

17
2j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA
CUANTIFICAR HIDROGENOFUMARATO DE KETO-
TIFENO, EN SOLUCION, POR ESPECTROFOTO-
METRIA (U.V)."

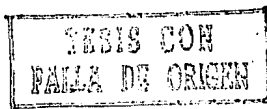
T E S I S

Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

ADRIANA JOSEFINA GRANADOS PEREZ

MEXICO, D. F.

ABRIL 1990





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
III. ANTECEDENTES TEORICOS	3
A. PROPIEDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO, HIDROGENO- FUMARATO DE KETOTIFENO	3
III. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	5
A. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA FORMAS FARMACEUTICAS	5
1. DEFINICION	5
B. GUIA PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	5
1. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	6
2. ESPECIFICIDAD.....	8
3. ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD	9
4. LIMITE DE DETECCION	12
5. PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO	13
6. REPRODUCIBILIDAD.....	14
7. LINEALIDAD DEL METODO	15
8. TOLERANCIA	17
9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	18
C. REVALIDACION	18
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
V. OBJETIVOS	21

	Pág.
VI. HIPOTESIS	22
VII. EQUIPO Y MATERIAL	23
VIII. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
A. METODO	26
IX. RESULTADOS	28
X. DISCUSION DE RESULTADOS	45
XI. CONCLUSION	47
XII. BIBLIOGRAFIA	48
A. APENDICE	50

I. INTRODUCCION

Los problemas que se presentan en el campo del análisis farmacéutico son cada día mayores debido al gran incremento de nuevos productos, con principios activos nuevos y excipientes novedosos por lo que se requieren de métodos de análisis apropiados (1). Sin embargo, ahora se cuenta con instrumentación analítica más sofisticada, de gran precisión y sensibilidad que nos puede ayudar a resolver los problemas analíticos que se nos presenten, siempre y cuando se elija el método apropiado. Una vez resuelto éste, el problema es buscar métodos analíticos confiables que nos permitan asegurar la calidad durante las diferentes etapas de fabricación y producto terminado; además que permita verificar que el medicamento al ser administrado cumpla debidamente con las funciones terapéuticas deseadas lo cual solo podrá conseguirse mediante la validación del método(12).

El propósito de este trabajo consiste en validar un método analítico que permita cuantificar el contenido de Hidrógenofumarato de Ketotifeno (antiasmático) en una solución pediátrica.

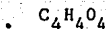
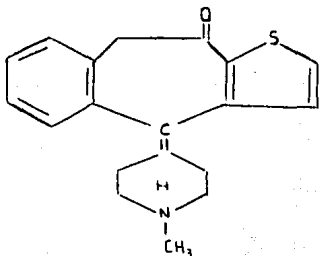
Para cuantificar el contenido del principio activo (Hidrógenofumarato de Ketotifeno) en la solución existen tres métodos: ultravioleta, cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos a alta resolución. Estos métodos fueron validados en la casa matriz, y estimando que las condiciones en México (equipo, reactivos, medio ambiente, etc.) no son las mismas, se procedió a validar el método que se consideró más económico, rápido, eficaz y seguro; siendo el método elegido el espectrofotométrico en la región de U.V.

Se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos: linealidad del sistema, especificidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y linealidad del método.

II. ANTECEDENTES TEORICOS

A. PROPIEDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO, HIDROGENOFUMARATO DE KETOTIFENO.

1. Estructura, propiedades físicas y químicas.



Nombre químico: 4- (-1-metil-4-piperidilina)
 -4-benzo (4,5) ciclohepta (-1,2-
 b) tiofeno-10 (9H)-uno Hidrogeno
 fumarato.

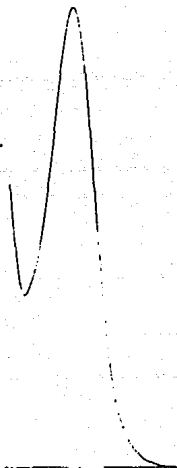
Fórmula condensada: $C_{19}H_{19}NO_4$, $C_4H_4O_4$

Peso molecular: 425.50

Apariencia: Polvo microcristalino blanco.

