

73
2aJ



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO
ESPECTROFOTOMETRICO INDIRECTO PARA LA
CUANTIFICACION DE POTASIO EN COMPRIMIDOS
EFERVESCENTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LILIA ZAMORA JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 GENERAL

	Pág.
1. Introducción.	1
2. Objetivos.	4
3. Generalidades.	5
3.1 Características Físicoquímicas de los principios activos.	5
3.2 Propiedades farmacológicas del potasio.	6
3.3 Fundamento de la Espectrofotometría.	10
3.3.1 Ley de la fotometría	13
3.3.2 Análisis cuantitativo	14
3.3.2.1 Métodos indirectos	14
3.3.2.2 Selección de condiciones óptimas de análisis en métodos indirectos	15
3.3.2.3 Curvas de calibración indirecta	17
3.5 Validación de métodos analíticos.	19
4. Desarrollo experimental.	27
4.1 Material y reactivos.	27
4.2 Método inicial.	29
4.3 Etapa de optimización.	32
4.3.1 Factores que influyen en el método.	32
4.3.2 Resultados y análisis.	33
4.3.3 Método analítico optimizado.	40

4.4	Etapa de validación.	42
4.4.1.	Resultados y análisis.	44
4.4.1.1.	Especificidad.	44
4.4.1.2.	Linealidad del sistema.	45
4.4.1.3.	Linealidad del método.	48
4.4.1.4.	Exactitud y repetibilidad.	53
4.4.1.5.	Reproducibilidad.	55
4.4.1.6	Tolerancia.	60
5.0.	Conclusiones.	63
Anexo 1.	Tablas de reusltados de la etapa de validación.	65
Anexo 2.	Criterios de aceptación.	73
Bibliografía.		76

1. INTRODUCCION.

El potasio constituye el principal catión del fluido intracelular, regula el equilibrio ácido-base y la presión osmótica. Asimismo es esencial para varias funciones metabólicas como la biosíntesis de proteínas por los ribosomas, metabolismo de carbohidratos y activación de enzimas como la piruvato quinasa. El potasio es también un constituyente muy importante del fluido extracelular debido a su influencia sobre la excitabilidad neuromuscular, especialmente en lo que se refiere al corazón y músculo esquelético (1, 2, 3).

La concentración de potasio en el fluido intracelular y plasma es alrededor de 100 meq/l y 3.5 a 5 meq/l, respectivamente.

En el organismo existe un total de 3000 meq de potasio distribuidos principalmente en el espacio intracelular (2, 3).

En las células ningún otro ión puede reemplazar al potasio de manera que la ingestión y excreción del mismo deben ser iguales en el adulto para mantener constante su concentración en el líquido intracelular.

Normalmente se ingieren de 50 a 100 meq (2 a 4 g) de potasio al día que se encuentra distribuido en la mayoría de los alimentos. Sus fuentes principales son la carne de ternera, de pollo, de res, de cerdo, hígado de res, pescado, cereales, legumbres y frutas tales como los albaricoques, plátanos, jugos de naranja y de piña. Esa misma cantidad se excreta por día especialmente por la orina (1, 2) . El riñón es el principal órgano de excreción de potasio.

El potasio tiene cierto valor terapéutico en alteraciones que no están directamente relacionadas con el estado de deficiencia de

potasio. El catión es útil también en el control sistemático de las manifestaciones cardiacas de la intoxicación digitálica, especialmente si se ha perdido algo del ión por el empleo de diuréticos. Una aplicación terapéutica específica del ión potasio es el tratamiento de parálisis periódica familiar (4).

Dada la importancia que tiene el uso de potasio, en diferentes padecimientos es necesario contar con productos de calidad para obtener un alto grado de seguridad para el paciente. La industria farmacéutica es el sector vital del ciclo de la asistencia a la salud en la conducción de investigaciones y en la elaboración de productos que aseguran la inocuidad y eficiencia terapéutica para mantener la salud, prevenir y curar enfermedades. Para cumplir con este compromiso debe evaluar al producto con métodos de análisis apropiados y confiables.

El presente estudio viene a resolver la necesidad de contar con un método que permita determinar potasio de una manera sencilla, rápida, práctica y con resultados confiables.

El método modificado se fundamenta en una determinación espectrofotométrica indirecta. Para establecer su confiabilidad se llevó a cabo la validación del mismo.

La validación constituye la evaluación crítica en confiabilidad y reproducibilidad en los procesos de fabricación de medicamentos (5)

En la validación de un método analítico se deben considerar las variables más importantes que lo afectan para producir los mejores

resultados, por lo que es necesario optimizar métodos y de esta manera asegurar la calidad del producto en fabricación^(5, 6, 7).

En la primera parte del presente trabajo se exponen conceptos generales importantes para la comprensión del estudio realizado, en la segunda parte (desarrollo experimental) se muestra el procedimiento de optimización del método analítico para determinar potasio en comprimidos efervescentes y la validación del método optimizado con sus respectivos análisis de resultados y finalmente se exponen las conclusiones.

2. OBJETIVOS.

2.1. GENERAL.

Optimizar y validar un método espectrofotométrico para determinar potasio en comprimidos efervescentes.

2.2. PARTICULARES.

- a) Identificar las principales fuentes de variación del método bajo estudio
- b) Evaluar la influencia de cada fuente de variación en los resultados.
- c) Establecer el procedimiento analítico.
- d) Optimizar el procedimiento.
- e) Determinar los siguientes criterios de confiabilidad.
 - i) Linealidad del sistema.
 - ii) Linealidad del método.
 - iii) Exactitud.
 - iv) Precisión.
 - v) Especificidad.
 - vi) Tolerancia.

3. GENERALIDADES.

3.1 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS SALES DE POTASIO.

3.1.1. BICARBONATO DE POTASIO^(8, 9).



P.M.= 100.11

Carbonato ácido de potasio, forma cristales monoclinicos incoloros, densidad = 2.17, soluble en agua en 2.8 partes, casi insoluble en alcohol, se descompone a una temperatura de 100 - 200 °C.

3.1.2. BITARTRATO DE POTASIO^(9, 10).



P.M.=188.18

Bitartrato ácido de potasio, cremor tartari, fecula.

Cristales incoloros o levemente opacos con sabor ácido agradable; 1g se disuelve en 165 ml de agua, en 8820 ml de alcohol o 16 ml de agua hirviendo; rápidamente soluble en soluciones minerales ácidas diluidas.

3.1.3. CLORURO DE POTASIO⁽⁹⁾.



P.M. 74.55

Cristales blancos; 1 g se disuelve en 2.8 ml de agua o 1.8 ml de agua hirviendo, en 14 ml de glicerol, en aproximadamente de 250 ml de alcohol, insoluble en eter y acetona.

3.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL POTASIO.

Las sales de potasio se emplean para corregir la deficiencia de potasio causada por vómito, diarrea, exceso en la pérdida de líquido gastrointestinal, hiperadrenalismo, desnutrición, debilidad, balance nitrogenado negativo prolongado, diálisis, alcalosis metabólica, acidosis diabética, ciertos padecimientos renales, arritmias cardiacas y toxicidad digitálica, así como también en la corrección de la deficiencia de potasio causada probablemente por ciertos fármacos, incluyendo muchos diuréticos, corticosteroides, testosterona o corticotropina^(1, 11).

3.2.1. FARMACOCINETICA^(1, 2).

Absorción.

El ión potasio se absorbe rápidamente cuando se administra por cualquier vía.

El potasio presente en la luz intestinal se absorbe en una extensión que oscila entre 80 y 90 por ciento.

La absorción del potasio se realiza por un proceso de transporte pasivo.

Distribución.

El potasio una vez absorbido, llega primero al líquido extracelular y se distribuye, preferentemente, en el compartimento intracelular especialmente en el hígado, corazón, músculo esquelético y sistema nervioso.

Excreción.

El potasio que no es retenido en las células para la formación de tejido, es eliminado rápidamente, el 80 a 85 por ciento por el riñón y el resto en las heces. El mecanismo de la eliminación renal de potasio es por filtración glomerular, reabsorción tubular proximal y secreción en los túbulos distal y colector por transporte pasivo y activo.

El potasio es filtrado en los glomérulos y reabsorbido en gran parte en los segmentos proximales de la nefrona. La excreción neta de potasio resulta fundamentalmente de la secreción a nivel de túbulo distal y colector. La secreción de potasio parece estar determinada por la concentración de potasio en las células tubulares y por el gradiente electroquímico favorecedor de la difusión de este ión dentro de la luz tubular, todo ello influido por la aldosterona, reabsorción de sodio y equilibrio ácido - base. También aparece en sudor y heces

3.2.2. FARMACODINAMIA.

Acción sobre el corazón.

La excitabilidad del músculo cardiaco, la conducción y el ritmo son marcadamente afectados por cambios en la concentración de potasio en el líquido extracelular⁽¹²⁾. Concentraciones superiores a las normales producen sustanciales trastornos del ritmo y de la excitabilidad, junto con una marcada depresión de la conductividad, lo cual puede dar lugar a paro cardiaco en diástole^(12, 13). Las concentraciones bajas de potasio (menos de 4 meq/l) también producen un aumento en el umbral de excitabilidad y

automaticidad, la disminución importante en la concentración de potasio puede dar lugar a paro cardiaco en sistole⁽¹³⁾.

Nervio y Músculo.

El potasio desempeña un papel importante en la transmisión neuromuscular y es necesaria una concentración adecuada de dicho catión para una excitabilidad y conductibilidad normal del nervio y una contractilidad muscular normal⁽²⁾.

En ambos extremos de la concentración anormal de potasio en el líquido extracelular, la contractilidad muscular está disminuida y se presenta parálisis flácida (12).

Tracto gastrointestinal.

Las sales de potasio poseen una acción irritante sobre las mucosas y en soluciones concentradas son capaces de provocar lesiones en el tracto gastrointestinal⁽²⁾.

