinario parece ser idéntico al compuesto original, pero análogos estrechamente relacionados pueden hacerse farmacológicamente activos por conversión a amilorida. Después de

la administración oral, la acción de la amilorida sobre el riñón llega al máximo en aproximadamente 6 horas y generalmente cesa en 24 horas. (X).

USOS. La amilorida es un fármaco que conserva el potasio, con

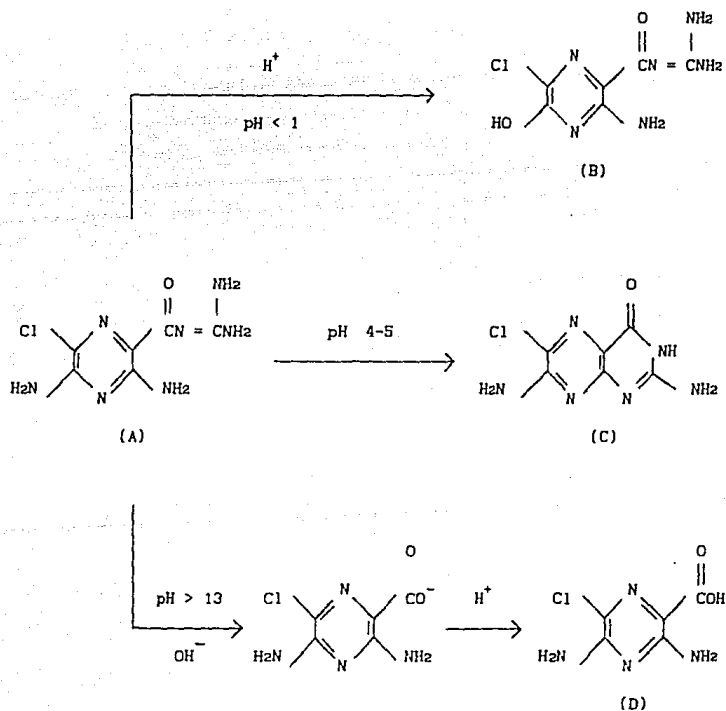


Figura 6. Productos de degradación de clorhidrato de amilorida.

actividad natriurética, diurética y antihipertensiva. Está aprobada sólo para el uso concurrente con otros agentes diuréticos del grupo tiazida u otros diuréticos saluréticos en el manejo de la insuficiencia cardíaca congestiva o hipertensión. Se emplea para restablecer los niveles séricos normales de potasio en pacientes con hipokalemia y en aquellos para los cuales la hipokalemia, si se desarrollara, significaría un riesgo grave.

CONTRAINDICACIONES. La amilorida está contraindicada en pacientes con hiperkalemia o en aquellos que toman suplementos de potasio u otros fármacos que conservan el potasio. Debe ser usada con precaución en pacientes con diabetes o alteración de la función renal. (VI).

EFFECTOS ADVERSOS. Incluyen cefalea, náuseas, anorexia, diarrea y vómitos (3 a 8%). Otros efectos adversos se observan con menos frecuencia como: mareos, dolor abdominal, constipación, debilidad, calambres musculares, disminución de la libido, tos e impotencia. Deben controlarse los niveles séricos de potasio.

DOSIS. De 5 a 10 mg por día, si la hipokalemia persiste con 10 mg/kg, la dosis puede aumentarse a 15 y luego a 20 mg por día. (VI).

4.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION.

La espectroscopia de absorción es indudablemente, una de las técnicas analíticas que ofrece varias ventajas en la solución de muchos problemas. Estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

En la mayor parte de los análisis espectrofotométricos cuantitativos se emplean medidas realizadas en las regiones ultravioleta (UV) y visible (V) del espectro electromagnético. El requerimiento básico que el compuesto a ensayar, o su derivado debe tener, es una absorción de suficiente intensidad para tener utilidad en análisis. Es necesario que la muestra no esté contaminada con sustancias capaces de interferir debido a su propia absorción.

Una forma de superar la interferencia espectral consiste en provocar un desplazamiento del espectro de absorción del compuesto que se ensaya hacia una zona de longitud de onda libre de bandas interferentes. Algunas veces esto se logra con una elevación o descenso del pH del medio. Otra forma es por conversión en un derivado; el cambio estructural originará, generalmente, uno espectral. A partir de esta base se han desarrollado muchos análisis. Se suele plantear el análisis de manera que se produzca absorción en la región visible, convirtiéndose entonces el compuesto de una sustancia incolora a un derivado fuertemente coloreado, por lo que se aplican a la solución coloreada los principios usuales del análisis espectrofotométrico y por tanto, se denominará análisis colorimétrico.

4.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

El término "validación" se puede definir como la determinación del grado de validez de un Proceso de Medición. Esto sugiere una actividad que toma lugar después que el proceso de medición ha sido desarrollado. Por tanto, se define validación de un método analítico como el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales y estadísticos, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. La capacidad se expresa en este caso en términos de productos analíticos.

El criterio para validar métodos analíticos, no se ha hecho oficial en nuestro país, no es uniforme y la información de literatura especializada es muy variada. El seleccionar cuales serán los puntos para validar un método, depende generalmente de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que la realiza.

Es importante señalar que desde el punto de vista de la validación se manejan de manera independiente las características del sistema y del método. El sistema involucra todas las variables que puedan afectar los resultados provenientes del equipo, reactivos y manipulación del principio activo. El método sólo involucra la manipulación química ó física de la muestra y por lo tanto las variables que se presentan en los resultados dependerán únicamente del tratamiento de la misma y las interacciones que presente el compuesto que se valora con otras sustancias presentes en la muestra.

Los parámetros comunmente utilizados en la validación de métodos analíticos son los siguientes:

A) ESPECIFICIDAD.

Un método analítico es específico para un compuesto en particular solo si la respuesta medida se debe a dicho compuesto y no a otros contenidos en la muestra. Las posibles interferencias pueden ser:

1) Compuestos que están siempre presentes (excipientes, otros activos o sustancias semejantes al activo).

2) Compuestos que se encuentran ocasionalmente (productos de degradación).

3) Compuestos que no se encuentran con frecuencia (productos de degradación obtenidos en condiciones extremas).

Es necesario confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar y cuantificar la sustancia de interés independientemente de cualquier interferencia presente.

De no ser así, se tendrá que optimizar el método ó desarrollar otro.

Se procede de la siguiente manera:

- Se prueba el método propuesto con el activo, placebo y formulación completa para asegurarse que no haya interferencia.

- En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras de estos con placebo y la sustancia de interés y se analizan con el método propuesto. En caso contrario se someterán las muestras en condiciones de degradación extrema para conocer la interferencia de estos.

EVALUACION

H₀ : No hay interferencia de excipientes.

H₁ : Hay interferencia de excipientes.

Criterio:

La respuesta obtenida con la formulación completa será igual a la obtenida con el principio activo sin que interfiera el placebo y productos de degradación del fármaco para aceptar H₀.

B) LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se define como la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad física, química o biológica medida con la cantidad del fármaco presente. Indica que la respuesta obtenida es proporcional a la concentración.

Se efectúa mediante la realización de análisis repetitivos de la de la sustancia de interés, a diferentes concentraciones seleccionando como el 100 % el valor esperado.

