

65
rey

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
FALLA DE ORIGEN



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE FENILEFRINA EN SOLUCION
OFTÁLMICA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
BIÓLOGO PRESENTA :**

RICARDO ZAMORA RAMÍREZ

MEXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 1995



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.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTOS	2
A. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	2
1. NOMBRE QUÍMICO	2
2. ESTRUCTURA	2
3. PESO MOLECULAR	2
4. DESCRIPCIÓN	2
5. PUNTO DE FUSIÓN	2
6. SOLUBILIDAD	2
7. ROTACIÓN ESPECÍFICA	2
8. PK	3
9. ESPECTRO EN EL ULTRAVIOLETA	3
10. SÍNTESIS	3
11. ESTABILIDAD	3
B. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS	3
1. USOS OFTÁLMICOS	3
C. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA	4
1. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO CON SEPARACIÓN EN CROMATOGRAFÍA	4
3. ANÁLISIS COLORIMÉTRICOS	5
<i>a. Tintura con indofenol</i>	5
<i>b. Reacciones con ácidos nítricos</i>	5
<i>c. Reacciones por complejación</i>	5
<i>d. Otros métodos</i>	6
D. ESPECTROFOTOMETRÍA	7
E. CLASIFICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN	7
1. DEFINICIÓN	7
2. ENERGÍA RADIANTE	7
3. LEYES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA	7
4. CONSIDERACIONES	7
5. LEY DE BOUGUER O DE LAMBERT BEER	7
6. LEY DE BEER	8
7. LEY COMBINADA DE BOUGER-BEER	9
8. DESVIACIONES DE LA LEY DE BOUGER-BEER	10

D. VALIDACIÓN	10
1. DEFINICIÓN	10
2. LINEALIDAD DEL SISTEMA	10
<i>a. Definición</i>	10
<i>b. Determinación</i>	11
<i>c. Criterio de aceptación</i>	11
3. LINEALIDAD DEL MÉTODO	11
<i>a. Definición</i>	11
<i>b. Determinación</i>	11
<i>c. Criterios de aceptación</i>	11
4. ESPECIFICIDAD	12
<i>a. Definición</i>	12
<i>b. Determinación</i>	12
<i>c. Criterio de aceptación</i>	12
5. PRECISIÓN DEL MÉTODO	12
<i>a. Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)</i>	12
<i>b. Repetibilidad</i>	12
<i>c. Reproducibilidad</i>	12
<i>d. Determinación</i>	12
<i>e. Criterio de aceptación</i>	12
6. EXACTITUD	13
<i>a. Definición</i>	13
<i>b. Determinación</i>	13
<i>c. Criterios de aceptación</i>	13
7. ESTABILIDAD	14
<i>a. Definición</i>	14
<i>b. Determinación</i>	14
<i>c. Criterio de Aceptación</i>	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV. OBJETIVOS	16
V. HIPÓTESIS	17
VI. METODOLOGÍA	18
A. MATERIAL Y MÉTODO	18
B. REACTIVOS	18
C. PROCEDIMIENTO	20
5. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	21
6. DIAGRAMA DE FLUJO	23

VII. RESULTADOS	25
A. LINEALIDAD DEL SISTEMA	25
1. CALCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	25
2. GRÁFICO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA	26
3. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA B	26
4. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE	27
B. PRECISIÓN DEL SISTEMA	27
1. CALCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	27
C. EXACTITUD DEL MÉTODO AL 100 %	28
1. CALCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	28
D. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO	28
E. LINEALIDAD DEL MÉTODO	29
1. CALCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	29
2. GRÁFICA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO	30
3. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA B	30
4. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE	31
F. PRECISIÓN DEL MÉTODO	31
1. CALCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	31
2. ANALISTAS	32
3. DÍA	32
4. INTERACCIÓN ANALISTA-DÍA	32
G. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	33
H. RESUMEN DE RESULTADOS	34
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
IX. CONCLUSIONES	37
X. BIBLIOGRAFÍA	38
apéndice	40

I. INTRODUCCIÓN

La incipiente industria farmacéutica esta especialmente interesada en la validación de métodos analíticos, debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud, y que requieren de métodos de análisis adecuados.

Al utilizar un método de analítico es indispensable determinar la exactitud y establecer la variabilidad de los resultados que nos proporciona; debido a que es la única manera de mostrar que dicho método es el apropiado para cuantificar la sustancia de interés presente en nuestro producto , bajo las condiciones de laboratorios existentes .

En este trabajo se presenta el desarrollo y la validación de un método analítico para cuantificar Clorhidrato de Fenilefrina mediante una reacción colorida con Ferricianuro de Potasio y 4-Aminoantipirina en medio alcalino y la posterior determinación de la absorbancia del producto a una longitud de onda de 490 nm.

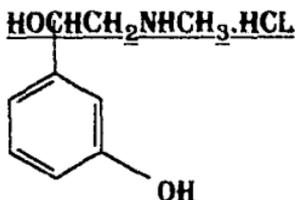
II. FUNDAMENTOS

A. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS. 1.2

1. NOMBRE QUÍMICO.

Clorhidrato de 3-hidroxi-a-((metilamino)metil)-bencenometanol.

2. ESTRUCTURA.



3. PESO MOLECULAR.

203.67 g/mol

4. DESCRIPCIÓN.

Cristales blancos o casi blancos ; inodoros, con sabor amargo. en solución acuosa es neutra.

5. PUNTO DE FUSIÓN.

140°C-150°C

6. SOLUBILIDAD.

Soluble en agua y metanol

7. ROTACIÓN ESPECÍFICA.

$$[\alpha]^{25} = (-46.2 - 47.2)$$

8. PK.

$$pK_1 = 8.77$$

$$pK_2 = 9.84$$

9. ESPECTRO EN EL ULTRAVIOLETA.

solución	λ max. nm.	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
0.05 N HCL	216	5.91
	274	1.81
	279	1.65
0.05 N NaOH	239	8.95
	292.5	3.04
puntos	222.5	4.28
isobesticos	260	6.66
	278.5	1.67

10. SÍNTESIS.

La Fenilefrina Clorhidrato puede ser sintetizada mediante la hidrogenación del *m*-hidroxi-*w*-metilamino-acetofenona en presencia de paladio coloidal o mediante el tratamiento del 5-(3-benzilofenil)-3-metil-2-oxazolona con una solución de ácido clorhídrico al 40 %.

11. ESTABILIDAD.

La Fenilefrina Clorhidrato presenta una adecuada estabilidad en forma de cristales. en solución acuosa es estable a un pH neutro, sin embargo cuando se presenta degradación en solución acuosa, esta ocurre sobre la amina secundaria, la cual es catalizada por metales pesados, obteniéndose como producto probable el 5-hidroxi-N-metilindoxil.

B. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS. »

I. USOS OFTÁLMICOS.

La Fenilefrina se utiliza principalmente con dos finalidades en el tratamiento oftalmológico; la primera de ellas es para dilatar la pupila con la finalidad de examinar el fondo del ojo denominado efecto midriático. y en el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto, su acción vasoconstrictora local disminuye la producción del humor acuoso y con ello disminuye la presión intraocular causante del glaucoma mencionado.

glaucoma es una enfermedad que se caracteriza por un aumento en la presión intraocular, que si es suficientemente alta y persistente conduce a la ceguera irreversible.

C. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CLORHIDRATO DE FENILEFRINA. 4

I. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO CON SEPARACIÓN EN CROMATOGRAFÍA

Absorbente. se hierve la mezcla de 150 gr. de tierra silicea cromatográfica y 1000 ml de ácido clorhídrico diluido durante 10 minutos, se enfría, se filtra por succión y se lava con agua, hasta que el último lavado sea neutro a la s. i. de anaranjado de metilo. se deseca a 105°C durante toda la noche y enseguida se deseca se incinera a 500°C durante dos horas.