Solubilidad: Soluble en metanol y cloroformo.

Absorción Ultravioleta: En metanol en un rango de 240 a 410 nm. 20 mcg/ml. Ref. (1)



Empaque. Conservese en envases protegidos de la luz

III. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA

A. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS PARA FORMAS FARMACEUTICAS

1. DEFINICION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Consiste en la evaluación de la precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, etc, del método analítico (8).

Con el objeto de producir los mejores resultados analíticos posibles es importante considerar todas las variables del método analítico: reactivos, aparatos, instrumentos, analista, etc.

B. GUIA PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1. Linealidad y precisión del sistema
2. Especificidad
3. Especificidad en estabilidad

4. Límite de detección
5. Precisión y exactitud del método
6. Reproducibilidad
7. Linealidad del método
8. Tolerancia
9. Estabilidad de la muestra

1. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA

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

a. La linealidad de la curva de calibración debe ser evaluada por análisis duplicados de diferentes soluciones de la sustancia de interés, usualmente a 50, 80, 100, 120 y 150% del valor esperado.

b. Debe ser representada la gráfica de la curva.

c. Calcular: media (\bar{x}), desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER), pendiente (m), intercepto (b), coeficiente de correlación (r), error estándar de la regresión (SY/X), coeficiente de determinación (r^2).

Criterio:

DER \leq 0.7 %

r \geq 0.99

M = 1

B = 0

El método es lineal si cumple satisfactoriamente con lo anterior o cuando la desviación de la linealidad no afecte los resultados en la región de análisis usual por más de \pm 1%.

PRECISION

Definición.- Es la dispersión de los datos con respecto a un valor central que no necesariamente es el valor real (100%). Efectuados por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

a. Para determinar este parámetro, efectuar 6 soluciones como mínimo de la sustancia de interés al 100% del nivel normal del procedimiento.

b. Calcular: La media (\bar{X}), la desviación estándar (DE), la desviación estándar relativa (DER), y el coeficiente

de variación (CV).

Criterio:

DER: Máximo 2%

2. ESPECIFICIDAD

Definición.- Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta, debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

a. Analizar placebos de producto con el método propuesto $\leq 2\%$.

b. Identificar las respuestas del (los) activo (s), excipientes (en caso de tenerla) y de otras sustancias auxiliares.

c. En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebos añadidos de estos y de las sustancias de interés y se analizan con el método propuesto.

CRITERIO

Confirmar que el método desarrollado sea capaz de cuantificar las sustancias de interés de los de otros componentes de la formulación, productos de degradación y sustancias relacionadas.

3. ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD

Debe ser establecido cuando el método sea utilizado como indicativo de estabilidad.

Las condiciones de almacenamiento deben ser definidas en términos de temperatura, luz, hidrólisis (ácida y básica), y oxidación con el fin de acelerar cualquier reacción en el producto que puede indicar inestabilidad (productos de degradación).

a. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto, en un horno a 70 - 120°C o a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés, durante un número apropiado de días (2 a 4 semanas).

b. Exponer la sustancia de interés, el placebo

y la muestra del lote del producto a la luz U.V. o a la luz normal, y/o a humedad, con el objeto de forzar la descomposición.

c. Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o a 10-12 y colocarlas a 60-80°C durante 2-4 semanas hasta obtener una degradación adecuada.

d. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, deberán degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2-4 semanas a temperatura ambiente y por hidrólisis ácida o básica (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60-80°C durante 2-4 semanas hasta obtener una concentración del ingrediente en estudio, disminuido de 10 a 25% con respecto a la original.

e. Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación), utilizando por lo menos dos de las técnicas cromatográficas siguientes:

- Cromatografía de líquidos de alta resolución
- Cromatografía de gases
- Cromatografía de capa fina.

f. Verificar que cada producto de degradación pueda ser separado de la substancia de interés utilizando el método desarrollado.

g. Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

CRITERIO

Si el experimento demuestra que la señal analítica solo se debe a la substancia de interés, el método se llamará específico y podrá ser utilizado como indicativo de estabilidad.