Acción diurética.

Al secretarse por los túbulos renales y eliminarse en la orina las sales de potasio arrastran agua por acción osmótica, provocando así diuresis⁽²⁾.

La diuresis producida por las sales de potasio no es muy intensa, requiere dosis elevadas.

Mecanismo de acción de las sales de potasio^(13, 14).

Aunque actúan como diuréticos osmóticos, las sales de potasio actúan mediante mecanismos más específicos.

En el túbulo distal el potasio compite con el hidrógeno en el intercambio del sodio, el cuál es reabsorbido. Cuando se dispone de un exceso de potasio la secreción de iones hidrógeno disminuye y los riñones excretan una orina alcalina. Una parte del potasio administrado se intercambia con el sodio contenido en los líquidos edematosos, por lo que la orina contiene mayores cantidades de sodio. Las sales de potasio producen entonces un balance negativo de sodio con una pérdida neta de líquido extracelular. Además parece ser que la administración de sales potásicas dilata los vasos sanguíneos renales aumentando el flujo sanguíneo renal.

3.2.3. TOXICIDAD⁽¹³⁾.

Las dosis elevadas de sales de potasio administradas por vía bucal no causan toxicidad sistemática si la función renal es normal. Las grandes dosis bucales de sales de potasio causan pilorospasmo y emesis.

Puede presentarse intoxicación por potasio luego de la administración de sales de potasio cuando la función renal está alterada.

3.3. FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRIA.

Estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia (10, 15, 16).

La radiación electromagnética está constituida por formas de energía radiante diferentes entre sí (Rayos X, ondas de radio, visible, rayos cósmicos) como se muestra en un espectro electromagnético (15).

Todas estas formas de radiación pueden describirse en función de dos modelos el ondulatorio y corpuscular (fotones).

El modelo ondulatorio describe a la radiación como ondas viajando a la velocidad de la luz 3×10^{10} cm/seg en el vacío.

Se utilizan varios términos y relaciones para describir la onda, tales como longitud de onda, frecuencia y número de onda.

- La longitud de onda es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente.

la dimensión de la longitud de onda corresponde a la de una longitud (L).

- La frecuencia es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo. La dimensión de la frecuencia es la inversa del tiempo (t^{-1}) y la unidad usual es el segundo (15, 17). La frecuencia y la longitud de onda vienen relacionadas por:

$$v = c/\lambda$$

donde c es la velocidad de la radiación.

El modelo corpuscular describe a la luz como un flujo de partículas. Cada partícula (fotón) lleva asociada una cantidad

definida de energía. La energía de un fotón sólo depende de su frecuencia, como se deduce de

$$E = hv$$

donde E es la energía (en erg) de un fotón; ν , la frecuencia de la radiación monocromática; y h una constante universal, llamada constante de Planck; $h = 6, 625 \times 10^{-27}$ erg.seg.⁽¹⁵⁾.

Cuando la radiación electromagnética viaja a través de un medio que contiene átomos, moléculas o iones, puede suceder varias cosas: 1) la intensidad de la energía emergente es idéntica a la intensidad de la energía incidente. Esto indica que no ha habido absorción de la radiación; 2) puede haber reflexión, refracción y/o dispersión; 3) la intensidad de la energía emergente es menor que la de la energía incidente. Esto indica que ha habido cierta absorción. Como resultado de esta absorción, las especies en solución se activan desde su menor nivel de energía (estado basal) a estados de mayor energía (estados excitados)⁽¹⁰⁾. Este salto de energía desde un nivel a otro se conoce como transición, y el componente energético que participa en el proceso de absorción se especifica como transiciones de rotación, de vibración y electrónicas.^(15, 16).

La luz visible y la ultravioleta proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas. Los espectros ultravioleta y visible se conocen, pues, como espectro electrónico⁽¹⁷⁾.

El espectro electrónico de una molécula es el resultado de una transición entre dos niveles energéticos electrónicos diferentes.

Los datos mas útiles que es posible obtener, a partir del espectro de absorción, son la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia. Tal información espectral sirve para identificar un compuesto, estableciendo la presencia o ausencia de grupos funcionales y sus posiciones relativas en la molécula.

Las técnicas espectrofotométricas están basadas en la capacidad que tienen las sustancias de interactuar con frecuencias de radiación características (18). La parte de la molécula que absorbe luz se denomina cromóforo^(16, 17). Los disolventes empleados y los radicales adyacentes a un cromóforo pueden tener influencia en la longitud de onda y la intensidad dando lugar a diferentes efectos (17, 18). Efecto Batocrómico (desplazamiento al rojo) la absorbancia máxima cambia de una longitud de onda menor a una mayor sin variar la intensidad. Efecto Hipocrómico (desplazamiento al azul) es un desplazamiento de la longitud de máxima absorción hacia longitudes de onda más cortas sin cambiar la intensidad. Efecto Hiperocrómico aumenta la intensidad de la banda sin variar la longitud de onda. Efecto Hipocrómico Es un descenso de la absorbancia y por lo tanto de $E_{\text{máx}}$.

Los grupos que no producen un incremento en la banda de absorción por sí mismos, pero que unidos a un cromóforo causan cambios tanto de longitud de onda como en la intensidad de la banda se denominan auxocromos⁽¹⁶⁾.

3.3.1 LEY DE LA FOTOMETRIA.

La espectrofotometría analítica cuantitativa se basa en dos leyes fundamentales. La primera ley, atribuida a Bouger (1729), dice que la proporción de la luz absorbida en un medio es independiente de la intensidad de la luz incidente y que cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual a la luz incidente.

La segunda ley, de Beer (1852), introduce el concepto de número de entidades absorbentes (concentración)⁽¹⁹⁾.

La combinación de estos descubrimientos ha llegado a ser conocida como la ley de Beer, quizás porque la dependencia de la concentración es la que más se aplica en el análisis químico⁽²⁰⁾.

La ecuación que describe a la ley de la absorción de la luz es la siguiente:

$$A = \log (1/T) = \log (100/\%T) = abC$$

donde a es el coeficiente de absortividad molar, una constante de proporcionalidad que varía con la longitud de onda de la radiación empleada (es una propiedad molecular de la especie que absorbe luz); b es el trayecto por la celda, expresado en centímetros; C es la concentración de la sustancia absorbente; A es la absorbancia.

3.3.2 ANALISIS CUANTITATIVO(18, 21, 22);

Este campo representa la más grande aplicación de los métodos espectrofotométricos. Contrariamente a los procedimientos cualitativos, muchos análisis espectrofotométricos cuantitativos pueden llevarse a cabo en región visible. Las excepciones principales son los sistemas totalmente orgánicos y las sales de metales alcalinos, que ordinariamente pueden analizarse sólo en la ultravioleta. Muchos procedimientos espectrofotométricos de absorción poseen la ventaja de tener una extrema sensibilidad.

Las técnicas involucradas en el análisis espectrofotométrico cuantitativo pueden clasificarse con base a cierto criterio. Una de las clasificaciones más ampliamente conocidas es la que asume una determinación de un único componente y determinaciones de dos y multicomponentes. Sin embargo, existe otra clasificación mejor que la anterior (21); involucra métodos directos e indirectos. La discusión siguiente esta enfocada a los métodos indirectos.

3.3.2.1 METODOS INDIRECTOS.

Los métodos espectrofotométricos indirectos son usados para la determinación de compuestos que por si solos no dan la propiedad (21, 22).

El principio fundamental de los métodos indirectos es la ejecución de alguna reacción química dando aumento a la propiedad proporcional para la concentración del componente bajo análisis. Para este propósito, los reactivos orgánicos producen una gran variedad de complejos y compuestos que son usados.

Las reacciones que causan cambios en la propiedad incluyen oxidación, reducción, reemplazo, formación de complejos o formación de un derivado.

En los análisis inorgánicos, la formación de complejos es, probablemente, el medio más simple y efectivo para minimizar la interferencia en absorción. Existen dos razones: la mayoría de los iones inorgánicos son incoloros o absorben con una debilidad relativa y la mayoría de los agentes orgánicos apropiados para formar complejos son específicos.

Aún cuando ambos métodos directo e indirecto están basados en las mismas leyes de absorción, los procedimientos involucrados son, sin embargo, algo diferentes. En los métodos directos el contenido del componente bajo determinación es generalmente calculado por la ecuación $A = abc$. En los métodos indirectos, una curva de calibración adecuada es más a menudo usada para encontrar la concentración desconocida.

3.3.2.2 SELECCION DE CONDICIONES OPTIMAS DE ANALISIS EN LOS METODOS INDIRECTOS^(21, 23).

Antes de emprender un análisis espectrofotométrico indirecto es necesario escoger un conjunto de condiciones de trabajo.

Muchos de los factores a tener en cuenta se enlistan a continuación.

- La absorción independiente del tiempo.
- El pH de la solución.
- La temperatura.

- Velocidad de la reacción.
- Conformidad del sistema con la ley de Beer.
- La presencia de sustancias que interfieren.
- Buena solubilidad del reactivo.
- El reactivo
- La reacción química sea cuantitativa $K' \gg 1$.

La decisión de la reacción o el reactivo a usar en el análisis estaría dada por el rango de concentración y los factores que afectan la precisión y exactitud de la determinación.

Después de elegir sobre un conjunto de condiciones para el análisis, es necesario preparar una curva de calibración.

En las determinaciones indirectas, mucho más a menudo que las directas ocurren desviaciones de la ley de Beer (la absorbancia es proporcional a la concentración).

La desviación de la ley de Beer se pone de manifiesto en la linealidad de la relación entre la concentración y la absorbancia. Debido a las desviaciones, la aplicación directa de la ley de Beer a problemas analíticos puede producir errores, estos son suspendidos mediante la construcción de curvas de calibración las cuales muestran la relación experimental entre la absorbancia y la concentración de las muestras utilizadas.