Solución Amortiguadora. Se disuelven 10.89 gramos de fosfato monobásico de potasio, en 50 ml de agua y se agregan 3.48 gr. de fosfato dibásico de potasio. Se mezclan hasta disolución, se diluye con agua hasta 100 ml y se ajusta el pH a 5.8 0.05.

Preparación Tipo. Se disuelve una porción de Clorhidrato de Fenilefrina, patrón de referencia, en ácido sulfúrico diluido 1:350 y se disuelven cuantitativamente con el mismo disolvente hasta obtener una solución de concentración aproximada a 60 mcg/ml.

Preparación por Valorar. Se diluye un volumen de la muestra, equivalente a cerca de 50 mg de clorhidrato de Fenilefrina, con solución amortiguadora hasta 50 ml y se mezcla

Procedimiento. En un vaso de precipitados de 100 ml, se mezclan, con un a espátula flexible, 4 gr. del absorbente y 3 ml de la preparación por valorar, hasta obtener una pasta suave. En un columna cromatográfica de 25 por 200 mm, provista de una porción de vidrio fina, comprimida en el fondo, se deposita la mezcla, empacándola moderadamente. Con la espátula se frota el vaso de precipitados, agregando un gramo del absorbente, después de lo cual se pasa a la columna y se empaca como se indicó antes.

Se usa una porción de fibra de vidrio para limpiar el vaso de precipitados, el agitador y la espátula, y en seguida se deposita en la parte superior de la columna y se comprime hacia abajo hasta limpiar las paredes de la misma. Se pasan 50 ml de éter saturado con agua a través de la columna y se desechan. Se coloca en un embudo de separación pequeño que contenga 20 ml de ácido sulfúrico diluido (1:350) a bajo de la columna y se pasan, a través de esta 50 ml de una solución 1:50 de ácido bis(2-etilhexil)-fosfórico en éter saturado con agua y enseguida 25 ml de éter saturado con agua. Se enjuaga la punta de la columna cromatográfica con éter, se combina con el eluato y se agita. La capa ácida se pasa a través de un matraz volumétrico de 50 ml y se repite la extracción con 20 ml de ácido sulfúrico diluido (1:350) hasta el aforo. En un espectrofotómetro se determinan concomitantemente las absorbancias de esta solución y la de la preparación tipo, en celdillas de 1 cm a la longitud de onda de la máxima absorbancia, cercana a los 271 nm y a las longitudes de onda de las mínimas absorbancias, cercanas a 292 nm y 238 nm, usando como blanco, ácido sulfúrico diluido 1:350. Se traza una línea recta uniendo las dos mínimas y las absorbancias corregidas respectivas de la preparación tipo

y de la preparación por valorar, se determinan trazando una línea perpendicular desde el pico correspondiente a la absorbancia máxima de cada una de las dos soluciones antes mencionadas, hasta la línea recta que une los picos de las mínimas. Se calcula la cantidad, en mg de $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$, por ml, en la cantidad utilizada de la solución muestra, por medio de la fórmula $0.833(C/V)(Au/As)$, en la que C es la concentración en mg por ml, clorhidrato de Fenilefrina patrón de referencia, en la preparación tipo; V en el volumen, en ml, de la solución muestra utilizada y Au y As son las absorbancias corregidas de la preparación por valorar y de la preparación respectivamente.

2. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO. 2

La Fenilefrina puede ser cuantificada por su banda de absorción en ultravioleta a 290 nm de forma directa o después de una extracción, así como también mediante la oxidación de la Fenilefrina a m-hidroxibenzaldehído, a una longitud de onda de 257 o 315 nm.

3. ANÁLISIS COLORIMÉTRICOS. 2.5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18

a. Tintura con indofenol.

La tintura de indofenol es formada por la reacción de $p\text{-Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{Cl}$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ con un para sustituto fenólico en medio alcalino. La coloración resultante de esta reacción con Fenilefrina presenta un máximo de absorción de alrededor de 620 nm.

b. Reacciones con ácidos nitrosos.

Cuando las soluciones de Fenilefrina son calentadas en presencia de sales de mercurio y después reaccionadas con ácidos nitrosos se desarrolla un color rojo cobrizo con un máximo de absorbancia de 495 nm.

c. Reacciones por complejacion.

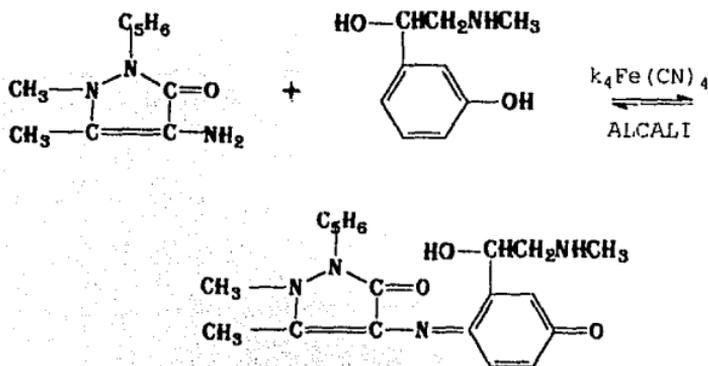
La Fenilefrina puede ser complejada con diazo-p-nitroanilina en solución ácida. El componente resultante es posteriormente basificado y cuantificado a 495 nm.

La Fenilefrina puede ser también complejada con varias tinturas de sulfotaleina en soluciones neutras o ligeramente ácidas, los complejos resultantes son después extraídos mediante un disolvente orgánico polar y cuantificado espectrofotométricamente.

d. Otros métodos.

Muchos otros métodos de cuantificación de Fenilefrina mediante reacciones coloridas han sido descritos en la literatura; por ejemplo: la reacción de Fenilefrina con ácido indico produce una coloración con absorbancia a 490 nm. La reacción con 2,6-Dicloroquinona y Fenilefrina genera un producto que puede cuantificarse a 625 nm. La oxidación de Fenilefrina a aldehído seguida de las reacciones con ácido tiobarbitúrico o con 3-metil-benzotiazolin-2-ona son también cuantificables por espectrofotometría. La ninhidrina reacciona con la Fenilefrina para producir un color rosa con un máximo de absorbancia a 440 nm.

e. El método de este trabajo se fundamenta en la siguiente reacción. 19,20



En esta reacción observamos que la Fenilefrina reacciona con la 4-Aminoantipirina en medio alcalino y es catalizada por la presencia de Ferricianuro de Potasio para obtener un compuesto que absorbe a una longitud de onda de 490 nm.

D. ESPECTROFOTOMETRIA. 22,23

Una de las técnicas que ayuda a la química analítica es la espectrofotometría que se utiliza para el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas presentes en una solución.

Estas medidas detectan la presencia o ausencia de diferentes elementos o compuestos, que bien, proporcionan información en relación a la estructura de lo que se está analizando.

E. CLASIFICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN. 22,23**1. DEFINICIÓN.**

Es la medida de la absorción de la radiación electromagnética por las moléculas o átomos de una sustancia química.

2. ENERGÍA RADIANTE.

la energía radiante se define como la energía transmitida en forma de radiación electromagnética.

Esta energía puede ser absorbida, transmitida, reflejada o refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación.

3. LEYES DE LA ESPECTROFOTOMETRIA.

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

4. CONSIDERACIONES

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía de acuerdo con ciertas limitaciones, las cuales dependen de la estructura de la molécula. Las moléculas poseen energía debida al movimiento y a la rotación. Además poseen una configuración electrónica que se manifiesta en forma de energía electrónica, cada molécula tiene cuantizada su energía, si aparte la molécula pasa desde su nivel de energía basal hasta uno mas alto, se dice que se ha producido una absorción de radiación por la molécula y paso a un estado excitado. Cuando la molécula retorna espontáneamente a su nivel basal o de mínima energía por medio de una pérdida de radiación se presenta una emisión de radiación.