En caso contrario, se deberá estimar el efecto aparente de las otras substancias sobre la señal analítica y se estimará en cuanto y cuando este efecto podría ser importante.

INTERFERENCIAS
DEL PLACEBO.

INTERFERENCIAS DE
PRODUCTOS DE - -
DEGRADACION.

Solución,
Caps., y Tabs.

No interfer.

2 %

Suspensiones y semisólidos	2 %	2 %
Métodos CLAR	No detectables	No detectables

4. LIMITE DE DETECCION

Definición.- Es la mínima concentración de una substancia en función de la relación señal/ruido en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

a. Adicionar cantidades exactas del fármaco correspondientes a 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 25% de la concentración mínima esperada al fluido biológico en estudio o a placebo de la formulación.

b. Graficar: Concentración adicionada Vs. respuesta analítica medida.

c. Determinar límites de confianza al 95% de la recta de regresión.

CRITERIO

El menor límite de detección es la concentración de la muestra, que tiene una señal a la relación de ruido.

Criterio:

	PORCIENTO DE RECOBRO
Soluciones, caps., y tabs.	98 - 102 %
Suspensiones y semisólidos	97 - 103 %
Métodos CLAR	98 - 102 % DER 2 %
Métodos Tritimétricos	99 - 101 % DER 1 %
Métodos de disolución	96 - 104 % DER 3 %

5. PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO

Precisión (repetibilidad). Es la dispersión de los datos con respecto a un valor central que no necesariamente es el valor real (100%). Efectuados por un solo analista usando los mismo aparatos y técnicas. (5)

Exactitud.- Es la dispersión de los datos con respecto a un valor central que es el valor real (100%), (5) .

Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la substancia.

a. Analizar como mínimo 6 muestras preparadas por adición de la substancia de interés en 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada a placebo del producto.

b. Calcular: Por ciento de recobro, desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER), intervalo de confianza al 95%, χ^2 (para la precisión) y t de student (para la exactitud).

6. REPRODUCIBILIDAD

Definición.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas, diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

a. Diferente analista en 2 días distintos (analista/días).

b. Un analista en 2 días y un segundo analista en 1 de los 2 días.

c. Dos analistas ambos en los 2 días.

d. Tres analistas todos en los 3 días.

Será determinada, por lo menos con: dos analistas, dos días, tres determinaciones/analista/día para hacer un total de doce determinaciones.

Calcular: la media (\bar{X}), desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER), coeficiente de variación (CV) y análisis de varianza.

Criterio:

- | | |
|-----------------|---------|
| - Métodos CLAR | DER 2 % |
| - Otros métodos | DER 3 % |

7. LINEALIDAD DEL METODO.

Definición.- Es 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).

a. Realizar análisis duplicados preparados por la adición de la sustancia de interés, usualmente a 50, 80, 100, 120 y 150% de la cantidad etiquetada a placebo del producto.

b. Representación gráfica de la curva.

c. Calcular: la medida (\bar{X}), desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER), pendiente (m), intercepto (b), coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2) y error estándar de la regresión (SY/X).

Criterio:

$$DER \leq 0.7 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$m = 1$$

$$b = 0$$

8. TOLERANCIA

Definición.- Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, sistemas de elución, tipos de empaque y condiciones ambientales, etc.

Por ejemplo:

Para la cromatografía de capa fina: variando la relación de los solventes usados para la separación; saturación de la cámara de CCF con el sistema de solventes, etc.

Para la cromatografía de gases: variando la temperatura del detector, la temperatura del horno, o la temperatura del inyector, variando dos de ellos a todos ellos, variando el % de fase líquida, etc.

CRITERIO

En el caso de técnicas cromatográficas, calcular los parámetros cromatográficos (I.E. resolución), en cada

caso, y establecer el efecto de la variación.

9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Definición.- Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

a. Almacenar las muestras analizadas a temperatura ambiente o en las condiciones acostumbradas, por el tiempo acostumbrado o por algunas horas.

b. Después de transcurrido este tiempo, reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación.

CRITERIO

Si las muestras presentan algún cambio químico o físico, establecer las condiciones de almacenamiento adecuado para las muestras preparadas.