Se realiza la representación gráfica de la curva (respuesta contra concentración), se evalúa la correlación lineal entre los datos y la

EVALUACION DE LINEALIDAD.

Se realiza mediante un análisis probabilístico de varianza estableciendo las siguientes hipótesis:

H_0 : Hay linealidad.

H_1 : No hay linealidad.

y de acuerdo a la tabla que a continuación se presenta.

TABLA DE ANADEVVA

Fuente de variación. (FV)	Grados de libertad. (GL)	Suma de cuadrados. (SC)	Media de cuadrados. (MC)	F calculada (F)
Regresión (r)	1	$\beta_0 \sum y + \beta_1 \sum xy - \frac{(\sum y)^2}{n}$	$MCr = \frac{SCR}{GLr}$	$F_1 = \frac{MCr}{MCer}$
Error de regresión (er)	n-2	$\sum y^2 - (\beta_0 \sum y + \beta_1 \sum xy)$	$MCer = \frac{SCer}{GLer}$	
Falta de ajuste (fa)	$(n-2)-(r-1)c$	$SCer - SCep$	$MCfa = \frac{SCfa}{GLfa}$	$F_2 = \frac{MCfa}{MCep}$
Error Puro (ep)	$(r-1)c$	$\sum y^2 - \frac{\sum y_i^2}{r}$	$MCep = \frac{SCep}{GLEp}$	
Total corregido por la media (TCM)	n-1	$\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$	—	—

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

Donde: c = tratamientos; r = replicaciones; n = número de datos

β_0 = ordenada al origen; β_1 = pendiente; r^2 = coeficiente de correlación.

Regla de decisión para linealidad:

Si $F_1 > F_{\text{tablas}}$ no se rechaza H_0 y por tanto hay linealidad en el sistema de medición.

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{GL_{\text{numerador}}}{GL_{\text{denominador}}})$$

Regla de decisión para falta de ajuste:

Si $F_2 < F_{\text{tablas}}$ no hay falta de ajuste.

Si $F_2 > F_{\text{tablas}}$ hay falta de ajuste o un error puro muy pequeño, y para ello hay que evaluar con r^2 (deberá ser muy cercano a 1 para considerar que no hay falta de ajuste).

EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN.

Se efectúa mediante el modelo probabilístico "t" planteando las

hipótesis siguientes:

$$H_0 : \beta_0 = 0$$

$$H_1 : \beta_0 \neq 0$$

y considerando las fórmulas presentes a continuación.

$$t_{\text{calculada}} = \frac{\beta_0 - \mu_0}{S_{\beta_0}}$$

$$S_{\beta_0} = [MCR \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - \bar{x}^2} \right)]^{1/2}$$

Donde: μ_0 = valor teórico de β_0 (0); S_{β_0} = desviación estándar de β_0 .

Regla de decisión:

Si $|t_{\text{calculada}}| < t_{\text{tablas}}(n-2, 0.975)$ no se rechaza H_0 y podemos considerar que el sistema de medición no tiene error constante, por tanto se tiene una $\beta_0 = 0$.

C) PRECISION DEL SISTEMA.

Se realizan un mínimo de 8 soluciones de la sustancia de interés al 100 % del nivel normal del procedimiento.

Se evalúa con la desviación estándar relativa (DER).

EVALUACION.

H₀ : El sistema es preciso.

H₁ : El sistema no es preciso.

$$DER = \frac{Sx}{\bar{X}} \times 100$$

Donde: Sx = desviación estándar; \bar{X} = media de la serie de datos.

Criterio:

Si $DER < 1.5\%$ no se rechaza H₀ y por tanto hay precisión en el sistema de medición.

D) LINEALIDAD DEL METODO.

Se define como la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado).

Se realiza por ensayos de placebos adicionados de cantidades conocidas de la sustancia de interés, correspondientes a cuando menos 5 concentraciones alrededor del valor teórico que se va a analizar.

Los datos obtenidos en el ensayo se reportan: en el eje de las abscisas la cantidad adicionada al placebo y la cantidad recuperada en las

ordenadas.

Se evalúa la correlación lineal, la ordenada al origen y la pendiente.

EVALUACION DE LINEALIDAD.

Se efectúa mediante un análisis de varianza planteando las siguientes hipótesis:

H_0 : Hay linealidad.

H_1 : No hay linealidad.

Se elabora la tabla de Anadeva de la misma forma que para linealidad del sistema.

Regla de decisión para linealidad:

Si $F_1 > F_{tablas}$ no se rechaza H_0 y por lo tanto hay linealidad del método de medición.

Regla de decisión para la falta de ajuste:

Si $F_2 < F_{tablas}$ no hay falta de ajuste.

Si $F_2 > F_{tablas}$ hay falta de ajuste o el error puro es muy pequeño (evaluar con r^2).

EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN.

Se evalúa de la misma manera que para linealidad del sistema.

EVALUACION DE LA PENDIENTE.

Se realiza mediante el modelo probabilístico "t" de Student estableciendo las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \beta_1 = 1$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 1$$

y considerando las fórmulas siguientes:

$$t \text{ calculada} = \frac{\beta_1 - \mu_1}{S_{\beta_1}}$$

$$S_{\beta_1} = \left[\frac{MCer}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Donde: μ_1 = valor teórico de β_1 (1); S_{β_1} = desviación estándar de β_1 .

Regla de decisión:

Si $|t \text{ calculada}| < t \text{ tablas } (n-2, 0.975)$ no se rechaza H_0 , se considera que el método de medición no tiene error consistente y que posee una $\beta_1=1$.

E) EXACTITUD DEL METODO.

La exactitud generalmente se refiere a la diferencia entre la media (\bar{X}) de una serie de resultados y el valor X , el cual se acepta como el valor real de la cantidad medida. Conociendo el valor real (X) se puede conocer con certeza la exactitud del método y esto se logra adicionando cantidades conocidas del compuesto por evaluar a placebos del producto. Como cada método analítico es aplicable a un rango específico de concentraciones, la exactitud del método podría variar dependiendo de esta concentración, por lo tanto es aconsejable hacer n ensayos de placebos adicionados de cuando menos 3 concentraciones diferentes que incluyan valores por arriba y por abajo de la concentración considerada como el 100%. Si la media y los límites de confianza dan valores poco confiables se pueden hacer 2 ensayos más. Si la inexactitud persiste, el método no es confiable.

EVALUACION.

Se lleva a cabo por medio del modelo probabilístico "t" planteando las siguientes hipótesis:

$$H_0 : M = 100\%$$

$$H_1 : M \neq 100\%$$

y empleando la relación que a continuación se presenta.

$$t \text{ calculada} = \frac{\bar{X} - M}{S_x / (n)^{1/2}}$$

Donde: M = % de recobro teórico (100%).

Regla de decisión:

Si $|t \text{ calculada}| < t \text{ tablas } (n-1, 0.975)$ no se rechaza H_0 y por tanto el método de medición tiene una exactitud con un 100% .

INTERVALO DE CONFIANZA DEL % RECUPERADO (IC).

$$IC = \bar{X} \pm t(n-1, 0.975) \left(\frac{S_x}{(n)^{1/2}} \right)$$

F) PRECISION DEL METODO.