5. LEY DE BOUGUER O DE LAMBERT BEER.

La relación que existe entre la absorción de radiación y la longitud de la trayectoria a través del medio absorbente fue formulada primero por Bouguer (1729), aunque algunas veces se le atribuye a Lambert (1768). Dividamos un medio absorbente homogéneo, como una solución química, en una serie de capas imaginarias del mismo espesor. Si dirigimos un haz de radiación monocromática a través de la solución, encontraremos que cada una de las capas absorbe una fracción igual de radiación o que cada capa disminuye el poder de radiación del haz en una fracción idéntica. Este descubrimiento se puede formular en forma matemática:

$$-\frac{dP}{P} = K \cdot l \cdot P_0$$

El signo negativo indica que la energía disminuye con la absorción. P_0 es la energía radiante incidente y P es la que sale de una capa del medio de espesor l .

La disminución de la energía radiante por unidad de espesor del medio absorbente es proporcional a la energía radiante sea:

$$-\frac{dP}{P} = K \cdot l \cdot db$$

y resolviendo la integral entre los límites P_0 y P ; y 0 y b :

$$\ln \frac{P_0}{P} = K \cdot l \cdot b$$

Por lo general la ecuación se escribe utilizando logaritmos base 10, lo cual solo cambia la constante:

$$\log \frac{P_0}{P} = K_2 \cdot b$$

La radiación transmitida disminuye en forma exponencial al aumentar en forma aritmética el espesor del medio absorbente.

6. LEY DE BEER.

En 1859 formuló la relación entre la concentración de la especie absorbente y el grado de absorción. Esta ley es análoga a la ley de Bouguer al describir una disminución exponencial de la energía radiante transmitida con un incremento aritmético en la concentración:

$$-\frac{dP}{dC} = K \cdot l \cdot P$$

Resolviendo obtenemos:

$$\ln \frac{P_0}{P} = K \cdot b$$

La ley de Beer se explica solo para la radiación monocromática y en donde la naturaleza de la especie absorbente permanece constante en el rango de concentración en cuestión.

7. LEY COMBINADA DE BOUGER-BEER.

Las leyes de Bouger y Beer se pueden combinar fácilmente para obtener una expresión conveniente. Al estudiar el efecto del cambio de concentración en la absorción, podemos notar que la longitud de la trayectoria a través de la solución se mantendrá como constante, pero que los resultados dependerán de la magnitud de este valor constante. En otras palabras $K_1 = f(b)$; en forma similar, en la ley de Bouguer $K_2 = f(c)$. Substituyendo estas relaciones fundamentales en ambas leyes obtenemos:

$$\log \frac{P_0}{P} = f(c)b$$

Las dos leyes deben aplicarse de forma simultánea en cualquier punto, así que:

$$f(c) = f(b) \cdot c$$

Separando variables:

$$\frac{f(c)}{c} = \frac{f(b)}{b}$$

Ahora, la única condición para que las dos funciones o variables independientes puedan ser iguales es que las dos sean iguales a una constante.

$$\frac{f(c)}{c} = \frac{f(b)}{b} = K \quad \text{o bien, } f(c) = Kc \text{ y } f(b) = Kb$$

Al sustituir en la expresión de Bouguer o en la de Beer obtenemos el mismo resultado:

$$\log \frac{P_0}{P} = f(c)b = Kbc$$

$$\log \frac{P_0}{P} = f(b)c = Kbc$$

Donde P_0 y P son la energía radiante incidente y transmitida respectivamente. El término $\log P_0/P$ es la absorbancia y se le adjudica el término A . La b representa la

longitud de la trayectoria del haz de radiación a través del medio absorbente expresado en centímetros. Para la concentración del soluto absorbente c , se presenta con frecuencia en dos unidades diferentes, gramos por litro y moles por litro, claramente se nota que el valor de la constante (K) dependerá del sistema de concentración que se utilice; cuando c sea en gramos por litro se denomina absorptividad (a) y cuando este en moles por litro se denomina absorptividad molar (ϵ).

Por lo anterior podemos redefinir las ecuaciones a la forma :

$$A = Kbc$$

La transmitancia $T = \frac{P}{P_0}$ es sencillamente la fracción de la energía incidente que es transmitida por la muestra. El porcentaje de transmitancia es $\% T = \frac{P}{P_0} \cdot 100$.

8. DESVIACIONES DE LA LEY DE BOUGER-BEER.

De acuerdo con la ley de Beer una gráfica de la absorbancia contra la concentración molar será una línea recta de pendiente igual a cb . Sin embargo las mediciones de los sistemas químicos reales dan gráficas de la ley de Beer que no son lineales en todo el rango de concentración que nos interesa. Esta curvatura sugiere que ϵ no es una constante independiente de la concentración en estos sistemas. Se supone que el valor de ϵ depende de la naturaleza de la especie absorbente en solución y de la longitud de onda de la radiación. La mayoría de las desviaciones de la ley de Beer que encontramos en la práctica analítica se atribuye a la dificultad para controlar estos dos aspectos y, por lo tanto, se las puede llamar desviaciones aparentes por que reflejan dificultades experimentales mas que alguna insuficiencia de la ley de Beer por si misma.

D. VALIDACIÓN. 24,25

1. DEFINICIÓN.

La validación de un método analítico es el proceso de determinar la estabilidad o dar una metodología de datos analíticos útiles.

La validación de un método analítico consiste en determinar su exactitud y establecer la variabilidad.

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.

2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

a. Definición.

Es la relación que se establece mediante un modelo ideal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad del fármaco.

b. Determinación.

Un analista debe preparar por lo menos 3 diluciones como mínimo por duplicado, de manera independiente, a partir de una solución patrón, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

c. Criterio de aceptación.

-La relación entre la concentración y la propiedad medida, debe ser altamente significativa.

-El coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

a. Definición.

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

b. Determinación.

Se determinara con placebos adicionados de principio activo, (placebos cargados) cada una de manera independiente, cuando menos a 3 diferentes concentraciones incluyendo al 100 % , haciendo análisis por duplicado para cada concentración bajo las mismas condiciones de análisis.

c. Criterios de aceptación.

-La relación lineal simple, cantidad adicionada-cantidad recuperada, deberá ser altamente significativa.

-El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de cantidad adicionada cantidad recuperada debe ser mayor de 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada cantidad recuperada, no debe ser estadísticamente significativa.

-La ordenada al origen de la relación lineal simple cantidad adicionada cantidad recuperada, deberá de ser estadísticamente igual a cero.

4. ESPECIFICIDAD.

a. Definición.

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

b. Determinación.

La especificidad consiste en:

Analizar placebos del producto con el método propuesto e identificar las respuestas de el (los) activos, excipientes (en caso de tenerlos) y de otras sustancias auxiliares.

c. Criterio de aceptación.

-El método no debe responder a los placebos y su respuesta debe ser únicamente a la sustancia de interés.

5. PRECISIÓN DEL MÉTODO.

a. Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad).

La precisión del método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar. La precisión es el grado de Reproducibilidad y/o Repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

b. Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

c. Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, utilizando los mismos o diferentes aparatos.

d. Determinación.

Se deben llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra.

Trabajar de, manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto, cercano al 100 % de la concentración teórica.

e. Criterio de aceptación.

-El coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para el cual el método será utilizado.

Método	Coficiente de Variación
Cromatograficos	menor del 2.0 %
Volumétricos	menor del 2.0 %
Químicos	menor del 3.0 %
Espectrofotométricos	menor del 3.0 %
Microbiologicos	menor del 5.0 %

Tabla I. Tabla que muestra los diferentes coeficientes de variación para métodos analíticos

-La repetibilidad del método de medición debe satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición. Se evalúa a través del estadígrafo de contraste χ^2 .