Logrando de este modo eliminar los errores debidos a la absorbancia por moléculas que interfieren o por variaciones en el espesor de la celda, puesto que son constantes en las muestras utilizadas en el calibrado y en los que se han de analizar.

3.3.2.3 CURVAS DE CALIBRACION INDIRECTA.

Las curvas de calibración muestran la relación de la respuesta y la concentración.

Se determinan experimentalmente de la siguiente manera:

Se prepara una serie de soluciones de concentración conocida.

Se considera la siguiente reacción:



Donde:

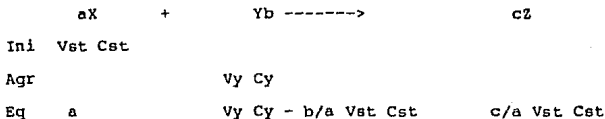
aX = Solución estándar de concentración conocida (reactivo limitante)

Yb = Reactivo que debe estar en exceso.

cZ = producto que da la propiedad.

Se mide la respuesta para cada una de estas soluciones (cZ).

La estequiometría de la reacción es la siguiente:



Donde:

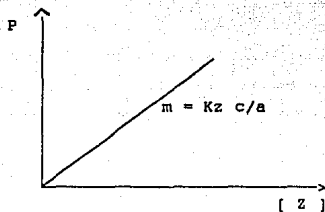
Vst = Volumen de estándar.

Vy = Volumen de reactivo limitante.

Cst = Concentración de estándar.

Cy = Concentración de reactivo limitante.

Con los datos obtenidos se construye una curva de respuesta contra concentración.



Debe existir una relación lineal entre la respuesta y la concentración (cumpla con la ley de Beer), es decir la gráfica es una línea recta.

3.5. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Desde la década de los 40's, en revistas del área farmacéutica, se hace referencia a algunos parámetros importantes de la validación de métodos analíticos y en los 60's el concepto de validación fué introducido a nuestro país. En la actualidad se ha desarrollado una serie de procedimientos que permiten validar al método como un aspecto importante en la filosofía de cualquier sistema de calidad de una empresa⁽²⁴⁾.

Ante la diversidad de técnicas analíticas (extracción, separación, instrumentales etc.), formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante es necesario validar el método que se emplea para cada producto en particular^(24, 26).

La etapa de validación comprende una serie de pruebas sistemáticas por las cuales se establece de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los 'requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos de medición ⁽²⁷⁾.

Antes de iniciar el estudio de validación de un método analítico se debe realizar una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas y estabilidad del analito, así como referencias para la cuantificación del mismo por el método analítico adecuado ⁽²⁷⁾.

Por otra parte se deben considerar todas las variables que afectan al método^(5, 6,) , es decir, cada paso en el método deberá ser evaluado para determinar el alcance en el cual las variables

(ambientales, material, de procedimiento, instrumentales y tiempo de análisis) pueden afectar la estimación del principio activo en el producto⁽⁷⁾ .

Una vez establecidas las condiciones de operación óptima el método deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados son confiables⁽²⁶⁾.

En un ensayo de validación se deben considerar los siguientes parámetros(5, 6, 7, 27, 28, 29, 30) :

- Especificidad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación.
- Tolerancia
- Estabilidad

Debido a la gran variedad de métodos los requerimientos difieren. Existe un esquema de validación que clasifica las categorías que cada método necesita para su validación^(28, 29).

Categoría I: Determinación cuantitativa de fármacos o de ingredientes activos.

Categoría II: Determinación de impurezas

a) Análisis cuantitativo.

b) Pruebas límite.

Categoría III: Determinación de las características físicas como
Disolución y liberación de principio activo.

En la tabla No.1 se presentan los requisitos para llevar a cabo la validación de métodos analíticos.

Parámetro	Categoría I	Categoría II		Categoría III
		Tipo a	Tipo b	
Especificidad	Si	Si	Si	*
Linealidad	Si	Si	No	*
Exactitud	Si	Si	*	*
Repetibilidad	Si	Si	No	*
Límite de Detección	No	No	Si	*
Límite de Cuantificación	No	Si	No	*
Reproducibilidad	Si	Si	Si	Si

Tabla 1. Requisitos para validación de métodos analíticos.

* Puede ser requerido dependiendo de la prueba específica.

El primer parámetro a evaluar generalmente es la especificidad del método. Es un término que indica que la respuesta obtenida después de un ensayo se debe exclusivamente a la sustancia de interés en

presencia de compuestos de potencial interferencia tales como excipientes, productos de degradación, constituyentes de los biofluidos, presencia de otros fármacos, impurezas etc. (26, 38, 29, 30).

Esta prueba se lleva a cabo comparando resultados de el análisis de muestras que no contengan la sustancia de interés, pero sí, los demás componentes (Placebo).

La demostracion de especificidad muestra su máxima utilidad cuando la técnica que se esta desarrollando se emplea para determinar el compuesto en estabilidad de fármacos y formulaciones⁽³⁰⁾.

La linealidad del sistema y del método se debe evaluar después de conocer la especificidad del método. La linealidad se define como la capacidad del método para asegurar que los resultados analíticos los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de las sustancia dentro de un intervalo determinado (29, 30).

La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (respuesta medida vs concentración) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución⁽³⁰⁾.

La determinación de la linealidad del método se lleva acabo mediante el análisis por triplicado de placebos adicionados del principio activo (placebos cargados) a cinco diferentes

concentraciones, se debe incluir el 100%. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicación del método. De preferencia se debe llevar acabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación^(25, 26).

El tratamiento matemático es normalmente un cálculo de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los resultados de respuesta vs concentración^(26, 30, 31).

Es necesario verificar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la respuesta y la concentración (función analítica). La significancia de la regresión y la linealidad de la función analítica se determinan mediante un análisis de variancia^(25, 31).

Exactitud: La exactitud de un método es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmete (media experimental) y un valor verdadero o conocido ^(26, 30). Se expresa como porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia y se determina de, cuando menos, 3 concentraciones del analito, preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad⁽²⁶⁾. El análisis se debe hacer bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Para evaluar la exactitud en función de los datos experimentales se hace inferencia estadística, empleando prueba de hipótesis e intervalo de confianza⁽³¹⁾.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea del producto (28, 29, 30). Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.

la precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, y/o diferentes laboratorios, diferentes instrumentos etc.) y se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado (28, 30).

Repetibilidad es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, laboratorio etc.) y se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, (30).

Límite de detección es la menor concentración del analito que puede ser determinada, pero no necesariamente cuantificada en una muestra, en condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.) (25, 30).

De acuerdo con la IUPAC, el límite de detección es definido como la media del valor blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. El blanco también es llamado el antecedente o el ruido.

El límite de detección es importante en la determinación cuantitativa de el analito cuando éste está a un nivel de componente menor o trazas (32).

La determinación del límite de detección puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 o 3 (26,38, 32, 33).

Límite de cuantificación es la mínima concentración del activo que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones normales de operación(28, 30)

Robustez 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 reactivo, columnas, sistemas de elución, tipo de empaque, condiciones ambientales entre otros(28, 29). Es evidente que un método debe ser robusto frente a cambios de analistas o instrumentos, pero no necesariamente frente a todos los cambios que se estudien(26).

Las fuentes de información bibliográfica indican que existe una gran diversidad de criterios que se están utilizando para llevar a cabo la validación de métodos analíticos y la falta de una guía oficial por parte de las Autoridades. Sin embargo el Colegio

Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos propone un manual que únicamente sirve como guía para dar al analista un soporte técnico para resolver problemas generales.

Por otra parte, la forma de validar un método analítico dependerá de su futura aplicación, es decir si este va a ser utilizado en control de calidad, en pruebas de estabilidad o en análisis de fluidos biológicos. También depende de las limitaciones propias de cada laboratorio en cuanto al material, reactivos, costos por ensayo, tiempo de ensayo, equipo disponible, personal dedicado a la validación y tiempo disponible para efectuar la documentación entre otros factores.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

El desarrollo experimental se llevó a cabo en dos etapas:

1a. Optimización del método analítico para determinar potasio en comprimidos efervescentes.

2a. Validación del método optimizado.

4.1. MATERIAL Y REACTIVOS.

4.1.1 MATERIAL:

Material comunmente utilizado en el laboratorio.

4.1.2 EQUIPO:

- Espectrofotómetro (Beckman DU-65)
- Estufa (Hotpack Vacuum Oven)
- Desecador (Manual)
- Balanza analítica (Sauter)
- Bomba de vacío (Millipore)

4.1.2. REACTIVOS:

- Acetato de cobalto tetrahidratado. (Mallincknott)
- Nitrito de sodio. (Merck)
- Acido acético glacial. (Merck)
- Acido nítrico. (Baker)

- EDTA Sal sódica. (Baker)
- Hidróxido de sodio (lentejas). (Baker)
- Peróxido de hidrógeno (30%). (Baker)

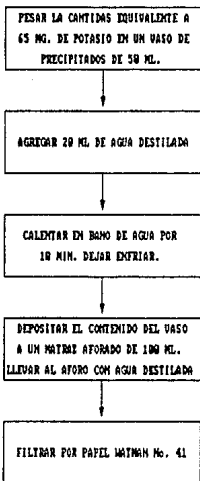
4.1.3. MATERIAS PRIMAS:

- Bicarbonato de Potasio (766 mg/comprimido)
- Bitartrato de Potasio (460 mg/comprimido)
- Sustancia de referencia:
 - Cloruro de potasio Pureza: 99.91%. (Reactivo Monterrey)

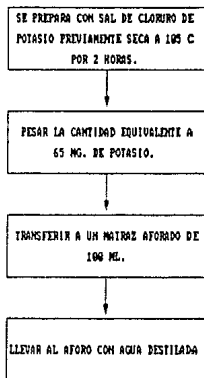
METODO INICIAL
(Información proporcionada por la casa matriz)

DETERMINACION DE POTASIO EN COMPRIMIDOS EFERVESCENTES.