Es una medida del grado de concordancia relativa entre mediciones repetidas independientes, de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (repetibilidad) o/y bajo diferentes condiciones (reproducibilidad).

El método se realiza con diferentes analistas y en diferentes días guardando una relación analista/día.

Se evalúa reproducibilidad, repetibilidad y precisión mediante el análisis de varianza considerando la siguiente tabla:

TABLA DE ANADEVIA

FV	GL	SC	MC	F
Analista (A) A _i	i-1	$\frac{\sum Y_{i..}^2}{jk} - \frac{Y_{...}^2}{1jk}$	$\frac{SC_A}{GL_A}$	$F_1 = \frac{MC_A}{MC_D}$
Día (D) D _{j(1)}	(j-1)1	$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{k} - \frac{Y_{...}^2}{jk}$	$\frac{SC_D}{GL_D}$	$F_2 = \frac{MC_D}{MC_E}$
Error (E) E _{k(1j)}	(k-1)1j	$\sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{i..}^2}{k}$	$\frac{SC_E}{GLE}$	—

Donde: k = replicaciones; i = analista; j = día.

EVALUACION DE REPRODUCIBILIDAD

H₀ : Hay reproducibilidad

H₁ : No hay reproducibilidad

Regla de decisión:

Si $F_1 < F_{tablas}$, el método es reproducible.

EVALUACION DE REPETIBILIDAD

H_0 : Hay repetibilidad

H_1 : No hay repetibilidad

Regla de decisión:

Si $F_2 < F_{tablas}$, el método es repetible.

EVALUACION DE PRECISION

H_0 : El método es preciso.

H_1 : El método no es preciso.

Regla de decisión:

Si el método de medición es reproducible y repetible, no se rechaza H_0 y por lo tanto se considera que el método es preciso.

G) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

La determinación de la estabilidad de la muestra se efectúa para proporcionar una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos después de un determinado tiempo de haber preparado las muestras, esto es, el tener la certeza de que las muestras preparadas no sufrirán descomposición antes de que sean cuantificadas.

Se almacenan muestras, previamente analizadas, en diferentes condiciones por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, obscuridad, luz blanca, etcétera.

Se reanalizan en el tiempo especificado dependiendo del criterio del analista.

Se evalúa utilizando el modelo probabilístico "t" de Dunnett.

EVALUACION.

Se efectúa considerando las siguientes fórmulas:

$$t_D = \frac{\bar{X}' - 100}{[MC_e \left(\frac{2}{r}\right)]^{1/2}}$$

$$MC_e = \frac{SCe}{GLE} = \frac{SCe}{t(r-1)}$$

$$SCe = \frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{i..}^2}{k}}{k}$$

Donde: t_D = "t" de Dunnett; \bar{X}' = media del valor de todas las soluciones; t = número de tratamientos; r = número de replicaciones.

Regla de decisión:

Si $|t_D \text{ calculada}| < t_D \text{ tablas}$ la muestra es estable.

Si $|t_D \text{ calculada}| > t_D \text{ tablas}$ la muestra es inestable.

$t_D \text{ tablas} (GLE, m, 0.95)$

Donde: m = número de comparaciones a realizar con el tratamiento control.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

En este estudio se analizaron tabletas comerciales que contienen furosemida y clorhidrato de amilorida, de acuerdo a la siguiente fórmula:

FORMULA:

Clorhidrato de amilorida	4.00 mg.
Furosemida	40.00 mg.
Excipiente, c.b.p.	1 tableta.

No se estudió la aplicabilidad del método en estudios de estabilidad.

El análisis de ambos principios activos se realizó mediante espectrofotometría visible (según las referencias II y XVI).

La validación del método analítico para este producto consistió en determinar los siguientes puntos:

ESPECIFICIDAD. Se efectuó mediante un barrido espectrofotométrico utilizando muestras de placebo (excipientes y furosemida ó clorhidrato de amilorida), estándares de referencia de cada fármaco y la formulación completa, tratados de la misma manera.

LINEALIDAD DEL SISTEMA. Se llevó a cabo mediante la realización del análisis por triplicado de diferentes soluciones estándar y en concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % considerando como el 100 % el

valor esperado. Esta determinación se realizó con muestras a las que se les calculó el por ciento de humedad (perdida por secado); para la furosemida se efectuó a 100°C hasta peso constante y para el clorhidrato de amilorida a 100°C a peso constante y con una presión de aproximadamente 5 torr.

PRECISION DEL SISTEMA. Se realizó con 10 muestras partiendo de una solución patrón y teniendo una concentración al 100 % del nivel normal del procedimiento.

LINEALIDAD DEL METODO. Se trabajó con muestras que contenían concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % , analizando cada una por triplicado. En la cantidad adicionada se consideró el por ciento de humedad del fármaco.

EXACTITUD DEL METODO. Se manejaron 10 muestras diferentes teniendo una concentración al 100 % .

PRECISION DEL METODO. Se realizó con 2 analistas y en 2 días, es decir se guardó una relación analista/día. Se trabajó con una concentración al 100 % .

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Se mantuvieron 3 muestras, previamente analizadas, en refrigeración, a temperatura ambiente en la oscuridad y a temperatura ambiente con luz blanca durante 3, 6 y 24 horas.

5.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES.

Para furosemda:

Etanol R.A.

Acido clorhídrico R.A.

Acido acético glacial R.A.

Solución de floroglucinol al 0.5 % en etanol.

Reactivo de color.

Mezclar 35 ml de ácido acético glacial, 35 ml de ácido clorhídrico y 10 ml de solución de floroglucinol al 0.5 % . Esta solución podrá ser utilizada después de 15 minutos a temperatura ambiente.

Para clorhidrato de amilorida:

Metanol R.A.

Ortofosfato de tributilo R.A. (tributil fosfato o fosfato de tributilo).

Solución de hidróxido de sodio 0.1 M

5.2. METODO ANALITICO PARA FUROSEMIDA.

Solución de Referencia.

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de S.Ref. de furosemida y transferirla cuidadosamente a un matraz volumétrico de 200 ml, disolver y llevar a volúmen con etanol.

Solución de la muestra.

Pesar la cantidad de polvo de tabletas equivalente a 50 mg de furosemida y colocarlos cuidadosamente a un matraz volumétrico de 200 ml, adicionar 100 ml. de etanol y agitar por diez minutos. Aforar con etanol a volúmen y homogenizar la solución. Filtrar desechando los primeros mililitros.

Procedimiento.

Transferir 1 ml de la solución de referencia y de la muestra a dos tubos de ensaye con tapón esmerilado respectivamente. A cada tubo adicionar 4 ml de reactivo de color al mismo tiempo que se les coloca en un baño con agua a 37°C , tapar, mezclar y mantener los tubos en el baño durante 10 minutos, al término del tiempo indicado colocarlos en un baño con agua a temperatura ambiente. Determinar las absorbancias de cada tubo exactamente 13 minutos después de haber adicionado el reactivo de color, utilizando una mezcla de 1 ml de etanol y 4 ml del reactivo como blanco, a una longitud de onda de 558 nm . La concentración de esta solución es de 50 µg/ml.