-La reproducibilidad interanalista debe satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición. Se evalúa estadísticamente a través de la construcción de una tabla de análisis de varianza.

6. EXACTITUD.

a. Definición.

Es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente (estimador) y su valor real de referencia (parámetro).

b. Determinación.

Analizar 10 muestras preparadas por adición de la sustancia de interés al 100 % de la cantidad etiquetada a un placebo del producto.

c. Criterios de aceptación.

-El intervalo de confianza (I.C.) para la medida debe incluir el 100 %.

-El coeficiente de variación del método debe cumplir con el propósito para el cual va a ser empleado.

7. ESTABILIDAD.

a. Definición.

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

b. Determinación.

Se determina mediante el análisis, por triplicado, de una muestra homogénea analizadas de manera independiente. Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, etc.). Durante un tiempo preestablecido por el analista. Analizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución patrón recientemente preparada., para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido la determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

c. Criterio de Aceptación.

-La muestra es estable si la valoración de las muestras efectuadas es estadísticamente equivalente a la valoración inicial.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que el método analítico propuesto por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos Edición 1992 para analizar Fenilefrina Clorhidrato mediante espectrofotometría con separación por cromatografía, requiere de un lapso de tiempo relativamente largo (aproximadamente de 4 horas) con variables difíciles de controlar ; se desarrolló un método analítico que requirió de un tiempo menor (aproximadamente 1 hora) y con variables más fáciles de controlar, lo que representa ventajas evidentes de aplicación. Por todo lo anterior se realizaron las determinaciones de los parámetros experimentales y sus respectivos análisis estadísticos , los cuales son necesarios para optimizar y validar el método en cuestión, y de esta manera establecer que el método desarrollado es el adecuado para utilizarse en el laboratorio como prueba de rutina (en producto a granel y producto terminado). Y esto por que el método dilucidado resultó ser exacto, específico, preciso y lineal.

IV. OBJETIVOS

- **Desarrollar un método analítico para cuantificar Clorhidrato de Fenilefrina en un producto oftálmico que requiera un menor tiempo de análisis y variables controladas.**
- **Determinar la exactitud y establecer la variabilidad del método analítico para cuantificar Clorhidrato de Fenilefrina en una solución oftálmica.**

V. HIPÓTESIS

Evaluando los parámetros precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, linealidad y especificidad del método analítico espectrofotométrico desarrollado para cuantificar Clorhidrato de Fenilefrina en una solución oftálmica se establecerá la validez de los resultados que proporcione, y con ello la conveniencia de utilizarlo como método de control de calidad en pruebas de rutina.

VI. METODOLOGÍA

A. MATERIAL Y MÉTODO

- Balanza analítica Sartorius 1801
- Espectrofotómetro U.V. y visible pye unicam sp 8-400
- 20 Matraces volumétricos de 25 ml . PYREX
- 33 Matraces volumétricos de 50 ml. PYREX
- 2 Matraces volumétricos de 100 ml. PYREX
- 4 Pipetas volumétricas de 1 ml. PYREX
- 2 Pipetas volumétricas de 2 ml. PYREX
- 7 Pipetas volumétricas de 3 ml. PYREX
- 4 Pipetas volumétricas de 4 ml. PYREX
- 4 Pipetas volumétricas de 5 ml. PYREX
- 1 Pipeta volumétrica de 10 ml. PYREX
- 1 Matraz Erlen Meyer de 50 ml. PYREX
- 1 Probeta graduada de 50 ml. PYREX

B. REACTIVOS

- ◆ Fenilefrina Clorhidrato patrón primario. Sigma
- ◆ Levofenil producto terminado. Laboratorios Grin S.A. de C.V.
- ◆ Tetraborato de Sodio al 5 % . J.T. Baker R. A.
- ◆ Ferricianuro de Potasio al 4 % . J.T. Baker R.A.
- ◆ 4-Aminoantipirina al 3 % . J.T. Baker R.A.
- ◆ Agua Destilada Teissier.

C. PROCEDIMIENTO

I. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.

- Pesar 50 mg de Clorhidrato de Fenilefrina patrón primario y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada.
- De la anterior solución extraer las siguientes alicuotas: 3 de 3.7 ml (74%), 6 de 5 ml (100%) y 3 de 6.3 ml (126 %), y transferirlas a 12 matraces de 25 ml, diluir y llevar a volumen con agua destilada; mezclar.
- Tomar una alicuota de 4 ml de cada matraz y transferirlas a matraces volumétricos de 50 ml rotulados, que contengan previamente 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 %.
- Adicionar 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % en otro matraz volumétrico de 50 ml y etiquetarlo como blanco de reactivos.
- A cada uno de los 13 matraces anteriores, el blanco de reactivos, el patrón de referencia y muestras, y en ese orden, adicionar 1 ml de Ferricianuro de Potasio al 4 % y un 1 de 4-Aminoantipirina al 3 %. Aforar con Tetraborato de Sodio al 4 % y mezclar.
- Inmediatamente determinar la absorbancia del patrón de referencia y de las muestras, con un espectrofotómetro en celdas de 1 cm, a una longitud de onda de 490 nm, empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.

2. EXACTITUD DEL MÉTODO Y ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

- Pesar 30 mg de Clorhidrato de Fenilefrina patrón primario y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con agua destilada. Mezclar.
- Pesar por sextuplicado 30 mg de Fenilefrina clorhidrato patrón secundario (ajustado al 100) y transferirlos a matraces volumétricos de 50 ml; disolver y aforar con placebo, mezclar. En otro matraz volumétrico de 50 ml adicionar placebo hasta el aforo y etiquetarlo como tal.
- Tomar una alicuota de 4 ml de cada uno de los matraces y transferirlos a respectivos matraces volumétricos de 25 ml, llevar al volumen con agua destilada y mezclar.
- Extraer alicuotas de 4 ml de cada uno de los anteriores matraces y transferirlos a matraces volumétricos de 50 ml, que previamente contengan 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % e identificados.
- Adicionar 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % en otro matraz volumétrico de 50 ml y etiquetarlo como blanco de reactivos.
- A cada uno de los 9 matraces anteriores, el blanco de reactivos, el patrón de referencia y muestras y el placebo, y en ese orden, adicionar 1 ml de Ferricianuro de Potasio al 4 % y de 4-Aminoantipirina al 3 %. Aforar con Tetraborato de Sodio al 4 % y mezclar.

- Inmediatamente determinar la absorbancia del patrón de referencia, las muestras y finalmente del placebo, con un espectrofotómetro en celdas de 1 cm, a una longitud de onda de 490 nm, empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste

3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

- Pesar 30 mg de Clorhidrato de Fenilefrina patrón primario y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y aforar con agua destilada. Mezclar.
- Pesar por triplicado: 25.5 mg (85 %), 30 mg (100%); y 36 mg (120%) de Clorhidrato de Fenilefrina patrón secundario y transferidos a matraces volumétricos de 25 ml, disolver y aforar con placebo.
- Tomar una alícuota de 2 ml de cada matraz y trasladarlas a matraces volumétricos de 25 ml, diluir con agua destilada y mezclar.
- Extraer alícuotas de 4 ml de cada uno de los anteriores matraces y transferirlos a matraces volumétricos de 50 ml, que previamente contengan 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % .
- Adicionar 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % en otro matraz volumétrico de 50 ml y etiquetarlo como blanco de reactivos.
- A cada uno de los matraces indicados, el blanco de reactivos, el patrón de referencia y muestras, y en ese orden, adicionar 1 ml de Ferricianuro de Potasio al 4 % y de 4-Aminoantipirina al 3 % . Aforar con Tetraborato de Sodio al 4 % y mezclar.
- Inmediatamente determinar la absorbancia del patrón de referencia, las muestras y finalmente del placebo, con un espectrofotómetro en celdas de 1 cm, a una longitud de onda de 490 nm, empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.