C. REVALIDACION

Por revalidación se entiende la repetición de una

validación y resulta necesaria cuando se han alterado las condiciones bajo las cuales se ha llevado a cabo una validación. Por ejemplo:

- Modificaciones en los procesos de fabricación o en los reactivos.

- Cambio de proveedor o de la calidad de los reactivos, fases estacionarias y similares.

- Empleo de aparatos de medición nuevos.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Zaditen es una solución pediátrica que es eficaz en la prevención de ataques asmáticos por su notable propiedad antianafiláctica. Además, ejerce un efecto inhibitor sostenido sobre las reacciones histaminicas (1). Dicha solución posee como principio activo Hidrógenofumarato de Ketotifeno.

Para cuantificar el contenido del principio activo, existen tres métodos: ultravioleta, cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos a alta resolución. Estos métodos fueron validados en la casa matriz, y estimando que las condiciones en México (equipo, reactivos, medio ambiente, etc.) no son las mismas, se procedió a validar el método que se consideró más económico, rápido, eficaz y seguro; siendo el método elegido, el Espectrofotométrico en la región de U.V.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Validar un método analítico que cuantifique el contenido de Hidrógenofumarato de Ketotifeno, en una solución pediátrica, por espectrofotometría en la región de U.V.

B. PARTICULARES

1. Determinar la linealidad del sistema
2. Determinar la especificidad del método
3. Determinar la precisión del método
4. Determinar la exactitud del método
5. Determinar la reproducibilidad del método
6. Determinar la linealidad del método.

VI. HIPOTESIS

El método analítico por ultravioleta que cuantifica el contenido de Hidrógenofumarato de Ketotifeno en una solución pediátrica al ser validado bajo las condiciones reales del Laboratorio en México podrá ser utilizado como un método rutinario.

VII. EQUIPO Y MATERIAL

A. Equipo

Espectrofotómetro	Shimadzu uv/vis
Balanzas analíticas	Metler AE 50 y 166
Balanza granataria	
Rotavapor	Buchi/ R 110
Refrigerador	Acroz

B. Material

	Descripción
Matraces aforados	25, 50 y 100 ml
Pipetas volumétricas	2, 10, y 20 ml
Embudos de separación	125 ml
Probetas	40 ml y 100 ml
Vasos de precipitado	250 ml
Matraces de bola	250 ml
Embudos de plástico de talle corto	
Soporte universal	
Anillos de hierro	
Espátula	
Papel filtro Whatman	No. 4
Pisetas de plástico	

(Todo el material de vidrio es marca Pyrex)

C. Sustancias.**Hidrógenofumarato de Ketotifeno****Brasilea****Hidróxido de Sodio (G.R)****Merck****D. Líquidos.****Disolventes orgánicos****Merck****Solución placebo**

VIII. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. METODO

Preparación del Estándar. Pesar aproximadamente y con exactitud 12.5 mg de Hidrógenofumarato de Ketotifeno, disolver en 25 ml. con el disolvente A. Tomar 2 ml y llevar al volumen en un matraz volumétrico de 50 ml con el disolvente A.

Extracción.- Pesar aproximadamente 22 gr. de solución en un embudo de separación de 125 ml y adicionar 20 ml de la solución reactivo A, extraer con cuatro porciones de 40 ml con el disolvente B, agitar cada uno por 4 minutos y filtrar los extractos a través de papel filtro número cuatro dentro de un matraz de bola y secar en un rotavapor a 35°C. Disolver el residuo en 10 ml del disolvente A. Tomar 2 ml y llevar a un matraz aforado de 50 ml con el disolvente A. Leer al espectrofotómetro en la región de U.V.