5.3. METODO ANALITICO PARA CLORHIDRATO DE AMILORIDA.

Solución de Referencia.

Pesar 50 mg de S.Ref. de clorhidrato de amilorida, pasar cuidadosamente a un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar 25 ml de metanol R.A. y agitar durante 10 minutos, agregar 150 ml de solución 0.1 M de hidróxido de sodio y agitar durante 30 minutos, llevar al aforo con la misma solución y mezclar.

Solución de la muestra.

Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino, pesar una porción de polvo equivalente a 50 mg de clorhidrato de amilorida y tratarla de manera similar a la preparación de la solución de referencia. Filtrar desechando los primeros mililitros.

Procedimiento.

Inmediatamente después de preparadas las soluciones de referencia y de la muestra, pasar por separado a dos tubos de centrifuga con tapón, 3 ml de cada solución, agregar a cada tubo 10 ml de solución de hidróxido de sodio 0.1 M y 20 ml de fosfato de tributilo; agitar vigorosamente por 2 min. y centrifugar durante 5 min. a alta velocidad. Pasar por separado, la capa superior de cada tubo, a matraces volumétricos de 50 ml y repetir la extracción de la capa acuosa con 20 ml de fosfato de tributilo. Reunir los extractos orgánicos en sus matraces respectivos, llevar al aforo con fosfato de tributilo y mezclar. Determinar las absorbancias de ambas soluciones a la longitud de onda de máxima absorbancia, a 363 nm, empleando como blanco de ajuste fosfato de tributilo.

5.4. RESULTADOS DE LA VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS.

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Se determinó la especificidad del método para conocer la respuesta espectrofotométrica a las longitudes de onda seleccionadas en la valoración de la mezcla de los dos activos. Se realizó el espectro de absorción de la furosemida de 750 a 450 nm y para el clorhidrato de amilorida de 450 a 225 nm.

EVALUACION




Para furosemida:

Analizando la figura 7 se observa que en la longitud de onda de máxima absorción (558 nm) no existe interferencia por parte del placebo (excipientes y clorhidrato de amilorida), y además la muestra sigue el mismo comportamiento que la sustancia de referencia

Para clorhidrato de amilorida:

Analizando la figura 8 se observa que en la longitud de onda de máxima absorción (363 nm) no existe interferencia por parte del placebo (excipientes y furosemida), además la muestra sigue el mismo comportamiento que la sustancia de referencia.

Para ambos principios activos no se rechaza H_0 y por consiguiente el método experimentado es específico.

-  Muestra
-  Placebo
-  S. Ref. de Furosemida

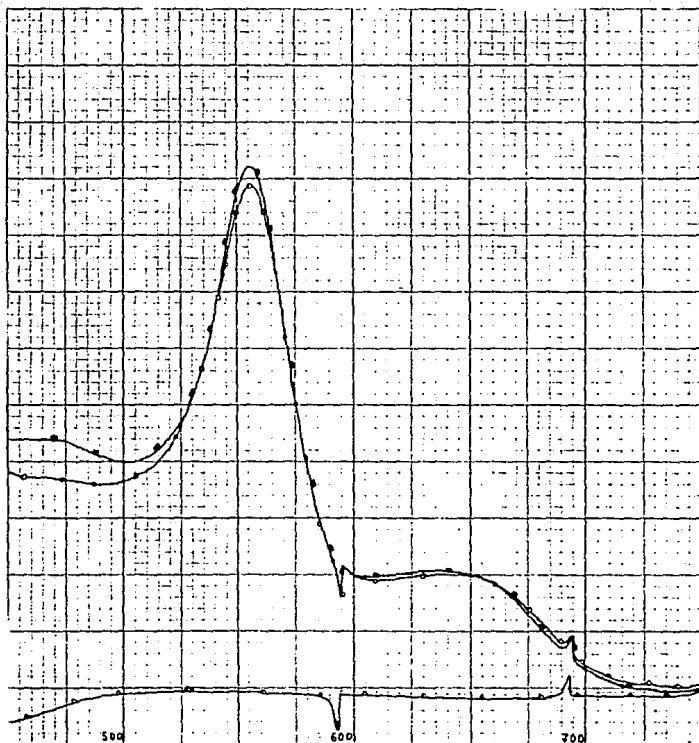


Figura 7. Espectro de absorción de furosemida.

- □ □ Muestra
- △ △ △ Placebo
- ■ ■ S. Ref. de Clorhidrato de amilorida

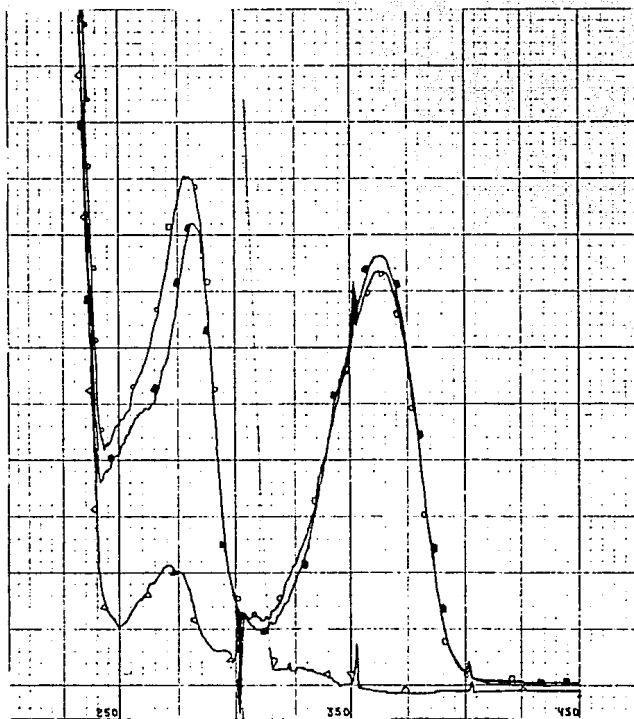


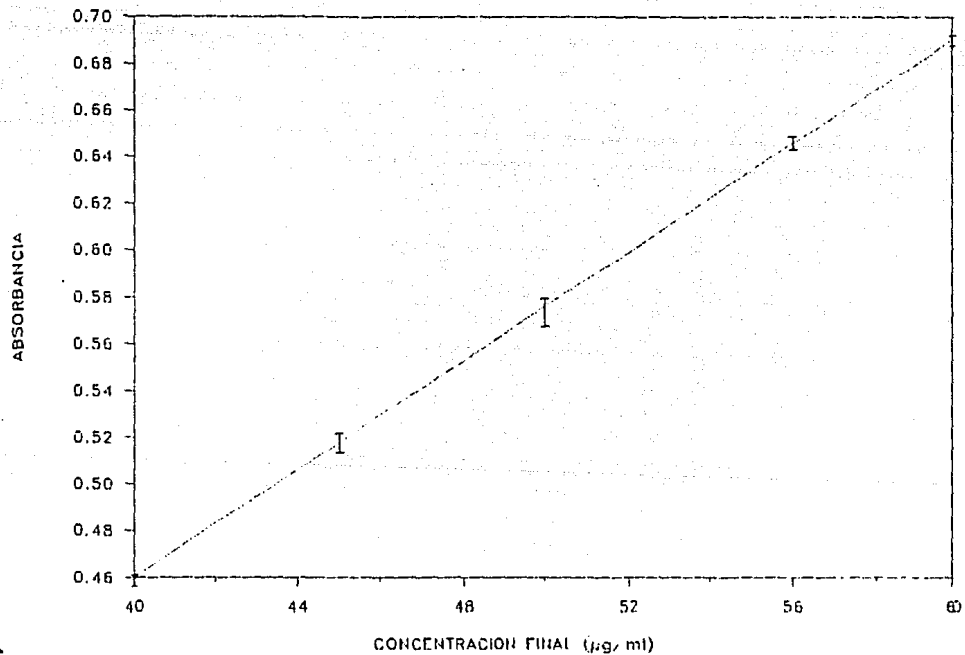
Figura 8. Espectro de absorción de clorhidrato de amilorida en fosfato de tributillo.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