4. PRECISIÓN DEL MÉTODO.

- Pesar 30 mg de Clorhidrato de Fenilefrina patrón primario y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y aforar con agua destilada. Mezclar.
- Extraer una alícuota de 5 ml de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml, diluir hasta el aforo con agua destilada y mezclar.
- Mezclar el contenido de 7 frascos de levofenil producto terminado en un matraz Erlen Meyer.
- Extraer tres alícuotas de 2 ml de la solución anterior y verterlas en respectivos matraces volumétricos de 25 ml, diluir hasta el aforo con agua destilada y mezclar.
- Obtener alícuotas de 4 ml de cada uno de los anteriores matraces y del matraz con el patrón de referencia y trasladarlos a matraces volumétricos de 50 ml , que previamente contengan 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % .
- Adicionar 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % en otro matraz volumétrico de 50 ml y etiquetarlo como blanco de reactivos.

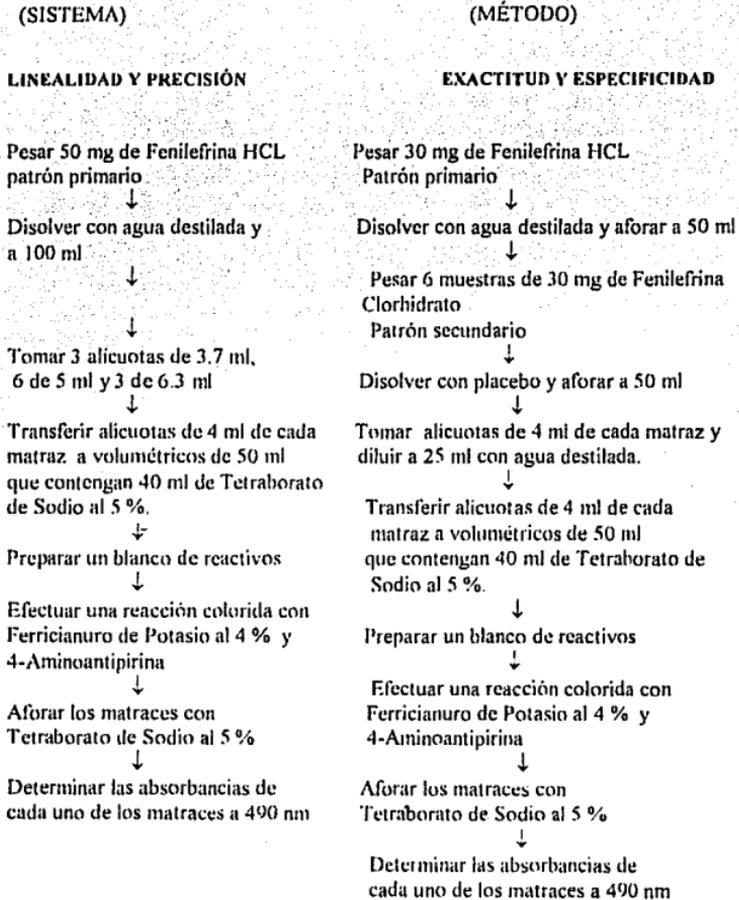
- A cada uno de los matraces indicados anteriormente, el blanco de reactivos, el patrón de referencia y las muestras, y en ese orden, adicionar 1 ml de Ferricianuro de Potasio al 4 % y de 4-Aminoantipirina al 3 %. Aforar con Tetraborato de Sodio al 4 % y mezclar.
- Inmediatamente determinar la absorbancia del patrón de referencia y las muestras con un espectrofotómetro en celdas de 1 cm, a una longitud de onda de 490 nm, empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.

5. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

- Pesar 50 mg de Clorhidrato de Fenilefrina patrón primario y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con agua destilada. Mezclar.
- Extraer una alícuota de 3 ml de la solución anterior y verterla en un matraz volumétrico de 25 ml, diluir hasta el aforo con agua destilada y mezclar. Identificarlo como matraz No. 1.
- Mezclar el contenido de 5 frascos de Levofenil en un matraz Erlen Meyer.
- Tomar una alícuota de 10 ml del matraz anterior y verterlas en respectivos matraces volumétricos de 50 ml; aforar con agua destilada y mezclar. Identificarlo como matraz No. 2.
- Extraer tras alícuotas de 3 ml del matraz No.2 y una alícuota de 3 ml del matraz No.1 y colocarlos en matraces volumétricos de 50 ml, que previamente contengan 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 %.
- Adicionar 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 % en otro matraz volumétrico de 50 ml y etiquetarlo como blanco de reactivos.
- A cada uno de los matraces indicados anteriormente, el blanco de reactivos, el patrón de referencia y las muestras, y en ese orden, adicionar 1 ml de Ferricianuro de Potasio al 4 % y del 4-Aminoantipirina al 3 %. Aforar con Tetraborato de Sodio al 4 % y mezclar
- Inmediatamente determinar la absorbancia del patrón de referencia y las muestras con un espectrofotómetro en celdas de 1 cm, a una longitud de onda de 490 nm, empleando el blanco de reactivos como blanco de ajuste.
- Extraer 18 alícuotas de 3 ml del matraz No.2 y verterlas en matraces volumétricos de 50 ml, que previamente contengan 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 %.
- Tres de los anteriores matraces etiquetarlos como temperatura ambiente 24 horas y tres como temperatura ambiente 72 horas y colocarlos en donde perciban los cambios de temperatura a través del día.
- Rotular otro grupo de 3 matraces como refrigeración 24 hrs y tres mas como refrigeración 72 hrs, transferirlos a un refrigerador.
- Etiquetar dos grupos de 3 matraces como oscuridad 24 hrs y oscuridad 72 hrs y colocarlos en un sitio oscuro.
- Transcurrido un lapso de 24 horas, preparar la solución del patrón de referencia efectuando las operaciones 1 y 2.

- Tomar una alícuota de 3 ml del matraz No. 1 y verter en un matraz volumétrico de 50 ml, que previamente contenga 40 ml de Tetraborato de Sodio al 5 %.
- Sacar del refrigerador el grupo de matraces rotulados como refrigeración 24 hrs y permitir que alcancen la temperatura ambiente.
- Efectuar la operación 6. Y las operaciones 7 y 8 para los matraces rotulados como refrigeración 24 hrs, obscuridad 24 hrs y temperatura ambiente 24 hrs.
- Transcurridas 72 hrs, preparar la solución del patrón de referencia efectuando las operaciones 1,2 y 13.
- Realizar la operación 14 para el grupo de matraces etiquetados como refrigeración 72 hrs.
- Efectuar la operación 6. Y las operación sucesivas 7 y 8 para los matraces rotulados como: refrigeración 72 hrs, obscuridad 72 hrs y temperatura ambiente 72 hrs.

6. DIAGRAMA DE FLUJO.



LINEALIDAD DEL MÉTODO

Pesar 30 mg de Fenilefrina HCl
patrón primario

↓
Disolver y aforar a 25 ml con
agua destilada

↓
Pesar por triplicado 25.5 mg,
30 mg y 36 mg de Fenilefrina
Patrón secundario

↓
Disolver y aforar a 25 ml con
placebo.

↓
matraz

Tomar alícuotas de 2 ml de cada
matraz y diluir a 25 ml con agua
destilada

↓
Transferir 4 ml de cada matraz a
matraces aforados de 50 ml con
40 ml de Tetraborato de Sodio
al 5 %.

↓
Preparar un blanco de reactivos

↓
Efectuar la reacción colorida con
Ferricianuro de Potasio al 4 % y
4-Aminoantipirina al 3 %.