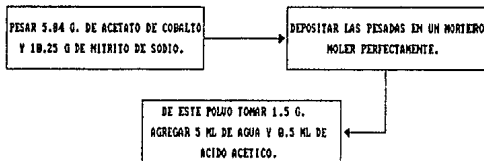
PREPARACION DE LA MUESTRA



PREPARACION DEL ESTANDAR



PREPARACION DEL HEXAMITROCOBALTATO SODICO



PROCEDIMIENTO

MUESTRA

ESTANDAR

TOMAR UNA ALICUOTA DE 10 ML.
Y DEPOSITARLA EN UN MATAZ
ERLENMEYER DE 125 ML.

TOMAR UNA ALICUOTA DE 10 ML.
Y DEPOSITARLA EN UN MATAZ
ERLENMEYER DE 125 ML.

AGREGAR 1 ML. DE HNO₃ IN Y 5 ML.
DEL REACTIVO NICAMITROCOBALTATO

MIXCLAR Y DEJAR REPOSAR DURANTE
DURANTE 2 HORAS. FILTRAR A TRAVES
DE PAPEL WHATMAN No. 42.

LAVAR 10 VECES CON 2 ML DE HNO₃
0.01 N Y 5 VECES CON 2ML DE ETANOL
AL 96 %.

TOMAR EL PAPEL FILTRO CON EL
PRECIPITADO Y COLOCARLO EN UN VASO
DE PRECIPITADOS DE 200 ML.

ADICIONAR 20 ML DE AGUA,
20 ML DE EDTA 0.05 N Y 6 ML DE NaOH
0.1 N Y 2 ML DE H₂O AL 30 %.

POSTERIORMENTE CALENTAR LA MIXCLA
HASTA EBULLICION POR 5 MIN.
ENFRIAR.

TRANSFERIR EL CONTENIDO DEL VASO A
UN MATAZ AFORNO DE 50 ML. LAVAR
EL PAPEL FILTRO CON AGUA DESTILADA

ADICIONAR LOS LAVADOS AL MATAZ.
LLEVAR AL AFORO CON AGUA DESTILADA
Y FILTRAR POR PAPEL WHATMAN No.1

DETERMINAR LAS ABSORBIENCIAS DE LAS
SOLUCION PATRON Y LA SOLUCION
MUESTRA A 540 nm. USAR AGUA COMO
BLANCO.

PREPARACION DEL REACTIVO HEXANITROCOBALTATO SODICO.

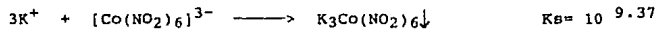
El reactivo hexanitrocobaltato sódico (reactivo precipitante) se prepara con nitrito de sodio, acetato de cobalto y se añade ácido acético. Entonces ocurre lo siguiente⁽³⁴⁾:

Los iones Co(II) se oxidan a los iones Co(III) formando el complejo $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$.



FUNDAMENTO DEL METODO (34, 35, 36).

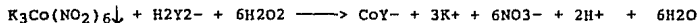
El reactivo hexanitrocobaltato de sodio se agrega a una solución que contiene iones potasio, los iones sodio, potasio y hexanitrocobaltato (III) se combinan para formar hexanitrocobaltato tripotásico, un precipitado amarillo constituido por una sal compleja poco soluble.



La adición de un exceso de reactivo desplaza el equilibrio hacia la derecha y hace la reacción más completa.

Al precipitado hexanitrocobaltato tripotásico ($\text{K}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6\downarrow$) se agrega EDTA, el cual reacciona con el cobalto, lo que indica que la determinación de potasio es indirecta.

El Co(III) reacciona lentamente con EDTA dando una coloración violeta.



4.3. ETAPA DE OPTIMIZACION.

La optimización del método analítico inicial para determinar potasio se llevó a cabo por seguimiento de fases, es decir, análisis de variable por variable.

4.3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL METODO.

Debido a la alta variabilidad que existía en los resultados obtenidos con el método inicial, se estudió el efecto que podrían ejercer factores como:

- a) El lavado del precipitado.
- b) El uso de etanol.
- c) La filtración por gravedad.
- d) El tiempo de reposo para la precipitación.
- e) La longitud de máxima absorción.
- f) El tiempo de ebullición para la formación del complejo cobalto-EDTA.
- g) la concentración de la muestra a analizar.

En la etapa de optimización todos los análisis se realizaron con muestra estándar (cloruro de potasio) con la finalidad de trabajar con un mínimo de variaciones.

4.3.2. RESULTADOS Y ANALISIS DE LA ETAPA DE OPTIMIZACION.

Primeramente se evaluó el efecto que ejerce el lavado del precipitado en la determinación cuantitativa del potasio. Este estudio se hizo con el propósito de determinar el número de lavados más adecuado que eliminen los residuos del reactivo precipitante (Hexanitrocobaltato sódico) que hayan quedado sin asociarse con el potasio, para asegurar que la reacción final (cobalto-EDTA) se lleva acabo únicamente con cobalto asociado ($K_3Co(NO_2)_6$). Para lo cual se prepararon 3 grupos de muestras y se analizaron bajo las condiciones siguientes:

Experiencia 1:

3 muestras y un blanco.

Lavado normal (10 veces con 2 ml de HNO_3 0.01 N y 5 veces con 2 ml de alcohol).

Experiencia 2:

3 muestras y un blanco.

Lavado 15 veces con HNO_3 0.01N y 5 veces con 2 ml de alcohol.

Experiencia 3:

Un blanco.

Lavado 10 veces con HNO_3 sin lavar con alcohol.

El tercer blanco se analizó de esta manera ya que la información bibliográfica indica que el etanol precipita al hexanitrocobaltato sódico (reactivo precipitante)⁽³⁶⁾.

Los resultados obtenidos para cada experiencia se muestran en la tabla 2.

Las absorbancias de los dos primeros blancos indican que si no se lava adecuadamente el precipitado se cuantifica sustancia que no es de interés (cobalto libre), ya que las absorbancias obtenidas en estos blancos son considerables. La absorbancia del segundo blanco es menor que la del primero, por lo que se considera que no es suficiente lavar el precipitado sólo 10 veces con 2 ml de HNO₃ 0.1N. Por otro lado si se compara la absorbancia del tercer blanco con los dos primeros se muestra que el uso del etanol afecta la respuesta.

Grupo	Ensayo	Absorbancia
1	1	0.317
	2	0.308
	3	0.314
	Blanco	0.074
2	1	0.305
	2	0.307
	3	0.309
	Blanco	0.067
3	Blanco	0.019

Tabla 2. Datos de absorbancia obtenidos a las diferentes condiciones de lavado.

Para precisar la influencia del uso del etanol en la cuantificación de potasio se prepararon 3 grupos de muestras. Se sometieron a diferentes condiciones. Las condiciones fueron:

Experiencia 1:

3 muestras y un blanco.

Lavado 10 veces con 2 ml de HNO_3 0.01N.

Experiencia 2:

3 muestras y un blanco.

Lavado 15 veces con 2 ml de HNO_3 0.01N.

Experiencia 3:

Un blanco.

Lavado 20 veces con 2 ml HNO_3 0.01N.

Los resultados en los dos primeros grupos muestran claramente que el etanol tiene efecto en la determinación cuantitativa de potasio, ya que se obtuvieron absorbancias menores que las obtenidas en los ensayos realizados con el lavado normal (tabla 3). Por lo tanto el uso del etanol se eliminó. La absorbancia del tercer blanco indica que la mejor forma de lavar al precipitado es con 20 veces con 2 ml de HNO_3 0.1N, sin embargo, la lectura obtenida en el segundo blanco no presenta variación con respecto al tercero por lo que no se hace necesario lavar 20 veces.

Con base en los resultados anteriores se establece que las mejores condiciones se obtiene lavando sólo 15 veces con 2 ml HNO_3 0.1N.

Grupo	Ensayo	Absorbancia
1	1	0.231
	2	0.247
	3	0.252
	Blanco	0.015
2	1	0.236
	2	0.230
	3	0.229
	Blanco	0.004
3	Blanco	0.002

Tabla 3. Datos de absorbancia obtenidos para determinar el número de lavados más adecuado.

Por otro lado el tiempo que se invertía en la filtración y en el reposo para la precipitación era muy largo, por lo que se buscaron las mejores condiciones con las cuales se obtuvieran tiempos de análisis cortos y la variación entre los resultados fuera mínima.

En primer lugar, se estudió el efecto de la filtración. Se analizaron 6 muestras, 3 se filtraron por gravedad y las 3 restantes por vacío. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Las diferentes condiciones de filtración no presentan variabilidad en los resultados. Sin embargo, el coeficiente de variación que se obtuvo en la filtración por vacío es menor que la filtración por gravedad, además de que empleando este tipo de filtración el tiempo de análisis disminuye de 6 horas a 2.30 horas.

Filtración por gravedad	Filtración por vacío.
0.222	0.230
0.230	0.227
0.228 CV=1.836	0.228 CV=0.668

Tabla 4. Datos de absorbancia a diferentes condiciones de filtración.

Posteriormente se determinó el mejor tiempo de reposo para la precipitación. Se analizaron muestras a diferentes tiempos 15 min, 30 min, 120 min y 1440 min. El análisis de resultados (tabla 5) indicó que no existe una diferencia considerable entre los resultados obtenidos a los diferentes tiempos de reposo, por tanto el tiempo de reposo para la precipitación más adecuado es de 15 min.

Tiempo			
15 min.	30 min.	120 min	1440 min
0.126	0.120	0.124	0.119
0.124	0.128	0.130	0.129
0.129	0.126	0.129	0.129

Tabla 5 . Absorbancias obtenidas a diferentes tiempo de reposo.