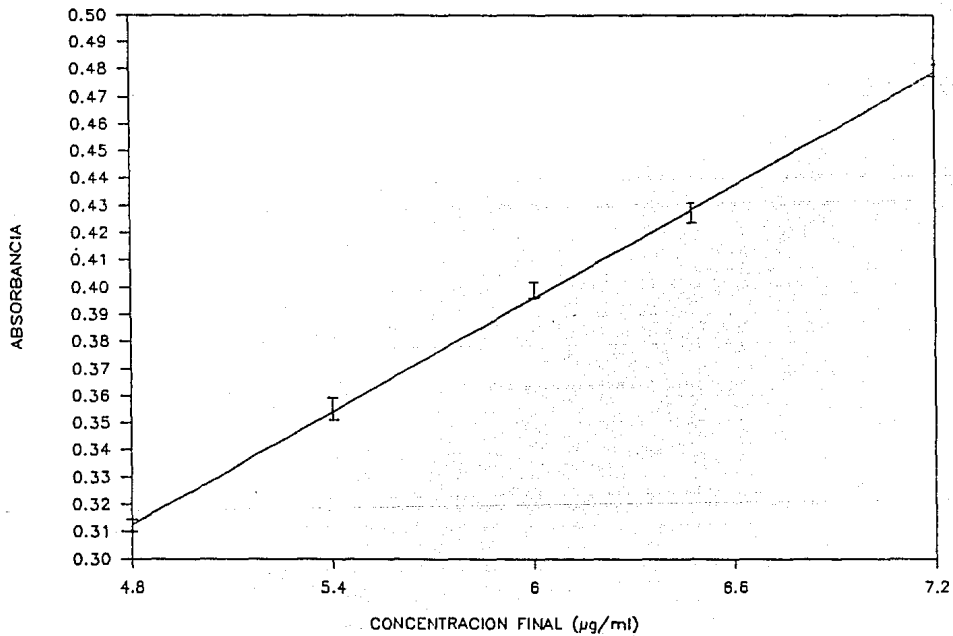
La siguiente tabla contiene los resultados de las lecturas espectrofotométricas en la prueba de linealidad.

Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)		Absorbancia	
Furosemda	Clorhidrato de amilorida	Furosemda	Clorhidrato de amilorida
40	4.80	0.460	0.313
40	4.80	0.459	0.311
40	4.80	0.457	0.310
45	5.40	0.516	0.355
45	5.40	0.517	0.353
45	5.40	0.515	0.354
50	6.00	0.573	0.398
50	6.00	0.575	0.402
50	6.00	0.575	0.399
56	6.48	0.640	0.425
56	6.48	0.642	0.427
56	6.48	0.644	0.427
60	7.20	0.691	0.478
60	7.20	0.688	0.481
60	7.20	0.693	0.478

Gráfica 1. FUROSEMIDA



Gráfica 2. CLORHIDRATO DE AMILORIDA



EVALUACION DE LINEALIDAD

Análisis de Varianza

	Furosemida	Clorhidrato de amilorida
β_1	0.0116	0.0694
β_0	-0.004	-0.0208
r^2	0.9995	0.9981
r	0.9997	0.9990

Tabla de Anadeva para Furosemida

FV	GL	SC	MC	F
r	1	0.1046	0.1046	28770.6430
er	13	4.72×10^{-5}	3.60×10^{-6}	
fa	3	1.19×10^{-5}	3.90×10^{-6}	1.1256
ep	10	3.53×10^{-5}	3.53×10^{-6}	
TCH	14	0.1046		

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de amlorida

FV	GL	SC	MC	F
r	1	5.01×10^{-2}	5.01×10^{-2}	6770.8492
er	13	9.62×10^{-5}	7.40×10^{-6}	
fa	3	7.22×10^{-5}	2.40×10^{-5}	10.0364
ep	10	2.40×10^{-5}	2.40×10^{-6}	
TCH	14	5.02×10^{-2}		

Para linealidad:

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{1}{13}) = 4.67$$

Para falta de ajuste:

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{3}{10}) = 3.71$$

Como 28770.643 y 6770.8492 son mayores que 4.67 no se rechaza H_0 y se puede considerar que el sistema de medición es lineal para ambos principios activos.

Dado que $1.1256 < 3.71$ podemos decir que no se tiene falta de ajuste en el caso de furosemida.

Con respecto al clorhidrato de amlorida como $10.0364 > 3.71$ evaluamos con r^2 . $r^2 = 0.9981$, por lo tanto podemos decir que no hay falta de ajuste y que el error puro es muy pequeño.

EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

	Furosemida	Clorhidrato de amilorida
S_{β_0}	0.1195	0.0828
t calculada	-0.0333	-0.2514

$$t_{tablas} (13, 0.975) = 2.1604$$

Como 0.0333 y 0.2514 son menores que 2.1604 no se rechaza H_0 , podemos considerar que el sistema de medición no tiene error constante y que posee una $\beta_0 = 0$.

PRECISION DEL SISTEMA.

A continuación se presentan los datos de absorbancia de las diferentes soluciones para calcular la precisión del sistema de furosemida y clorhidrato de amilorida.

Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)		Absorbancia	
Furosemida	Clorhidrato de amilorida	Furosemida	Clorhidrato de amilorida
50	6.0	0.569	0.400
50	6.0	0.572	0.393
50	6.0	0.570	0.396
50	6.0	0.571	0.404
50	6.0	0.572	0.403
50	6.0	0.568	0.400
50	6.0	0.573	0.390
50	6.0	0.570	0.394
50	6.0	0.574	0.396
50	6.0	0.570	0.400

EVALUACION

	Furosemida	Clorhidrato de amlorida
n	10	10
ΣY	5.7090	3.9760
ΣY^2	3.2593	1.5811
Y	0.5709	0.3976
S_y	1.8529×10^{-3}	4.526×10^{-3}
DER	0.32 %	1.14 %

Como 0.32% y 1.14% son menores que 1.5% no se rechaza H_0 y por lo tanto el sistema es preciso para ambos principios activos.