↓
Determinar la absorbancia de los
matraces a 490 nm

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Pesar 24 mg de Fenilefrina HCl
Patrón primario

↓
Disolver y aforar a 50 ml con
agua destilada

↓
Tomar una alícuota de 5 ml y diluir
a 25 ml con agua destilada

↓
Mezclar el contenido de 7 frascos
de levofenil

↓
Tomar 3 alícuotas de 2 ml del

anterior y diluir a 25 ml con agua
destilada

↓
Transferir 4 ml de cada matraz a
matraces aforados de 50 ml con
40 ml de Tetraborato de Sodio
al 5 %.

↓
Preparar un blanco de reactivos

↓
Efectuar la reacción colorida con
Ferricianuro de Potasio al 4 % y
4-Aminoantipirina al 3 %.

↓
Determinar la absorbancia de los
matraces a 490 nm

VII. RESULTADOS

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

CONCENTRACION MICROGRAMOS/ML.	ABSORBANCIA OBTENIDA	PORCENTAJE
5 9200	0.375	73.8189
5 9200	0.373	73.4252
5 9200	0.374	73.4252
8 0000	0.508	100.0000
8 0000	0.508	100.0000
8 0000	0.509	100.1969
10.0800	0.643	126.5748
10.0800	0.643	126.5748
10.0800	0.644	126.7717

Tabla II. Resultados analíticos de la cantidad de fenilefrina adicionada contra la absorbancia para la linealidad del sistema

I. CALCULO DE PARAMETROS ESTADISTICOS

$$\Sigma X \cdot Y = 39.2966$$

$$\Sigma X = 72.0000$$

$$\Sigma Y = 2.4365$$

$$\Sigma (X^2) = 601.9584$$

$$\Sigma (Y^2) = 4.577$$

$$\Sigma (X)^2 = 5184.0000$$

$$\Sigma (Y)^2 = 20.9489$$

$$B = m = 0.0647$$

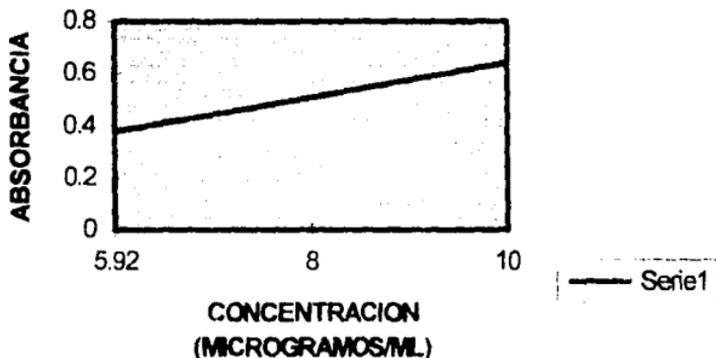
$$R = 0.9999$$

$$A = B = -9.3932 \cdot 10^{-4}$$

$$\Sigma (\lambda_i - \lambda)^2 = 25.9584$$

2. GRAFICO DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

LINEALIDAD DEL SISTEMA



3. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA B.

$$\begin{aligned} \text{Hipótesis} & \quad H_0 = A = b = 0 \\ \text{Hipótesis alterna} & \quad H_a = A = b \neq 0 \end{aligned}$$

Con una:

$$S_{y/x} = 0.0137$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.0155$$

Obtenemos:

$$T_{cal} = -0.3788$$

$$T_{tab}_{(0.975, 7)} = 2.365$$

área de aceptación

$$-0.2.3650 < -0.3788 < 2.3650$$

Se acepta H_0 la ordenada al origen es igual a cero

4. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE

Hipótesis : $H_0 B = m = 1$ Hipótesis alterna $H_1 a = B = m \neq 1$

Obtenemos :

$$T_{cal} = 2.3382$$

$$T_{tab}_{(0.975,7)} = 2.365$$

Área de aceptación :

$$-0.2.3650 < 2.3383 < 2.3650$$

Se acepta H_0 la pendiente es igual a 1

B. PRECISION DEL SISTEMA

CANTIDAD OBTENIDA (MICROGRAMOS)	PORCENTAJE DE ACTIVO
8 0000	100.0000
8 0315	100.3938
8 0157	100.1963
7.9843	99.8038
8.0315	100.3938
7.9843	99.8038

Tabla III. Resultados analíticos de precisión (repetibilidad) del sistema

I CALCULO DE PARAMETROS ESTADISTICOS.

$$\bar{X} = 100.0986$$

$$S = 0.2711$$

Hipótesis : La desviación es menor o igual al 2.0 %.

Hipótesis alterna : La desviación en mayor al 2.0 %

Obtenemos que:

$$\chi_{i cal} = 0.0919$$

$$\chi_{i T_{tab}_{(0.975)}} = 12.83$$

Área de aceptación:
 $0.0919 < 12.83$

Se acepta H_0 ; por consiguiente la desviación es menor o igual al 2,0 %

C EXACTITUD DEL METODO AL 100 %

CANTIDAD ADICIONADA (MICROGRAMOS)	CANTIDAD RECUPERADA (MICROGRAMOS)	PORCENTAJE DE RECOBRO
7.6800	7.7270	100.6120
7.6800	7.7113	100.4079
7.6800	7.6643	99.7927
7.6800	7.6800	100.0000
7.6800	7.6957	100.2044

Tabla IV. resultados analíticos de la exactitud de método al 100 %.

I. CALCULO DE PARAMETROS ESTADISTICOS .

Hipótesis $\mu = 100 \%$
 Hipótesis alterna $\mu \neq 100 \%$

obtenemos :
 $T_{cal} = 0.1641$
 $T_{tab}(0.975) = 2.5710$
 Área de aceptación:

$-2.5710 < 0.1641 < 2.5710$

Se acepta H_0 lo que significa que media muestra es igual al 100 %

D. ESPECIFICIDAD DEL METODO

SOLUCION	ABSORBANCIA (nm)
ESTANDAR	490
PLACEBO CARGADO	492
PLACEBO	-0.01

Tabla V Resultados de la especificidad del método.

E. LINEALIDAD DEL METODO

CANTIDAD ADICIONADA (MICROGRAMOS)	CANTIDAD RECUPERADA (MILIGRAMOS)	PORCENTAJE DE RECOBRO
6.528	6.5428	85.1927
6.528	6.5428	85.1927
6.528	6.5272	84.9896
7.6800	7.6800	100.0000
7.6800	7.6857	100.2028
7.6800	7.6856	100.2031
9.2600	9.2222	120.0781
9.2600	9.1911	119.6758
9.2600	9.1911	119.6758

TABLA VI. Resultados analíticos de la linealidad del método

I. CALCULO DE PARAMETROS ESTADISTICOS.

$$\Sigma X Y = 559.5015$$

$$\Sigma X = 70.2728$$

$$\Sigma Y = 70.2728$$

$$\Sigma (X^2) = 599.5955$$

$$\Sigma (Y^2) = 559.4095$$

$$\Sigma (X)^2 = 4938.1540$$

$$\Sigma (Y)^2 = 4938.2664$$

$$B = m = 0.9908$$

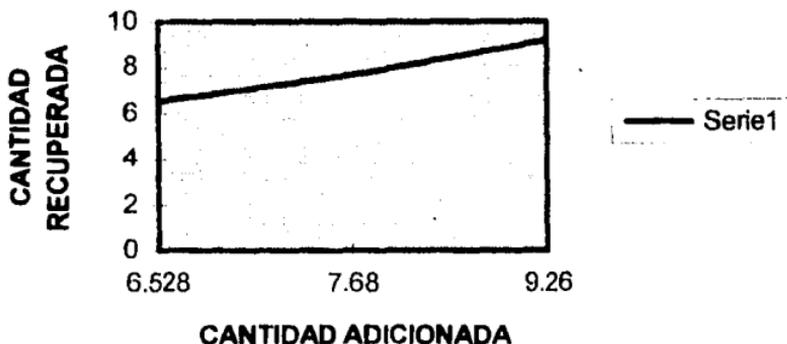
$$r = 0.9999$$

$$A = b = 0.0718$$

$$\Sigma (X_i - X)^2 = 10.9118$$

2. GRÁFICA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

LINEALIDAD DEL MÉTODO



3. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA B.