Después se estudió el efecto que tenía el tiempo de ebullición en la formación del complejo. Para establecer si el tiempo de ebullición afecta a la respuesta se analizaron muestra a diferentes tiempos 5, 10 y 15 min. Para cada determinación se emplearon 3 muestras. Los resultados obtenidos indicaron que en un intervalo de 5 a 15 minutos no se observan cambios en la respuesta por lo que se establece el tiempo adecuado de ebullición para la formación del complejo es de 5 minutos.

Con base en los ensayos anteriores se eligieron condiciones más favorables, no obstante, las absorbancias obtenidas en los ensayos eran muy bajas, lo que hizo sospechar que la longitud de onda a la que se estaba llevando a cabo el análisis no era la adecuada, por lo cual se realizó un barrido en el espectro de 400 a 700 nm. El espectro obtenido indicó que la longitud de máxima absorción era a 530 nm.

Con las determinaciones anteriores se logró disminuir el tiempo de análisis y la variación entre los resultados, lo que hizo suponer que se había obtenido un método óptimo, por lo cual se procedió a analizar una solución estándar de cloruro de potasio con dicho método, con la finalidad de conocer el comportamiento del sistema (linealidad). Para lo cual, se preparó una curva de calibración para establecer el intervalo de concentración más adecuado y determinar la cantidad de potasio a analizar. Se realizaron 15 ensayos (cinco niveles de concentración por triplicado). En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la curva de calibración. El tratamiento estadístico (tabla 7) indicó que existe

una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones y sus respectivas absorbancias. Con base en los datos obtenidos en la curva de calibración y la estequiometría de la reacción se determinó que la cantidad de potasio a analizar es la de 85 mg.

Concen. ug/ml Co-EDTA	mg. de Potasio	Ensayo		
		1	2	3
Absorbancia				
51.2	68.0	0.302	0.303	0.301
57.6	76.5	0.338	0.338	0.335
64.0	85.0	0.373	0.375	0.376
70.4	93.5	0.405	0.404	0.405
76.8	102.1	0.428	0.440	0.438

Tabla 6. Absorbancias determinadas a cada concentración de potasio para linealidad del sistema.

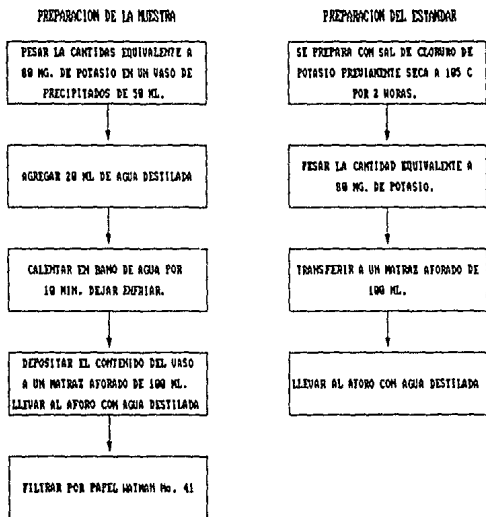
Parámetro	Resultado
Regresión (r)	0.9988
Correlación (r ²)	0.9978
Pendiente (m)	0.0039
Intercepto (b)	0.0364

Tabla 7. Resultados de los parámetros estadísticos para evaluar la linealidad.

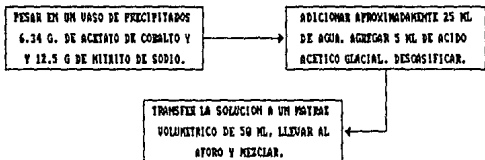
Con los resultados obtenidos se determinaron las mejores condiciones de operación, con las cuales quedó establecido el método optimizado.

METODO ANALITICO OPTIMIZADO

DETERMINACION DE POTASIO EN COMPRIMIDOS EFERVESCENTES.



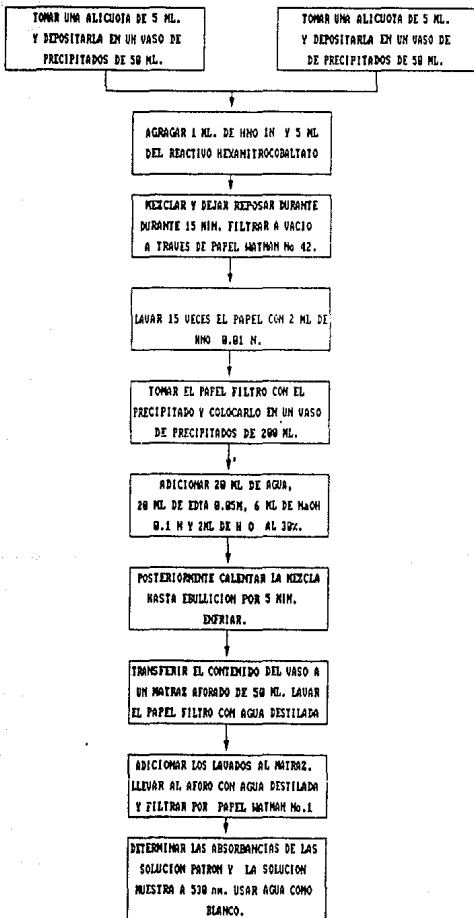
PREPARACION DEL HEXAMITROCOBALTATO SODICO (REACTIVO PRECIPITANTE)



PROCEDIMIENTO

MUESTRA

ESTANDAR



4.4. ETAPA DE VALIDACION.

Una vez establecidas las condiciones de operación óptima el método deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados obtenidos por el método son confiables (29).

Especificidad:

Uno de los parámetro a evaluar para la validación de un método analítico es la especificidad. Se debe comprobar que ninguno de los excipientes interfiere en el ensayo. Para determinar este parámetro se preparó un lote placebo, se analizaron tres muestras usando el método analítico optimizado.

Linealidad del sistema:

Se determinó construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón (cloruro de potasio en concentración conocida), se analizaron 5 niveles de concentración (68, 76.5, 85, 93.5, 102 ug/ml) por triplicado en dos días diferentes.

Linealidad del método:

Se llevo a cabo utilizando lote placebo con adición de principio activo a diferentes concentraciones. Las concentraciones a las que se trabajaron fueron 80, 90, 100, 110, 120%. El análisis fué hecho por duplicado para cada concentración en tres días diferentes.

Exactitud:

Se determinó con lote placebo y adición de principio activo. Se analizaron tres diferentes concentraciones. Las concentraciones propuestas son 90, 100, 110% debido a que los límites especificados

para el principio activo son del 90 a 110%. El número de determinaciones para cada concentración fué de 5.

Repetibilidad:

Para evaluar la repetibilidad del método se emplearon los mismos datos que para exactitud, ya que la repetibilidad se determina de la misma forma que la exactitud. La repetibilidad queda establecida con el coeficiente de variación el cual debe ser menor del 3%.

Reproducibilidad:

Se efectuó con dos analistas. Se trabajaron tres concentraciones diferentes (90, 100, 110%) durante dos días, el análisis para cada concentración fué por triplicado. El ensayo se realizó con lote placebo y adición de principio activo.

Para conocer la variabilidad entre analistas, se realizó la prueba estadística del análisis de variancia.

4.4.1. RESULTADOS Y ANALISIS DE LA ETAPA DE VALIDACION.

Para observar los resultados obtenidos durante el estudio de validación, referirse al anexo 1.

4.4.1.1. ESPECIFICIDAD.

Resultados de especificidad para el potasio.

Muestra	% Adicionado Activo	% Recuperado
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0

Tabla 8. Resultados de especificidad.

Los placebos sometidos al análisis, con la finalidad de conocer la especificidad del método optimizado, no presentaron respuesta (tabla 8), quedando establecido que la respuesta obtenida se debe únicamente al principio activo (potasio).

4.4.1.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Los datos obtenidos para las diferentes curvas de calibración se reportan en la tabla 9.

Concentración ug/ml	Día		
	1	2	X
	Absorbancia		
68.0	0.302	0.300	0.301
76.5	0.337	0.337	0.337
85.0	0.375	0.375	0.375
93.5	0.405	0.407	0.406
102.1	0.435	0.437	0.436

Tabla 9. Datos promedio de las curvas de calibración en los diferentes días trabajados.

X= Promedios totales de absorbancia.

Los resultados del tratamiento estadístico para evaluar la linealidad del sistema se muestran en las tablas 10 y 11. El tratamiento estadístico fué efectuado con los promedios totales.

Parámetro	Resultado
Regresión (r)	0.99860
Correlación (r ²)	0.99740
Pendiente (m)	0.00398
Intercepto (b)	0.03275
Límite Sup. IC _b	0.09753
Límite Inf IC _b	- 0.03203

Tabla 10. Resultados de los parámetros estadísticos para determinar la linealidad del sistema.

ANÁLISIS DE VARIANCI A				
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fexp.
Regresión	1	0.022979	0.022979	2611.96
Error de la regresión	8	0.000070	0.000008	
Falta de ajuste	3	0.000064	0.000021	17.88
Error puro	5	0.000006	0.000001	
Fr(1, 8, 0.01)= 11.13 Ffa(3, 5, 0.05)= 5.41				

Tabla 11. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema.

En la tabla 10 se reportan los resultados de los parámetros estadísticos utilizados para evaluar los estimadores de regresión. Los valores de correlación y regresión indican que existe una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones y sus respectivas absorbancias, dicha relación (absorbancia-concentración) se aproxima a una función del tipo $y=mx+b$, donde la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero en el intervalo de concentraciones trabajadas.

En la tabla del análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema (tabla 11) se observa que $F_{\text{exp}} (2611.96)$ es mayor que $F_{0.01, 1, 8}$, lo que indica que existe una relación altamente significativa entre la concentración y la respuesta. Por lo tanto el método de valoración para determinar potasio en comprimidos efervescentes cumple satisfactoriamente con los criterios estadísticos de linealidad.