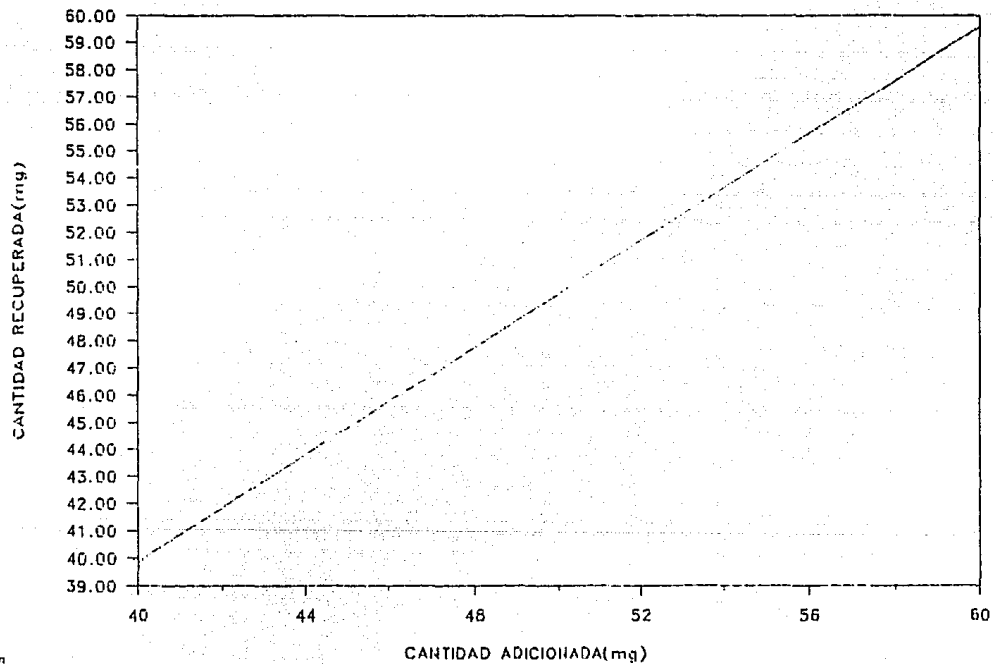
LINEALIDAD DEL METODO.

Las siguientes tablas presentan la cantidad recuperada de cada principio activo, considerando en la cantidad adicionada el por ciento de humedad de los fármacos.

Para furosemda:

Cantidad adicionada (mg)		Cantidad recuperada (mg)
Base húmeda	Base seca	
40.4	40.37	40.13
40.0	39.97	39.69
40.1	40.07	40.04
45.3	45.27	44.94
44.9	44.87	44.77
45.1	45.07	44.86
49.8	49.77	49.75
50.9	50.87	50.52
50.2	50.17	49.99
55.1	55.07	54.67
55.1	55.07	54.75
55.0	54.97	54.44
60.0	59.97	59.74
59.8	59.77	59.35
60.4	60.37	59.81

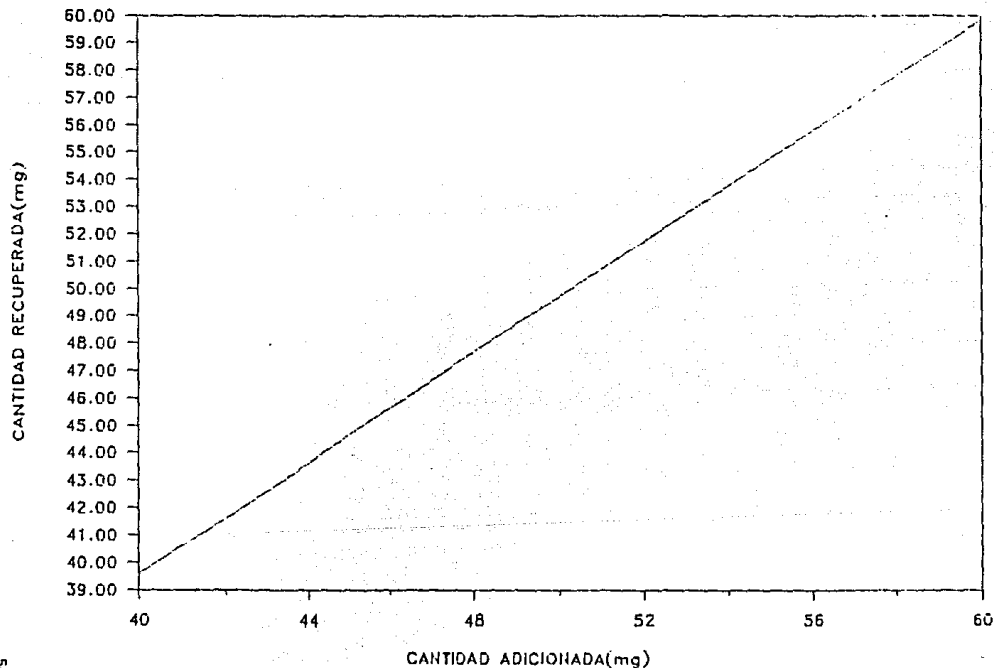
Gráfica 3. FUROSEMIDA



Para clorhidrato de amilorida:

Cantidad adicionada (mg)		Cantidad recuperada (mg)
Base húmeda	Base seca	
45.00	39.96	39.42
45.10	40.05	39.67
45.00	39.96	39.29
50.50	44.84	44.63
50.90	45.20	44.88
50.80	45.11	44.76
56.30	49.90	49.84
56.30	49.90	49.72
56.30	49.90	49.72
62.00	55.05	54.80
62.00	55.05	54.93
61.90	54.97	54.67
67.50	59.94	59.76
67.50	59.94	59.76
67.40	59.85	59.51

Gráfica 4. CLORHIDRATO DE AMILORIDA



EVALUACION DE LINEALIDAD

Análisis de varianza

	Furosemina	Clorhidrato de amilorida
β_0	0.3820	-0.9490
β_1	0.9868	1.0133
r^2	0.9997	0.9997
r	0.9998	0.9998

Tabla de Anadeva para Furosemina

FV	GL	SC	MC	F
r	1	724.5659	724.5659	39990.6090
er	13	0.2355	0.0181	
fa	3	-0.3721	-0.1240	
ep	10	0.6077	0.0607	
TCH	14	724.8014		

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de amilorida

FV	GL	SC	MC	F
r	1	764.4866	764.4866	43604.9730
er	13	0.2279	0.0175	
fa	3	0.0370	0.0123	0.6457
ep	10	0.1909	0.0191	
TCH	14	764.7145		

Para linealidad:

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{1}{13}) = 4.67$$

Para falta de ajuste:

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{3}{10}) = 3.71$$

Como 39990.6090 y 43604.9730 son mayores que 4.67 no se rechaza H_0 y por tanto hay linealidad en el método de medición para ambos principios activos.

Dado que -2.0413 y 0.6457 son menores que 3.71 no hay falta de ajuste para ambos fármacos.

EVALUACION DE LA ORDENADA AL ORIGEN

	Furosemida	Clorhidrato de amlorida
S_{β_0}	9.9492	10.2193
t calculada	0.0384	-0.0929

$$t_{\text{tablas}} (13, 0.975) = 2.1604$$

Como 0.0384 y 0.0929 son menores que 2.1604 no se rechaza H_0 , podemos considerar que el método de medición no tiene error constante y que posee una $\beta_0 = 0$.