Cálculos

$$A_p \times F_{d \text{ sts}} \times F_{d \text{ mta}} \times d = \text{mg. de solución} / 100 \text{ ml.}$$

As

A_p	=	Absorbancia del problema
A_s	=	Absorbancia del estándar
$F_{d \text{ std}}$	=	Factor de dilución del estándar
$F_{d \text{ mta}}$	=	Factor de dilución de la muestra
d	=	Densidad de la solución g/ml

IX. RESULTADOS

A. EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO

Los parámetros estadísticos evaluados en una validación para producto terminado en este trabajo fueron los siguientes :

1. Linealidad del Sistema
2. Especificidad
3. Precisión (repetibilidad) del Método
4. Exactitud del Método
5. Reproducibilidad
6. Linealidad del Método

1. Linealidad del Sistema

Tabla 1. Linealidad determinada para el sistema, utilizando el estándar de Hidrógenofumarato de Ketotifeno.

Cantidad adicionada (mcg/ml)	absorbancia
12.0	0.575
16.0	0.631
20.0	0.695
22.0	0.725
27.0	0.800

Fig. 1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

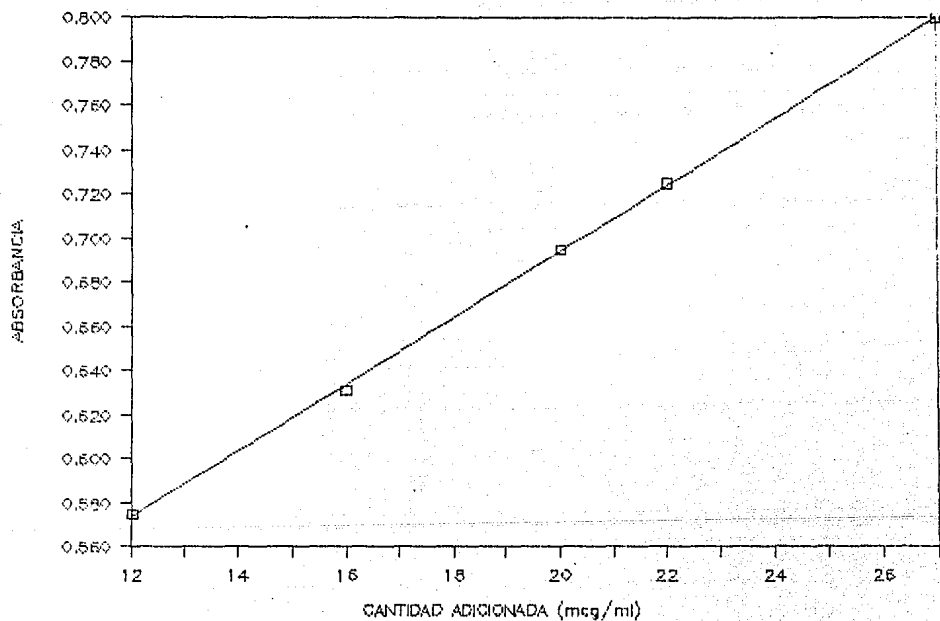


Tabla 2. Parámetros evaluadas en la linealidad del sistema.

Pendiente de la recta (m)	0.028
Ordenada al origen (b)	0.3502
Coefficiente de correlación (r)	0.9980

2. Especificidad

Tabla 3. Especificidad del método analítico

	Absorbancia
Placebo	0.025
	0.023
	0.025
Estándar	0.690
	0.699
	0.698
Placebo adicionado	0.698
	0.698
	0.689

3. Precisión (Repetibilidad) y exactitud.

Tabla 4. Repetibilidad y Exactitud del Método Analítico.

+ mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperados
4.416	4.329	98.029
4.416	4.352	98.550
4.416	4.360	98.731
4.416	4.371	98.980
4.416	4.371	98.980
5.520	5.506	99.748
5.520	5.506	99.748
5.520	5.522	100.036
5.520	5.506	99.748
5.520	5.498	99.601
6.620	6.512	98.309
6.624	6.506	98.218
6.624	6.489	97.961
6.624	6.521	98.445
6.624	6.569	99.169

+ Adicionados a 20 ml. de placebo

Calculos para la determinación de la Repetibilidad, utilizando los datos de porcentaje de recobro.