4.4.1.3. LINEALIDAD DEL METODO.

Los porcentajes determinados para cada nivel de concentración a los diferentes días trabajados se muestran en la tabla 12.

Día (%) Adicionado	1	2	3	X
	(%) Determinado			
80	82.79	83.37	83.53	83.23
90	93.17	93.26	93.11	93.18
100	105.31	103.81	103.39	104.17
110	113.14	113.11	114.34	113.53
120	122.67	123.04	122.76	122.80

Tabla 12. Porcentaje determinado promedio para cada nivel de concentración a los diferentes días trabajados.

X= Promedio del porcentaje determinado.

Parámetro	Resultado
Regresión (r)	0.9994
Correlación (r^2)	0.9989
Pendiente (m)	0.9951
Límite Sup. IC_m	1.0361
Límite Inf. IC_m	0.9540
Intercepto (b)	3.8724
Límite Sup. IC_b	11.5100
Límite Inf. IC_b	-3.7631

Tabla 13. Resultados de los parámetros estadístico para evaluar la linealidad del método.

ANÁLISIS DE VARIANCI A				
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fexp.
Regresión	1	2970.746	2970.746	5962.43
Error de la regresión	13	6.477	0.498	
Falta de ajuste	3	3.057	1.019	2.98
Error puro	18	3.420	0.342	
Fr(1, 13, 0.01)=9.07 Ffa(3, 18, 0.05)=3.71				

Tabla 14. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método.

Los resultados de los parámetros estadísticos empleados para evaluar los estimadores de la regresión se encuentran en la tabla 13. Los valores de regresión y correlación indican que existe una relación estadísticamente significativa entre el porcentaje adicionado y porcentaje determinado.

Las variables siguen una relación lineal del tipo $y=mx+b$ en el intervalo de concentraciones trabajadas, ya que la pendiente es estadísticamente igual a 1 y la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero.

Además de los estimadores de la regresión, la linealidad del método se evaluó mediante un análisis de variancia. Los resultados de dicha prueba expuestos en la tabla 14 indican que existe una relación altamente significativa entre el porcentaje adicionado y porcentaje determinado ya que $F_{r \text{ exp}} (5962.43)$ es mayor que

Fr 1, 13, 0.01 (9.07). Con base en los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico se establece que el método es lineal.

Sin embargo como se puede observar en la tabla 12, se obtienen porcentajes de recuperación mayores del 100%, lo que hizo sospechar de una posible interferencia por parte de los excipientes de la formulación. Para determinar si existía tal interferencia se realizaron ensayos a cada uno de los excipientes con adición de una cantidad conocida de estándar. Se prepararon muestras estándar al equivalente a 85 mg de potasio (al nivel de concentración del 100%) y dos muestras de cada uno de los excipientes de acuerdo a la formulación para cada tableta (1750 mg) además se adicionó a cada excipiente el equivalente a 85 mg de potasio. Las muestras se analizaron de acuerdo al método analítico optimizado. El análisis de resultados indicó que los excipientes que causan interferencia son el benzoato de sodio y estearato de sodio. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Excipiente Más estándar	Ensayo No.	% Recuperado
Estearato	1	102.11
	2	102.07
Benzoato	1	103.20
	2	103.80

Tabla 15. Porcentajes de recobro obtenido para cada uno de los excipientes de la formulación.

Desafortunadamente se disponía de poco tiempo para efectuar la documentación, por lo que fue necesario determinar un factor de corrección que eliminara la interferencia. Este factor se obtuvo calculando el promedio de la fracción recuperada. La fracción recuperada es la relación entre los porcentajes adicinados y los

porcentajes determinados. El valor del factor de corrección es de 1.035. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

(% Adicionado)	Ensayo No.	Fracción recuperada		
		Día 1	Día 2	Día 3
80	1	1.0368	1.0429	1.0396
	2	1.0328	1.0412	1.0484
90	1	1.0323	1.0360	1.0201
	2	1.0379	1.0427	1.0488
100	1	1.0491	1.0324	1.0288
	2	1.0514	1.0437	1.0391
110	1	1.0232	1.0118	1.0333
	2	1.0332	1.0377	1.0455
120	1	1.0167	1.0201	1.0172
	2	1.0368	1.0360	1.0289

Tabla 16. Fracción recuperada para cada porcentaje adicionado.

Para evaluar la confiabilidad del factor se determinaron los siguientes parámetros estadísticos: desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza para la media al 95% de confiabilidad.

Parámetro	Resultado
Promedio	1.0350
Desv. estándar	0.0102
C.V.	0.9876
IC 0.975	1.016 - 1.053

Tabla 17. Resultados de los parámetros estadísticos para evaluar el factor de corrección.

El coeficiente de variación es menor al 3% establecido para métodos espectrofotométricos⁽³³⁾ lo que indica que el factor de corrección es confiable.

El factor de corrección se empleó para eliminar el exceso de recuperación que se obtenía en cada uno de los ensayos realizados para evaluar la exactitud, repetibilidad y reproducibilidad del método analítico optimizado.

4.4.1.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

Para determinar la exactitud y repetibilidad del método se trabajó con tres niveles de concentración (90, 100, 110%) en dos días diferentes. Cada concentración se analizó por quintuplicado. Los resultados se muestran en la tabla 18.

(% Adicionado)	(% Recuperado)	
	Día 1	Día 2
90	98.32	97.67
	99.50	101.43
	100.41	98.89
	100.91	99.67
	98.84	98.48
100	100.39	100.07
	100.13	99.18
	100.01	99.93
	101.13	99.72
	99.71	99.16
110	99.40	98.81
	99.40	100.13
	100.11	100.49
	99.84	101.27
	100.07	101.34

Tabla 18. Porcentajes de recobro obtenidos a los diferentes niveles de concentración de potasio (90, 100 y 110%).

La exactitud y repetibilidad del método se evaluó considerando los siguientes parámetros estadísticos: media (\bar{X}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), intervalo de confianza para la media al 95% de probabilidad. Asimismo se efectuó la prueba de t de Student considerando al 100% de recuperación como la media poblacional.

Nivel de Concen. (%)	Día	P a r á m e t r o s				
		X	S	CV	tex.	I.C. 0.975
90	1	99.78	0.984	0.990	0.4834	98.56-101.01
	2	99.41	1.361	1.370	0.9551	97.72-101.11
100	1	100.41	0.434	0.430	2.1489	99.87-100.96
	2	99.72	0.337	0.340	1.8234	99.30-100.14
110	1	99.68	0.305	0.310	2.2888	99.31-100.07
	2	100.18	0.892	0.890	0.4491	99.06-101.28

$t(4, 0.975) = 2.78$

Tabla 19. Resultados de los parámetros estadísticos para evaluar la exactitud y repetibilidad del método.

En la tabla 19 se presentan los resultados de cada uno de los parámetros evaluados para determinar la exactitud y repetibilidad del método. El coeficiente de variación para las tres concentraciones trabajadas son menores al 3% indicado para métodos espectrofotométricos⁽³³⁾. El valor de t_{exp} para las tres concentraciones es menor al $t(0.975,5)$, por lo tanto la hipótesis de $x=U$, donde $U=100$ (media poblacional) de $x=U$, donde $U=100$ existe diferencia significativa con el 100% recuperado. En los intervalos de confianza para la media para cada concentración se localiza el 100% de recuperación. Con base en lo anterior se establece que el método además de ser lineal es repetible y exacto con un 95% de confianza.

4.4.1.5. REPRODUCIBILIDAD.

Para determinar la reproducibilidad del método, 2 analistas trabajaron con 3 niveles de concentración en 2 días diferentes. Cada concentración se analizó por triplicado. Los porcentajes de recobro obtenidos a los diferentes niveles de concentración para evaluar la reproducibilidad del método se presentan en las tablas 20, 22 y 24.

Día	Analista	
	1	2
1	(% Recuperado)	
	100.41	98.84
	99.39	99.11
	100.91	101.03
2	99.68	100.37
	101.43	99.82
	98.48	99.82

Tabla 20. Porcentajes de recobro para un 90% de concentración de potasio.

ANÁLISIS DE VARIANCIAS					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{exp.}	F _{0.05}
Analista	1	0.14414	0.14414	0.73486	F _{gla/gld} 18.51
Día	2	0.27558	0.39229	0.18169	F _{gld/gle} 4.46
Error	8	8.63669	1.07959		

Tabla 21. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad del método a un nivel de concentración del 90%.

Día \ Analista	Analista	
	1	2
	(%) Recuperado	
1	100.13	99.09
	101.13	99.11
	99.71	101.02
2	99.72	100.54
	99.16	100.07
	100.07	101.69

Tabla 22. Porcentajes de recobro para un 100% de concentración de potasio.

ANÁLISIS DE VARIANCI A					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fexp.	F _{0.05}
Analista	1	0.92812	0.92812	1.94501	Fgla/gld 18.51
Día	2	0.95436	0.47718	0.56811	Fgld/gle 4.46
Error	8	6.71948	0.83993		

Tabla 23. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad del método a un nivel de concentración del 100%.

Día \ Analista	Analista	
	1	2
	(%) Recuperado	
1	99.39 99.39 99.83	98.82 99.06 98.82
2	98.81 100.13 100.49	101.02 101.02 102.62

Tabla 24. Porcentajes de recobro para un 110% de concentración de potasio.

ANÁLISIS DE VARIANCI A					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma d cuadrados	Media de cuadrados	Fexp.	F _{0.05}
Analista	1	0.91772	0.91772	0.17289	F _{gla/gld} 18.51
Día	2	10.61590	5.30795	12.24243	F _{gld/gle} 4.46
Error	8	3.46856	0.43357		

Tabla 25. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad del método a un nivel de concentración del 110%.

Tabla	X	S	CV
20	99.94	2.94	2.94
22	100.27	2.59	2.58
24	99.95	1.86	1.86

Tabla 26 . Resultados de los parámetros estadísticos para evaluar la reproducibilidad del método.