EVALUACION DE LA PENDIENTE

	Furosemida	Clorhidrato de amlorida
S_{β_1}	0.0049	0.0048
t calculada	-2.6772	2.7423

$$t_{\text{tablas}} (13, 0.975) = 2.1604$$

Dado que 2.6772 y 2.7423 son mayores que 2.1604 se rechaza H_0 , se considera que el método de medición presenta error consistente y una $\beta_1 \neq 1$. En consecuencia posee error proporcional.

EXACTITUD DEL METODO.

El por ciento de recobro para las determinaciones de furosemida y clorhidrato de amilorida se reporta en la siguiente tabla.

Muestra	% Recobro	
	Furosemida	Clorhidrato de amilorida
1	101.07	100.74
2	100.84	99.20
3	99.19	100.56
4	99.89	99.42
5	100.04	99.53
6	99.92	99.78
7	100.55	99.20
8	99.03	99.60
9	99.98	99.60
10	100.06	99.87

EVALUACION

	Furosemida	Clorhidrato de amilorida
n	10	10
\bar{X}	100.057	99.75
Sx	0.6448	0.5227
t calculada	0.2795	-1.5125

$$t_{tablas} (9, 0.975) = 2.2622$$

Como 0.2795 y 1.5125 son menores que 2.2622 no se rechaza H_0 y podemos considerar que nuestro método de medición tiene una exactitud con un 100 % .

INTERVALO DE CONFIANZA DEL % RECUPERADO (IC)

$$IC = \bar{X} \pm t(n-1, 0.975) \left(\frac{Sx}{(n)^{1/2}} \right)$$

Para furosemida:

$$IC : 99.59 \text{ ----- } 100.52$$

del % de recobro.

Para clorhidrato de amilorida:

$$IC : 99.38 \text{ ----- } 100.12$$

del % de recobro.

PRECISION DEL METODO.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de furosemda y clorhidrato de amilorida por dos analistas y en dos días diferentes se muestran en las tablas siguientes.

Para furosemda:

		Analista (i)	
		% Recobro	
		1	2
D	1	100.60	101.53
		99.72	99.07
		100.40	101.64
i	2	100.19	101.08
		99.72	100.43
		99.59	99.78
a	(j)		

Para clorhidrato de amlorida:

		Analista (i)	
		% Recobro	
		1	2
D i a	1	99.54	99.69
		99.51	99.93
		99.61	99.85
(j)	2	100.07	100.19
		99.67	99.93
		99.75	99.85

Análisis de varianza

Tabla de Anadeva para Furosemda

FV	GL	SC	MC	F
Ai	1	0.9130	0.9130	4.5822
Dj(i)	2	0.3985	0.1992	0.2800
Ek(ij)	8	5.6927	0.7116	

Tabla de Anadeva para Clorhidrato de amilorida

FV	GL	SC	MC	F
At	1	0.1360	0.1360	1.7085
Dj(i)	2	0.1592	0.0796	3.4017
Ex(ij)	8	0.1871	0.0234	

EVALUACION DE REPRODUCIBILIDAD

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{1}{2}) = 18.51$$

Como 4.5822 y 1.7085 son menores que 18.51 no se rechaza H_0 y por consiguiente el método es reproducible.

EVALUACION DE REPETIBILIDAD

$$F_{\text{tablas}} (0.05, \frac{2}{8}) = 4.46$$

Dado que 0.2800 y 3.4017 son menores que 4.46 no se rechaza H_0 y por lo tanto existe repetibilidad en el método de medición.

EVALUACION DE PRECISION

Para ambos principios activos el método de medición cumple con los parámetros anteriores, por consiguiente no se rechaza H_0 y por tanto el método es preciso.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

La cuantificación de furosemida y clorhidrato de amilorida después de mantener las soluciones durante 3, 6 y 24 horas en las condiciones señaladas anteriormente, presentaron los siguientes resultados:

Para furosemida:

Datos iniciales:

Muestra	% Recobro
1	100.19
2	99.72
3	99.59

Datos finales:

		C o n d i c i ó n		
		% Recobro		
		Luz Blanca	Obscuridad	Refrigeración
T i e	3	80.76	101.86	101.36
		94.69	99.16	100.65
		90.26	100.92	99.26
m p o	6	78.24	100.86	101.36
		77.31	99.16	100.32
		82.10	100.59	101.42
hrs	24	75.06	101.53	101.20
		75.49	100.98	100.16
		75.77	100.76	99.92

Para clorhidrato de amilorida:

Datos iniciales:

Muestra	% Recobro
1	100.19
2	99.93
3	99.85

Datos finales:

		C o n d i c i ó n		
		% Recobro		
		Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
T l e	3	99.94	100.19	99.68
		99.93	100.18	99.67
		99.60	100.11	99.85
m p o	6	99.57	99.82	99.57
		99.81	99.81	99.56
		99.99	100.25	99.74
hrs.	24	99.46	100.23	100.48
		99.20	99.71	98.95
		101.16	99.63	99.63

$t_D \text{ tablas } (20, 9, 0.05) = 2.95$

td calculada para furosemida

		Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
T (hrs)	3	5.6180	0.3195	0.2064
	6	10.2137	0.2899	0.6046
	24	12.0716	0.5357	0.2113

td calculada para clorhidrato de amlorida

		Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
T (hrs)	3	- 0.4854	0.4388	- 0.7323
	6	- 0.5759	- 0.1097	- 1.0339
	24	- 0.1646	- 0.3949	- 0.8502

Para furosemida:

En los tres tiempos, en presencia de luz blanca $|td\ calculada| > 2.95$ por lo que la muestra es inestable en ésta condición.

En los otros casos $|td\ calculada| < 2.95$ por consiguiente consideramos que la muestra es estable durante 24 horas.

Para clorhidrato de amlorida:

En todos los casos $|td\ calculada| < 2.95$ por tanto podemos considerar que la muestra es estable durante 24 horas en las condiciones probadas.

6. ANALISIS DE RESULTADOS.

La validación de un método analítico es una etapa importante en el desarrollo del mismo ya que esta asegurará que los resultados obtenidos sean confiables. En el análisis de mezclas de fármacos con frecuencia se presentan interferencias que originan que la respuesta no sea debida exclusivamente al compuesto químico que se está cuantificando, por lo cual el proceso de validación cobra aún mayor importancia.

En el desarrollo de este trabajo se verificó la confiabilidad del método para la cuantificación de furosemida y clorhidrato de amilorida en tabletas, el cual puede ser utilizado en el control de calidad de este medicamento. La aplicación de este método para estudios de estabilidad requiere la determinación de nuevos parámetros que incluyan la adición de productos de degradación de los activos sometiendo a condiciones drásticas de pH, temperatura, luz, etc. con objeto de conocer la especificidad del mismo.

En la primera parte de este trabajo se estudió el grado de interferencia que presentaba un principio activo con respecto al otro en los métodos de cuantificación farmacopeicos (II y IV). Para esto se efectuaron barridos en las regiones ultravioleta y visible del espectrofotómetro. Los resultados obtenidos mostraron que no era posible su aplicación en la cuantificación de la mezcla de furosemida y clorhidrato de amilorida ya que a la longitud de onda de máxima absorción reportada para cada fármaco se presenta interferencia del otro.