$\bar{X} = 98.9502$	$S = 0.6968$
$n = 15$	$\alpha = 0.05$
$g_1 = 14$	$\chi^2_1 = 26.119$

Hipótesis de Contraste :

$$H_0 \quad \sigma \leq 1 \%$$

$$H_1 \quad \sigma > 1 \%$$

$$\chi^2_1 \text{ calc.} = 6.7991$$

Area de aceptación :

$$5.009 < 6.7991 < 26.119$$

Intervalo de confianza :

$$0.26032 \quad 0.6732 \quad 1.3574$$

Sí, es aceptado H_0 por lo que el método es preciso.

Cálculos para la determinación de la Exactitud,
utilizando los datos de porcentaje de recobro.

\bar{X}	=	98.9502	S	=	0.6968
n	=	15	S/ \sqrt{n}	=	0.1862
gl	=	14	t student	=	\pm 2.1448

Hipótesis de Contraste :

$$\begin{aligned}
 H_0 & \quad \mu = 100 \% \\
 H_1 & \quad \mu \neq 100 \% \\
 t \text{ calc.} & \quad = -5.6363
 \end{aligned}$$

Area de aceptación :

$$-2.1448 < -5.6363 < 2.1448$$

H_0 , no es aceptado, por lo que el método es considerado
no exacto, bajo las condiciones establecidas

5. Reproducibilidad.

Tabla 5. Reproducibilidad del método analítico.

días	mtas	+ mg. adicionados	mg recuperados	% recuperados
1	1	5.520	5.510	99.818
	2	5.520	5.520	100.000
	3	5.520	5.428	98.333
	4	5.520	5.403	97.880
	5	5.520	5.470	99.094
	6	5.520	5.500	99.637
2	1	5.520	5.464	98.985
	2	5.520	5.415	98.097
	3	5.520	5.414	98.079
	4	5.520	5.472	99.130
	5	5.520	5.433	98.423
	6	5.520	5.433	98.423

+ adicionados a 20 ml de placebo

Tabla 6. Parámetros evaluados de la reproducibilidad del método analítico.

Días

$$\bar{X} = 99.127$$

$$S = 0.8586$$

1

$$n = 6$$

$$CV = 0.8661$$

$$\bar{X} = 98.522$$

$$S = 0.4428$$

2

$$n = 6$$

$$CV = 0.4494$$

Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F Cálculo	F Tablas
α_i	$a - 1$	1.095	$SC_{\alpha_i} / g.l_i$	$\frac{MC_{\alpha_i}}{MC_{E_j(i)}}$	F_{r-a} (a-1) y (r-1)a
	2-1		1.095	2.3442	4.96
$E_j(i)$	$(r - 1) a$	4.6711	$\frac{SC_{E_j(i)}}{g.l_{E_j(i)}}$	-	
	$(b - 1) 2$		0.4671		

Prueba de Hipótesis

$$H_0 \quad m_1 = m_2$$

$$H_1 \quad m_1 \neq m_2$$

Regla de decisión

Si $F_{\text{calc.}} > F_{1-\alpha, (a-1), (r-1)a}$ Ho se rechaza

Si $F_{\text{calc.}} < F_{1-\alpha, (a-1), (r-1)a}$ Ho no se rechaza

Experimental.

2.3442 < 4.96 ∴ Ho se acepta

6. Linealidad

Tabla 7. Linealidad del método analítico

mg. adicionados	mg recuperados	% recuperados
3.312	3.338	100.782
4.416	4.423	100.156
4.960	4.961	100.018
5.520	5.552	100.557
6.072	5.929	97.6445