Tabla	F _{Ana exp.}	F _{A 0.05}	F _{Día exp}	F _{d 0.05}
21	0.7348	18.51	0.1816	4.46
23	1.9458	18.51	0.5681	4.46
25	0.1728	18.51	12.242	4.46

Tabla 27. Resumen de resultados del análisis de variancia para evaluar reproducibilidad del método.

Los resultados del análisis estadístico para establecer la reproducibilidad del método se encuentran en las tablas 26 y 27.

En la tabla 26 se muestran los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración, los cuales son altos, sin embargo no están fuera de los límites establecidos (<3%), por lo que se sugiere una capacitación previa para familiarizar a los analistas con el método.

Por otra parte para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los analistas se efectuó un análisis de variancia considerando al analista y al día como factores que podrían afectar la respuesta (% recuperado).

En la tabla 27 se resumen los resultados de los análisis de variancia para los diferentes niveles de concentración. Para las tres concentraciones analizadas $F_{Ana\ exp}$ fué menor que $F_{a0.05}$ (18.51) lo que indica que el factor analista no presenta efecto alguno sobre la determinación cuantitativa de potasio, por lo tanto el análisis puede ser efectuado por distintos analistas. El método es reproducible por un mismo analista en distintos días ya que $F_{exp\ día}$ fué menor que $F_{d0.05}$ para un 90 y 100% de concentración.

4.4.1.6. TOLERANCIA:

Para la tolerancia del método se analizaron muestras de acuerdo al método analítico optimizado con las siguientes modificaciones:

Se analizaron diferentes placebos con adición de principio activo (bicarbonato de potasio y bitartrato de potasio) a un nivel de concentración del 100% (cantidad equivalente a 85 mg de potasio). Los placebos se preraron modificando las proporciones de los 2 excipientes que causaban interferencia (benzoato: estearato). Las proporciones propuestas fueron: 80:80, 80:100, 80:120, 100:80, 100:100, 100:120, 120:80, 120:100, 120:120. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Benzoato	Estearato		
	80%	100%	120%
80%	98.64	98.63	99.29
	97.93	98.56	99.81
	99.20	99.26	99.38
	X= 98.59	X= 98.82	X= 99.49
100%	102.67	102.81	103.74
	103.05	102.93	103.18
	103.00	103.40	104.71
	X=102.90	X=103.04	X=103.93
120%	104.32	105.87	105.94
	103.49	104.74	104.96
	104.87	103.90	104.87
	X=104.22	X=104.83	X=105.25

Tabla 28. Porcentajes de recobro obtenidos a las diferentes proporciones de benzoato-estearato

Los datos obtenidos para determinar el efecto del excipiente se reportan en la tabla 28. Los porcentajes de recuperación obtenidos en las proporciones 80:80, 80:100, 80:120 indican que el estearato de sodio no tiene efecto en la determinación cuantitativa de potasio, por lo que el porcentaje de recuperación el exceso en las determinaciones se atribuye sólo al benzoato. Con base en lo anterior se establece que el método analítico optimizado se considera válido únicamente para la formulación específica.

Una vez establecidos los parámetros de validación se buscó la manera de eliminar el uso del factor de corrección. Para ello se modificó la concentración de EDTA empleada en el análisis.

Se prepararon cinco diferentes concentraciones de EDTA: 0.025, 0.03, 0.035, 0.05 y 0.075.

Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo al método analítico optimizado (excepto la concentración de EDTA) y a la formulación especificada. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada nivel de concentración.

Resultados del efecto de la concentración de EDTA en la determinación cuantitativa del potasio.

Concentración EDTA (mmol/ml)	Ensayo No.	% Recuperado
0.025	1	97.81
	2	97.96
	3	98.63
0.030	1	100.83
	2	99.15
	3	100.36
0.035	1	101.33
	2	101.47
	3	102.39
0.050	1	102.71
	2	102.79
	3	103.63
0.075	1	102.11
	2	103.07
	3	103.11

Tabla 29. Porcentajes de recobro obtenidos a las diferentes concentraciones de EDTA.

En la tabla No. 29 se observa los porcentajes de recobro obtenidos a las diferentes concentraciones de EDTA. La concentración de EDTA tiene efecto sobre la determinación cuantitativa de potasio, por lo que se recomienda estandarizar el EDTA a una concentración de 0.05M para poder utilizar adecuadamente el factor de corrección. No obstante, a una concentración de 0.03 M no se necesita emplear el factor de corrección, ya que trabajando con esta concentración, el porcentaje de recuperación de potasio es del 100%.

5. CONCLUSIONES.

Con la adaptación de las condiciones analíticas, se obtuvo un método más adecuado.

Se redujo el tiempo de análisis y se disminuyó la variación entre los resultados. Se cumplió así el objetivo de optimización.

Las mejores condiciones determinadas para cuantificar potasio en comprimidos efervescentes por el método espectrofotométrico fueron:

- cantidad de muestra a analizar 85 mg de potasio
- longitud de máxima absorción 530 nm
- tiempo de reposo para la precipitación 15 minutos
- filtración por vacío.

El método analítico para determinar potasio en comprimidos efervescentes es lineal, exacto, repetible y reproducible, en un intervalo de concentración de 80% a 120%.

Se determinó un factor de corrección (1.035) que elimina el exceso de recuperación que se obtiene en cada determinación.

El excipiente (benzoato) influye en la determinación cuantitativa de potasio, por lo que el método analítico se considera válido únicamente para la formulación específica y dentro del intervalo de concentración estudiado.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio es recomendable que se elimine la interferencia causada por el benzoato.

También es necesario que se realice la validación del método analítico para determinar potasio con EDTA 0.03M, para demostrar que con esta concentración no es necesario el uso del factor.

ANEXOS.

Anexo 1. TABLAS DE RESULTADOS

ESPECIFICIDAD.

Muestra	% Adicionado Activo	Absorbancia
1	0.0	0.002
2	0.0	0.002
3	0.0	0.004

Tabla 30. Datos de absorbancia para determinar especificidad placebo.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Concentración ug/ml	Ensayo		
	1	2	3
	Absorbancia		
68.0	0.302	0.303	0.301
76.5	0.338	0.338	0.335
85.0	0.373	0.375	0.376
93.5	0.405	0.404	0.405
102.1	0.428	0.440	0.438

Tabla 31. Absorbancias determinadas a cada concentración de potasio para linealidad del sistema en el día 1.

Concentración ug/ml	Ensayo		
	1	2	3
	Absorbancia		
68.0	0.298	0.301	0.300
76.5	0.338	0.337	0.335
85.0	0.375	0.377	0.374
93.5	0.404	0.407	0.409
102.1	0.438	0.435	0.438

Tabla 32. Valores de absorbancia determinados a cada concentración de potasio para linealidad del sistema día 2.

LINEALIDAD DEL METODO.

(%)Adicionado	Ensayo	
	1	2
	(%) Determinado	
80.0	82.95	82.63
90.0	92.91	93.41
100.0	105.188	105.43
110.5	112.55	113.73
120.0	122.01	123.22

Tabla 33. Porcentajes determinados de potasio a cada porcentaje adicionado. Día 1.

(%) Adicionado	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
	80	131.9		79.2	0.317	
90	148.4	89.0	0.355	148.4	89.1	0.354
100	164.9	99.0	0.402	164.6	99.0	0.399
110	181.4	108.7	0.430	181.4	108.9	0.431
120	197.7	118.8	0.466	197.9	118.8	0.467
	(mg) KCl	162.1	0.382	(mg) KCl	162.0	0.379

Tabla 34. Cantidades adicionadas de bicarbonato y bitartrato de potasio para cada nivel de concentración, para evaluar la linealidad del método en el día 1.

A = Absorbancia.

BCK = Bicarbonato de potasio.

BTK = Bitartrato de potasio.

KCl = Cloruro de potasio.

(% Adicionado)	Ensayo	
	1	2
	(% Determinado)	
80.0	83.43	83.30
90.0	93.70	93.81
100.0	103.24	104.37
110.5	112.06	114.15
120.0	122.41	123.66

Tabla 35. Porcentajes determinados de potasio a cada porcentaje adicionado. Día 2

(% Adicionado)	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
	80	131.9		79.0	0.317	
90	148.2	89.0	0.352	148.4	89.1	0.355
100	164.6	99.0	0.392	164.9	99.0	0.395
110	181.4	108.8	0.426	181.4	108.0	0.432
120	197.7	118.7	0.465	197.9	118.8	0.468
	(mg) KCL	162.1	0.380	(mg) KCl	162.0	0.378

Tabla 36. Cantidades adicionadas de bicarbonato y bitartrato de potasio para cada nivel de concentración, para evaluar la linealidad del método en el día 2.

(% Adicionado)	Ensayo	
	1	2
	(% Determinado)	
80.0	83.17	83.87
90.0	91.81	94.40
100.0	102.88	103.91
110.5	113.68	115.01
120.0	122.06	123.47

Tabla 37. Porcentajes determinados de potasio a cada porcentaje adicionado. Día 3.

(% Adicionado)	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
	80	131.7		79.0	0.315	
90	148.2	89.1	0.348	148.4	89.1	0.357
100	164.7	99.0	0.390	164.9	99.0	0.393
110	181.2	108.9	0.431	181.4	108.9	0.435
120	197.9	118.6	0.463	197.9	118.8	0.467
	(mg) KCl	162.0	0.379	(mg) KCl	162.1	0.378

Tabla 38. Cantidades adicionadas de bicarbonato y bitartrato de potasio para cada nivel de concentración, para evaluar la linealidad del método en el día 3.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

NIVEL DEL 90%

Ensayo No.	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
1	148.4	89.0	0.347	148.4	89.0	0.347
2	148.4	89.1	0.352	148.4	89.1	0.350
3	148.2	89.1	0.350	148.2	89.1	0.352
4	148.4	89.0	0.348	148.4	89.0	0.351
5	148.4	89.1	0.349	148.4	89.1	0.352
	(mg) KCl	162.1	0.375	(mg) KCl	162.1	0.378

Tabla 39. Cantidades requeridas de bicarbonato y bitartrato de potasio para un nivel de 90% de concentración.