Hipótesis $H_0 = A = b = 0$
 Hipótesis alterna $H_a = A = b \neq 0$

Con unas :

$$S_{y/x} = 0.0330 \quad \text{y} \quad \hat{S}_{y/x} = 0.0374$$

Obtenemos:

$$T_{cal} = 0.8040 \quad \text{y} \quad T_{tab}_{(0.975)} = 2.365$$

área de aceptación

$$-0.2.3650 < 0.8040 < 2.3650$$

Se acepta H_0 ordenada al origen es igual cero

4. CONTRASTE DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE

Hipótesis : $H_0 B = m = 1$
 Hipótesis alterna $H_a = B = m \neq 1$

Obtenemos :

$$T_{cal} = -0.0230 \text{ y } T_{tab}_{(0,975)} = 2.365$$

Área de aceptación :

$$-0.2.3650 < -0.0230 < 2.3650$$

Se acepta la pendiente es igual a 1

F. PRECISIÓN DEL MÉTODO

	DIA 1	DIA 2
ANALISTA 1	100.2044	99.5938
	100.0000	100.2031
	100.0000	100.0000
ANALISTA 2	100.0000	100.2031
	99.7969	100.0000
	99.7969	100.4063

Tabla VII. Porcentaje de recobro por día y por analista para la precisión del método (reproducibilidad)

1. CALCULO DE PARAMETROS ESTADISTICOS

$$\frac{Y_i^2}{bc} = 120040.9343$$

$$\frac{Y_{ij}^2}{c} = 120041.1065$$

$$\frac{Y_{..}^2}{abc} = 120040.9035$$

$$Y_{ijk}^2 = 120041.4369$$

$$\frac{Y_{.j}^2}{ac} = 120040.9069$$

TABLA DE ANADEV A

FUENTE DE ERROR	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F DE CALCULO
Ai	1	0.0380	0.038	0.1825
Bj	1	3.40*10	3.40*10	0.0201
ADji	1	0.1688	0.1688	4.0872
Eijk	8	0.3340	0.0413	

Tabla VIII. Tabla de análisis de varianza para la precisión del método (reproducibilidad).

B. ANALISTAS.

$$F_{(10, 975)(1,1)} = 161.4$$

$$\text{como : } F_{\text{cal}} = 0.1825$$

$$F_{\text{cal}} (0.1825) < T_{\text{tab}} (161.4)$$

no existe efecto por el analista

C. DÍA.

$$F_{(10, 975)(1,1)} = 161.4$$

$$\text{como : } F_{\text{cal}} = 0.1825$$

$$F_{\text{cal}} (0.0201) < T_{\text{tab}} (161.4)$$

no existe efecto debido al día

D. INTERACCIÓN ANALISTA-DÍA.

$$F_{(10, 975)(1,1)} = 5.32$$

como :

$$F_{\text{cal}} (4.0873) < T_{\text{tab}} (5.32)$$

no existe efecto debido a la interacción analista día

G. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

DIA 1 % DE ACTIVO	TEMP. AMB. % DE ACTIVO	REFRIGERACION % DE ACTIVO	OBSCURIDAD % DE ACTIVO
101.0875 101.3042 101.0875	100.8736 101.0917 101.0917	101.3097 101.5278 101.3097	101.3097 101.0917 101.7472
X = 101.1597 S = 0.1251	X = 101.0190 S = 0.1259	X = 101.3824 S = 0.1259	X = 101.3829 S = 0.3338

Tabla IX. tabla de estabilidad analítica de la muestra bajo los diferentes factores, evaluados en las primeras 24 horas.

TEMP. AMB. % DE ACTIVO	REFRIGERACION % DE ACTIVO	OBSCURIDAD % DE ACTIVO
100.0875 101.8694 101.0875	101.8696 101.3042 101.0875	101.3042 101.5222 101.7391
X = 101.0875 S = 0.4514	X = 100.8696 S = 0.4043	X = 101.5218 S = 0.2175

Tabla X. Tabla de estabilidad analítica de la muestra bajo diferentes factores, evaluados en las primeras 72 horas

H. RESUMEN DE RESULTADOS

DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADOS
LINEALIDAD DEL SISTEMA	$B = m = 1$ $A = b = 0$	$m = 1$ (-2.365 < -0.3788 < 2.365) $b = 0$ (-2.365 < 2.3382 < 2.365)
PRECISION DE SISTEMA (REPETIBILIDAD)	C.V. < 2.0 % $\chi^2_{TAB} < \chi^2_{CAL}$	C.V. < 2.0 % 0.0919 < 12.83
EXACTITUD DEL METODO AL 100 %	$\mu = 100 \%$ $T_{tab} < T_{cal}$	$\mu = 100 \%$ -2.571 < 0.1641 < 2.571
ESPECIFICIDAD DEL METODO	La respuesta será únicamente debida a la sustancia de interés	ACEPTADA
LINEALIDAD DEL METODO	$B = m = 1$ $A = b = 0$	$m = 1$ (-2.365 < 0.8040 < 2.365) $b = 0$ (-2.365 < -0.0230 < 2.365)
PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)	Tabla de ANADEVA I. Analista $F_{cal} < F_{tab}$ II. Día $F_{cal} < F_{tab}$ III. Interacción analista-día $F_{cal} < F_{tab}$	0.1825 < 161.4 0.0201 < 161.4 4.0873 < 5.320
ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA	D E. < 1.0 %	D.E. < 1.0 %

Tabla XI. Tabla que contiene un resumen de los resultados de la validación analítica

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.

En los resultados correspondientes a linealidad del sistema observamos que la absorbancia presenta una correlación lineal positiva a la cantidad de fenilefrina presente en cada muestra; con una pendiente estadísticamente igual a 1 y una ordenada al origen igual a cero, confirmamos que tenemos una asociación aceptable de las variables ($r = 0.9999$). El error proporcional evaluado en este caso es insignificante y por consiguiente podemos decir que se cumplieron con los parámetros suficientes para afirmar que el sistema es lineal.

Con respecto a la precisión del sistema (repetibilidad) utilizando como estadística de prueba χ y con una región de rechazo del 0.05% confirmamos que nuestro método es repetible ya que la dispersión asociada a las cantidades de activo valoradas fue menor al límite del 2.0 %, consecuentemente nuestra hipótesis nula es verdadera y el sistema es preciso.

Los resultados obtenidos durante la evaluación del parámetro denominado precisión del método nos indican que el error constante a un porcentaje fijo es estadísticamente no significativo ($T_{cal} < T_{tab}$) por lo que inferimos que la cantidad de fenilefrina recobrada es estadísticamente igual a la cantidad adicionada del placebo, así mismo el método es exacto.

El método es específico para el principio activo, es decir se obtiene señal debido únicamente al principio activo valorado sin interferencia de los demás excipientes de la formulación, esto lo dilucidamos por que las absorbancias para el estándar y el placebo cargado son 490 y 493 respectivamente y la correspondiente al placebo es de -0.001.

Con referencia a la precisión del método (reproducibilidad) el modelo estadístico utilizado para representar una relación lineal inicialmente hipotética entre las variables nos demuestra que no existe significación en nuestra variable de respuesta (concentración de activo) cuando el método es sometido a los factores de variación analista y día, e igualmente presenta insignificancia la interacción de estos dos factores; resumiblemente observamos que el efecto que presentan el analista y/o el día carecen de

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.

En los resultados correspondientes a linealidad del sistema observamos que la absorbancia presenta una correlación lineal positiva a la cantidad de fenilefrina presente en cada muestra; con una pendiente estadísticamente igual a 1 y una ordenada al origen igual a cero, confirmamos que tenemos una asociación aceptable de las variables ($r = 0.9999$). El error proporcional evaluado en este caso es insignificante y por consiguiente podemos decir que se cumplieron con los parámetros suficientes para afirmar que el sistema es lineal.