Fig.1 LINEALIDAD DEL METODO

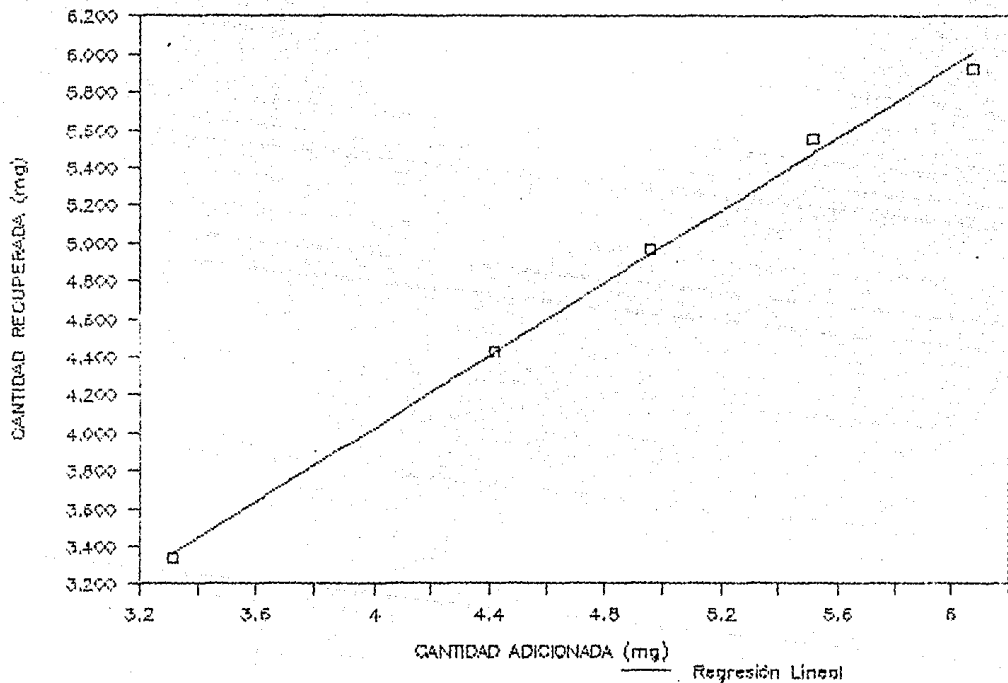


Tabla 8. Parámetros evaluados en la linealidad del método.

	Experimental	Teoricos
Pendiente de la recta (m)	0.9563	M aprox. 1
Ordenada al origen (b)	0.1964	B aprox. 0
Coefficiente de determinación(r^2)	0.9965	r aprox. 1
Coefficiente de correlación (r)	0.9982	
Error Experimental	1.8×10^{-4}	
Desviación estandar de la regresión (S_y/x)	0.0709	
$t_{\text{exper.}}$ (b) ordenada al origen	1.1911	t = 3.1825 para 0.975 con g.1 n-2
$t_{\text{exper.}}$ (m) pendiente	-1.3091	t = 3.1825 para 0.975 con g.1 n-2

Tabla 9. Criterios evaluados en la linealidad del Método.

Prueba de hipótesis: (b) Ordenada al origen

$$H_0 \quad b_0 = 0$$

$$H_1 \quad b_0 \neq 0$$

$$\text{Criterio: Si } t_{\frac{\alpha}{2}} < t_{\text{Calc.}} < t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Ho se acepta.

Prueba de Hipótesis: (m) Pendiente

$$H_0 \quad m_0 = 1$$

$$H_1 \quad m_0 \neq 1$$

$$\text{Criterio: Si } t_{\frac{\alpha}{2}} < t_{\text{Calc.}} < t_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

Ho se acepta.

Tabla 10. Area de aceptación e intervalo de Confianza de la linealidad del método.

Ordenada al origen (b)	
Area de aceptación:	
	(-3.1825 3.1825)
Intervalo de confianza:	
	(0.32832 0.72122)
Pendiente (m)	
Area de aceptación:	
	(-3.1825 3.1825)
Intervalo de Confianza:	
	(0.8503 1.0624)

X. DISCUSION DE RESULTADOS

Se validó un método analítico que cuantificara el contenido de Hidrógenofumarato de Ketotifeno en una solución pediátrica de 20 mg/100 ml.

Se evaluó la especificidad en cuanto a la respuesta del placebo, placebo cargado y estándar, obteniendo la respuesta únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

La linealidad del sistema se evaluó con respecto al estándar obteniendo una pendiente diferente a 1 (0.028) y una ordenada al origen diferentes a 0 (0.3502) ya que las variables manejadas fueron distintas, la correlación obtenida fue aproximadamente igual a 1 (0.9980), lo que nos indica que sí hay una relación lineal entre los mg adicionados y la absorbancia.