NIVEL DEL 100%

Ensayo No.	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
1	164.9	99.0	0.392	164.6	99.0	0.347
2	164.9	99.0	0.391	164.3	99.0	0.350
3	164.6	99.0	0.390	164.9	99.0	0.352
4	164.9	99.1	0.395	164.8	99.0	0.351
5	164.7	99.0	0.389	164.9	99.0	0.352
	(mg) KCl		0.377	(mg) KCl		0.378

Tabla 40. Cantidades requeridas de bicarbonato y bitartrato de potasio para un nivel de 100% de concentración.

NIVEL DEL 110%

Ensayo No.	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
1	181.4	108.8	0.430	181.2	108.8	0.428
2	181.4	108.8	0.430	181.4	108.8	0.428
3	181.4	108.7	0.433	181.2	108.6	0.429
4	181.4	108.9	0.432	181.4	108.9	0.433
5	181.4	108.9	0.433	181.3	108.9	0.433
	(mg) KCl	162.1	0.377	(mg) KCl	161.9	0.375

Tabla 41. Cantidades requeridas de bicarbonato y bitartrato de potasio para un nivel de 110% de concentración.

REPRODUCIBILIDAD ANALISTA 2.

NIVEL DEL 90%

Ensayo No.	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
1	148.4	89.1	0.360	148.4	89.1	0.360
2	148.4	89.1	0.361	148.4	89.1	0.358
3	148.4	89.1	0.368	148.4	89.1	0.358
	(mg) KCl	162.1	0.391	(mg) KCl	162.1	0.385

Tabla 42. Cantidades requeridas de bicarbonato y bitartrato de potasio para un nivel de 90% de concentración.

NIVEL DEL 100%

Ensayo No.	Cantidad Adicionada (mg)		A	Cantidad Adicionada (mg)		A
	BCK	BTK		BCK	BTK	
1	164.9	99.0	0.399	164.7	99.2	0.391
2	164.9	99.0	0.403	164.9	98.5	0.389
3	164.9	99.0	0.410	166.5	99.3	0.399
	(mg) KCl	162.1	0.389	(mg) KCl	162.1	0.376

Tabla 43. Cantidades requeridas de bicarbonato y bitartrato de potasio para un nivel de 100% de concentración.

Anexo 2. CRITERIOS DE ACEPTACION.

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEALIDAD:

$$m = 1, b = 0, r^2 = 0.98, r = 0.99.$$

$$m=1$$

El valor 1 debe encontrarse dentro de su intervalo de confianza;
Cantidad determinada - cantidad añadida.

$$b=0$$

El valor 0 debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para
la ordenada al origen.

Exista una relación altamente significativa entre la cantidad
adicionada y la propiedad medida.

$$F_{\text{regesión exp}} > Fr (glr, gler, 0.01)$$

La falta de ajuste a la relación lineal cantidad adicionada contra
propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa:

$$F_{\text{falta de ajuste exp}} < Fr (glr, gler, 0.05)$$

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA EXACTITUD Y REPERTIBILIDAD:

Prueba de hipótesis para la media:

Hipótesis nula $H_0: x = u$ donde $u = 100\%$

Hipótesis alterna $H_1: x \neq u$

Si $t_{exp} < t_{(n-1, 0.975)}$: H_0 no se rechaza, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada con un $\alpha = 0.05$.

Si $t_{exp} > t_{(n-1, 0.975)}$: H_0 se rechaza y el método se puede considerar no exacto con un $\alpha = 0.05$.

El intervalo de confianza para la media debe incluir el 100%.

El coeficiente de variación (CV) debe ser menor o igual al 3.0 % indicado para métodos Químicos y espectrofotométricos.

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA REPRODUCIBILIDAD:

Si $F_{Ana\ exp} < F_{gla, gld, 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_{Ana\ exp} > F_{gla, gld, 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_{Día\ exp} < F_{gld, gle, 0.05}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_{Día\ exp} > F_{gld, gle, 0.05}$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

B I B L I O G R A F I A.

- 1) Herrero Emilio. Bioquímica. Interamericana. Mexico 1986. Pág. 1011-1013.
- 2) Litter Manuel. Farmacología Experimental y Clínica. El Ateneo, Buenos Aires 1986, Pág. 999- 1017.
- 3) Continuinc Education. Clinical Laboratories for the Practicing Pharmacist: General Serum Chemistry. American Pharmacy. Vol. NS28, No. 9, September (1988) 47-53.
- 4) Goodman Louis S. y Gilman Alfred. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Edit. Médica Panamericana. Quinta edición. Pág. 651 - 654.
- 5) Guerra Johnny. Validation of Analitical Methods by FDA Laboratories. Pharm. Technol., (1986) Vol. I pp. 74-80
- 6) A. Adamovics John. Cromatographic Analysis of Pharmaceutical. Edit. Marcel Dekker, inc. New York 1990. pp 9-20.
- 7) Vinod P. Shah, Kamal K. Midha, Shrikant and Sidney Spector. Analytical Methods Validation: Bioavallability, Bioequivalence, and Pharmacocinetic Studies. Journal of Pharmaceutical Sciences, March (1992), Vol 81, No.3, 309 - 312.
- 8) Kirk - Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology. 3th. Volume 18. USA 1976. Pág. 912 - 949.
- 9) The Merck Index. Merck and Co. Rayway. N.J.10 th. USA. 1983.
- 10) Remington. Farmacia. Edit. Panamericana. 17ª Edición. Buenos Aires. 1990. Vol 1, Pág 1103, 1104.
- 11) Loebl Suzanne. Manual de Farmacología. Limusa. México 1986. Pág 687-690.
- 12) H. Meyers Frederik. El Manual de Farmacología Clínica. El Manual Moderno. 4ª Edición. México 1980. Pág 523- 525.
- 13) Drill. Farmacología Médica. Edit. La Prensa Medica Mexicana. 2ª Edición. Mexico 1976. Pág. 894, 895, 927-930.
- 14) W.C. Bowman. Farmacología . Edit. JIMS. Barcelona 1970. Pág. 853 - 854.
- 15) Asociación Farmacéutica Politécnica Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional. Curso Básico sobre la Espectroscopía en la Industria Química Farmacéutica. México 1979.
- 16) Watty B. Margarita. Química Analítica. Edit. Alhambra Mexicana. México 1982. Pág. 427-433.

- 17) A. Connors Kenneth, Curso de análisis fundamental. Editorial Reverte, España 1980, pág. 195-257.
- 18) Howard A. Strobel. Instrumentación Química. Estudio sistemático del análisis instrumental. Limusa. México 1974. pág. 179 - 213.
- 19) Donal J. Pietryk Clyde W. Frank. Química Analítica. 2da Edición, Editorial Interamericana, México 1983, pág. 384- 379.
- 20) W. Ramette Richard. Equilibrio y Análisis Químico. Fondo Educativo Interamericano. México 1983. Pág. 29-35, 141-161, 171-197, 459-479.
- 21) Nowicka Jankowska T., Gorczynska K. Analytical Visible and Ultraviolet Spectrometry. Edit. Elsevier. Amsterdam 1986. pág. 325-337, 369-375.
- 22) Sommer L. Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet The principles. Edit. Elsevier. Amsterdam 1989. pág 151-157.
- 23) H. Ayres Gilbert. Análisis Químico Cuantitativo. Editoriaal Harper & Row Latinoamericana México 1970, pág.459-469.
- 24) Alcántara Pineda Alejandro. Validación de Métodos Analíticos. Pharma News. Vol 1 No. 4. Octubre 1990 . p. 19 - 20.
- 25) Jiménez E. Parámetros Estadísticos y Procedimientos de Validación, criterios de aceptación. II Parte. Pharma News. Vol 1 No. 6. Diciembre 1990 . p. 15 - 20.
- 26) Quattrocchi Oscar Alberto, Abelaira Sara Inés y Laba R. F.. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Edit. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires 1992. Cap. 12. Pág. 302-327.
- 27) Jiménez E.. Un acercamiento a la validación de los métodos analíticos. I Parte. Pharma News. vol 1 no. 5. Noviembre 1990 .Pág. 16 - 17.
- 28) USP XXII. USP Inc. USA. 1990. Pág. 1711-1712, 1756, 1794, 1796.
- 29) L. Paul. USP. Perspectives on Analytical Methods Validation. Pharm. Technol., March (1991) 130 - 131
- 30) Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Colegio Nacional de QFB, AC. Requisitos mínimos para la validación de metodos analíticos. México 1986.
- 31) Cavemachi Luigi, Gallo Gier Guar Gualberto y Cian Marco Leali. Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of medicines. Drug Developmen and Industrial Pharmacy, 13(14), 2571-2615 (1978)

32) Eugene L. Inman, Joseph K. Frishmann, Pedro J. Jimenez, Gary D. Wiinkel, Malcolm L. Persinger, Bonnie S. Rutherford. General Methods Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. Journal of Chromatographic Science, Vol. 25, June 1987. pp. 252-256.

33) C. MEHTA. The validation scriteria for anaytical methods used in pharmacy practice research. J. Clin. Pharm. Therap. (1989) 14, pp 465-473.

34) U. Brumblay Ray. Análisis Cualitativo. Edit. Continental Méx. 1980, pág. 112-114.

35) G. Svehla Ph D., Vogel's. Qualitative Inorganic Analysis. Sixth Edition. Edit. Logman Scientific and Technical. U.S.A. 1987. pág. 142.

36) Nordmann Joseph. Análisis Cualitativo y Química Inorgánica. Edit. C.E.C.S.A. México 1973. pág. 383.