De acuerdo a lo reportado por Casassas, E. (XVI) la cuantificación

espectrofotométrica de la furosemida se puede llevar a cabo en la región visible, donde no presenta absorción el clorhidrato de amilorida. Este método consiste en una hidrólisis ácida de la furosemida previa a un desarrollo de color producido por el producto de condensación de floroglucinol con el furfuraldehído formado por la ruptura de la molécula del activo. En la figura 7 se puede observar que no existe interferencia del placebo en la cuantificación de la furosemida a la longitud de onda de 558 nm y por consiguiente el método es específico. Es claro que este método no puede ser utilizado para estudios de estabilidad dado que uno de los posibles productos de degradación de la furosemida es el mismo producido durante la reacción de cuantificación.

El método de análisis del clorhidrato de amilorida realizado en este trabajo, reportado en la Farmacopea Británica (II) se reprodujo en el laboratorio teniendo algunas dificultades técnicas en la separación de las fases por centrifugación, por lo cual tratando de evitar este paso se intentó separarlas en el embudo de separación mediante la utilización de cloruro de sodio y alcohol isobutílico, también utilizando disolventes afines al fármaco como dimetilformamida y acetona pero desafortunadamente no se obtuvieron resultados positivos, por lo que se continuó el trabajo tal como se especifica en la referencia. Como puede observarse en la figura 8, en las condiciones de análisis no existe interferencia a 363 nm que es donde se presenta el máximo de absorción para el clorhidrato de amilorida, por lo tanto se consideró que el método era específico para éste fármaco.

Por lo anteriormente expuesto se decidió realizar el método analítico por espectrofotometría visible para la valoración de ambos principios

activos en las tabletas y por lo tanto se procedió a la validación del mismo.

Como puede observarse en las tablas presentadas anteriormente, los resultados son aceptables. Analizando las gráficas 1 y 2 se observa la tendencia lineal del sistema tanto en la cuantificación de furosemida como de clorhidrato de amilorida. En ambas se presenta una ordenada al origen igual a cero.

Los métodos llevados a cabo son bastante precisos ya que la DER calculada para el sistema fué de 0.32 % para furosemida y de 1.14 % para clorhidrato de amilorida.

En las gráficas 3 y 4 se muestra la tendencia lineal del método en ambos fármacos. Para los dos activos se presenta una ordenada al origen de cero y una pendiente diferente de uno por lo que presenta error consistente y en consecuencia posee error proporcional.

Se considera que el método de medición tiene una exactitud con un 100 % dado que se obtuvieron valores menores (0.2795 para furosemida y 1.5125 para clorhidrato de amilorida) a la $t_{0.05}$ (2.2622).

Los resultados obtenidos en la precisión del método muestran que el método de medición es reproducible, repetible y por consiguiente es preciso ya que cumple con los parámetros descritos anteriormente.

En la prueba de la estabilidad de la muestra sólo para furosemida hay inestabilidad de la misma al someterla bajo la condición de luz blanca, lo que implica que deberá ser guardada en obscuridad o/y refrigeración hasta que sea cuantificada, considerando 24 horas como el tiempo máximo de almacenamiento. En el caso del clorhidrato de amilorida se considera que la muestra es estable durante 24 horas en las condiciones ya descritas.

7. CONCLUSIONES.

Analizando los resultados obtenidos podemos decir que el método analítico satisface los puntos establecidos en la validación. Como consecuencia de ello, se concluye que dicho método es confiable para el análisis cuantitativo del producto terminado.

8. SUGERENCIAS.

Para el análisis de estabilidad del producto es conveniente proponer otros métodos de análisis para furosemida y clorhidrato de amilorida, ya que en este trabajo no se determinó la especificidad para cuando existan posibles productos de degradación.

El método reportado en este trabajo requiere bastante tiempo para llevarse a cabo por lo cual tiene una aplicación limitada para un gran número de muestras.

9. BIBLIOGRAFIA.

(I). The Merck Index. AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS. Tenth Edition. Merck & CO., Inc. U.S.A. (1983). 60, 615.

(II). BRITISH PHARMACOPOEIA. Vol. I y II. Her Majesty's Stationery Office at the University Press, Cambridge. London (1980). 27, 205, 731, 773.

(III). The Pharmaceutical Codex. INCORPORATING THE BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX. Eleventh Edition. The Pharmaceutical Press. London (1979). 28, 374.

(IV). THE PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA. XXI Edition. United States Pharmacopelal Convention, Inc. U.S.A. (1985). 35, 452, 453, 1442.

(V). Clarke, E.G.C., etal. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS. Vol. 1 y 2. The Pharmaceutical Press. London (1978). 350, 351.

(VI). Remington. FARMACIA. 17^a Edición. Médica Panamericana. Argentina (1987).

(VII). Martindale. THE EXTRA PHARMACOPOEIA. 27th Edition. The Pharmaceutical Press. London (1977). 543-4, 554-9.

(VIII). Orizaga, S.J., et al. GUIA PROFESIONAL DE MEDICAMENTOS. Segunda Edición. El Manual Moderno S.A. de C.V. México (1987). 546, 553, 557.

(IX). Florey K., et al. ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES. Vol. 15. Academic Press, Inc. U.S.A. (1986). 1-34.

(X). Goodman, G.A., et al. LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. Sexta Edición. Médica Panamericana S.A. México (1982). 886, 892-3, 898.

(XI). Connors, K.A. CURSO DE ANALISIS FARMACEUTICO. 2ª Edición. Reverté, S.A. España (1981). 218.

(XII). Willard, H.H., et al. METODOS INSTRUMENTALES DE ANALISIS. Cía. Editorial Continental, S.A. de C.V. México (1984).

(XIII). Salim, E.F., Haussler, A. and Vaughan J.B. "Qualitative and Quantitative Tests for Furosemide". J. Pharm. Sci. 57/4/640-641 (1968).

(XIV). Ghanekar, A.G., et al. "Stability of Furosemide in Aqueous Systems". J. Pharm. Sci. 67/6/808-811 (1978).

(XV). FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5ª Edición. Secretaría de Salud. México (1988).

(XVI). Casassas, E., Fabregas, J.L. "Spectrophotometric determination of furosemide with phlorogucinol". Analytica Chimica Acta. 106/151-154 (1979).

(XVII). Bowman, W.C., et al. FARMACOLOGIA. BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS. APLICACIONES CLINICAS. 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México (1984). 27.21, 27.22, 27.29, 27.30.

(XVIII). Rowbotham, P.C., Stanford J.B., Sugden, J.K. "Some aspects of the photochemical degradation of frusemide". Pharm. Acta Helv. 51/10/304-307 (1976).

(XIX). Cruz, J.E., Maness, D.D., Yakatan, G.J. "Kinetics and mechanism of hydrolysis of furosemide". International Journal of Pharmaceutics. 2/275-281 (1979).

(XX). Pharmacopelal Forum. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays". The United States Pharmacopelal Convention, Inc. U.S.A. (1986)

(XXI). Alcántara, P.A., Sánchez, R.J.F. Material de apoyo al curso "Validación de métodos analíticos".