La exactitud se evaluó considerando la media, desviación estándar, error estándar e intervalo de confianza (IC 95 %), obteniendo como resultado la no exactitud del método.

La precisión, ya sea como repetibilidad o como reproducibilidad se evaluó tomando en cuenta la desviación estándar, al coeficiente de variación (CV %) y el intervalo de confianza al 95%. La reproducibilidad se llevó a cabo en dos días diferentes con el mismo analista, de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza demostrándose que no existe diferencia significativa entre ambos días.

En la medición de la linealidad del método como se puede observar en la tabla No. 8 se obtuvo una pendiente con valor muy cercano a 1 (0.9563); ordenada al origen con un valor próximo a 0 (0.1964) y un coeficiente de correlación casi igual a 1 (0.9982). Estos nos indican que la respuesta entre los mg agregados y los mg encontrados es lineal a las concentraciones trabajadas.

XI. CONCLUSION

En el presente trabajo se validó un método analítico que cuantificara el contenido de Hidrógenofumarato de Ketotifeno en una solución pediátrica, por espectrofotometría, en la región de U.V. Con el fin de asegurar la calidad del producto y poderlo utilizar como un método de rutina en el laboratorio.

Al método se le determinaron los siguientes parámetros especificidad, linealidad del sistema, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y linealidad del método.

Evaluando estadísticamente los resultados obtenidos se concluye que el método es específico, preciso pero no exacto y lineal en los rangos de concentraciones trabajadas por lo que puede utilizar como un método de rutina.

BIBLIOGRAFIA

1. Memento Sandoz, México 1988. Archivo del Laboratorio.
2. Vanderwielen, A.J., and Hardwidas, L.A., "Guidelines For assay validation". Pharmaceutical Technology, march, (7) 21-24, (1982).
3. Guerra, J. "Validation of analytical methods by FDA Laboratories". Pharmaceutical Technology, march, 74-78, (1986).
4. John, K., Taylor. "Validation of Analytical methods". Analytical Chemistry, 55(6), 600-608A, (1983).
5. Desre, L., And Massart, Leonora Kaufmas., "Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. "Elsevier Scientific Publishing Company (1978).
6. Kratochvil Byron & Taylo J.K. "Sampling For Chemical analysis". Anal. Chem. 53 (4) 924-938 A, (1981).
7. Eugene L. Imman, Joseph K. "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples". Journal of Chromatographic Science, 25 (6) 252-256(1987).
8. Curso teórico Práctico de Validación de Técnicas Análíticas"., por AFM., México. Memoriasde congreso (1981).

9. William H., "Methous Valiation". Received May 18, 1197 - 1203, (1976).
10. Wayne W. Daniel. " Bioestadistica " 3a. Edición, Editorial Limusa (1987). México.
11. Manzanarez, Ma. Eloisa, "Comparación de dos métodos cromatográficos específicos para el estudio de estabilidad de acetato de parametasona en 2 preparaciones Farmaceuticos ", Tesis - Licenciatura FES- Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México, (1982).
12. Huerta, Filiberto P, " Desarrollo de un método analítico para cuantificar sulfato de salbutamol en tabletas por intercambio ionico". (1984) Tesis- Licenciatura, ENEP - ZARAGOZA, Universidad Nacional Autónoma de México.

APENDICE A

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

$$\text{Desviación estándar (DE)} = \frac{\sum (\bar{X} - X)}{n - 1}$$

$$\text{Coeficiente de Variación (CV)} = \frac{\text{DE}}{\bar{X}} \times 100$$

Coeficiente de Correlación (r)

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

Coeficiente de determinación (r²)

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

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

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

$$\text{Error Experimental (Ei,j)} = \sum (Y_i - Y)$$

$$\text{Suma de cuadros (SC}_{\alpha_i}\text{)} = \frac{\sum Y_{i.}^2}{r} - \frac{\sum Y^2}{nr}$$

$$\text{Suma de Cuadrados (SC}_{E_j^{(i)}\text{)} = \sum \sum Y_{ij}^2 - \frac{\sum Y_i^2}{r}$$