Con respecto a la precisión del sistema (repetibilidad) utilizando como estadística de prueba χ y con una región de rechazo del 0.05% confirmamos que nuestro método es repetible ya que la dispersión asociada a las cantidades de activo valoradas fue menor al límite del 2.0 %, consecuentemente nuestra hipótesis nula es verdadera y el sistema es preciso.

Los resultados obtenidos durante la evaluación del parámetro denominado precisión del método nos indican que el error constante a un porcentaje fijo es estadísticamente no significativo ($T_{cal} < T_{tab}$) por lo que inferimos que la cantidad de fenilefrina recobrada es estadísticamente igual a la cantidad adicionada del placebo, así mismo el método es exacto.

El método es específico para el principio activo, es decir se obtiene señal debido únicamente al principio activo valorado sin interferencia de los demás excipientes de la formulación, esto lo dilucidamos por que las absorbancias para el estándar y el placebo cargado son 490 y 493 respectivamente y la correspondiente al placebo es de -0.001

Con referencia a la precisión del método (reproducibilidad) el modelo estadístico utilizado para representar una relación lineal inicialmente hipotética entre las variables nos demuestra que no existe significación en nuestra variable de respuesta (concentración de activo) cuando el método es sometido a los factores de variación analista y día, e igualmente presenta insignificancia la interacción de estos dos factores; resumiblemente observamos que el efecto que presentan el analista y/o el día carecen de

significancia en los resultados durante la valoración del activo, consecuentemente nuestro error aleatorio es nulo y el método es reproducible.

referentemente a la estabilidad analítica de la muestra en cada una de las condiciones evaluadas obtenemos una estabilidad de la muestra aceptable (luz, temperatura y refrigeración) con una variabilidad estadísticamente nula (desviación menor del 2.0 %) es decir que nuestra muestra podría ser almacenada en cualesquiera de las condiciones mencionadas hasta por 72 horas sin sufrir un deterioro significativo.

IX. CONCLUSIONES.

Determinándose de manera estadística cada uno de los posibles tipos de error (error sistemático y error aleatorio) y asumiendo que en dichos tipos de error las fuentes de variación no son significativas, podemos afirmar que el método desarrollado es exacto y no presenta variabilidad de resultados (es repetible, reproducible, lineal, y específico) para cuantificar fenilefrina clorhidrato presente en una solución oftálmica; consecuentemente es conveniente de utilizarse como método de control de calidad en pruebas de rutina.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. The Merck Index 9a. ed. eD. Martha Windholz Publisherd by Merck and Co. Inc. p.p. 175
2. Florey K. Analytical profiles of drug substances, Vol. 13, Academic Press Inc., New York 1979, p.p.115-129.
3. Goodman S., Goodman A, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 7a.ed., Ed Panamericana, México (1989) pags. 131,132 y 176.
4. United States Phramacopeia, 21 Rev., Merck Publishing, Easton Pa. 1984, p.p. 655-656.
5. H. Theis and Z. Oezbilici, *Arch. Pharm.*, **295**, 194-196, (1962).
6. L. Chafetz and C. Gaglia, *J. Pharm. Sci.*, **60**, (2), 314-316, (1971).
7. H. Goodman and T. Rhodes, *J. Pharm. Sci.*, **3**, (3), 69-79, (1968).
8. M. Tatzuwa and M. Shimoda, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **39**, 50-52, (1950).
9. J. Josseline and E. Neuzil, *The J. Biological Chem.* **73**, (2), 627-651, (1927).
10. A. Kelly and E. Aeurbach, *J Pharm. Sci.*, **50**, 393-395, (1961).
11. G. Schill, *Acta Pharm Suecia*, **2**, 13-46, (1965).
12. M Horioka, *Yakugaku Zasshi, J. Pharm. Sci.* **77**, (2), 206-209, (1957).
13. C. D'Alesio de Carnevale and J. Dobrecky, *Rev. Assoc. Bioquim. Arg.*, **31**, (167), 184-190, (1966).
14. H. Wachsmuth and L. Van Koeckhoven, *J. Pharm. Belg.*, **17**, (7-8), 227, (1962).
15. P. Mesnard and G. Devaux, *J. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **104**, (1), 13-20, (1965).
16. M. Pays and O. Danlos, *Ann. Pharm, Fr.*, **25**, (7-8), 533-536, (1967).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA RICARDO ZAMORA RAMÍREZ

17. H. Wachsmuth and L. Van Koeckhoven, *J. Pharm, Belg.*, **18**, (5-6), 280-283, (1983)
18. C. A. Wachsmuth and L. N. Levin, *J. Pharm. Sci.*, **50**, 490-493, (1961).
19. F. Hiskey and N. Levin, *J. Pharm. Sci.*, **50**, (5), 395-396, (1961).
20. K.T. Koshy and H. Mitchner, *J. Pharm. Sci.*, **52**, (8), 802-803, (1963).
21. Connors, A.K. A Textbook of Pharmaceutical Analysis 2da. ed. John-Wiley and Sons, New York (1980), p.p. 195-258.
22. Sonnesa, A. Principios de Química Ed. Lmusá, México, (1980), pags. 610-615.
24. R.A. Day and A.L. Underwood, Química Analítica Cuantitativa De. Prentice hall Hispanoamericana S.A. México D.F. 1989.
25. Duarte J. E. and Vest D.K., Validating alternate Laboratory assay methods, *Pharm. Tech.*, **may**, (1979), 66-65.
26. Finkelson J.M., Validation by F.D.A. *Pharm. Tech.*, **3**, (1986), p.p. 74-78.

APENDICEEXACTITUD

Estadígrafo de Contraste:

$$T_{cal} = \frac{x - 100}{Sx / \sqrt{n}}$$

Donde:

x = Media poblacional
 Sx = Desviación Estándar
 n = numero total de datos

PRECISIÓN

Estadígrafo de Contraste .:

$$\chi_{ical} = \frac{(n-1)S^2}{\gamma^2}$$

Donde :

n = Numero total de datos
 S = Desviación estándar
 γ = Variación poblacional
 Nivel de significacia = $\alpha = 0.05$
 Grados de Libertad = $gl = n-1$

LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO

Modelo de una línea recta :

$$Y = A + BX$$

Donde :

- A = Ordenada al Origen
 B = Pendiente
 Y = Cantidad Recuperada
 X = Cantidad Adicionada

ORDENADA AL ORIGEN:

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

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

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\left((n\sum X^2) - (\sum X)^2 \right) \left(n\sum Y^2 - (\sum Y)^2 \right)^{1/2}}$$

INFERENCIA PARA A.

$$t_{cal} = \frac{A - A_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{(\sum X_i^2)}{n(\sum(X_i - \bar{X}))^2}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y)^2 - A(\sum Y) - B(\sum XY)}{n}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = S_{y/x} \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

$S_{y/x}$ = Error típico

$\hat{S}_{y/x}$ = Error típico modificado

INFERENCIA PARA B :

$$t_{cal} = \frac{(B - B_0) \left(S_{y/x} \right) \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

T tablas con un nivel del significancia (α) de 0.05

Con grados de libertad (mg) = n-1

REPRODUCIBILIDAD

Modelo de análisis de varianza para dos factores aleatorios.

Notación:

Yijk = Porcentaje cuantificado para el i-esimo analista en el j-esimo día de la k-esima repetición.

Ai = i-esimo analista.

Dj = j-esimo día.

k = Repetición.

ADij = Efecto debido a la interacción analista-día.

Eijk = Error experimental.

 μ = Media poblacional.

Modelo : $Y = \mu + Ai + Dj + ADij + Eijk$
--

TABLA DE ANADEVIA

FUENTE DE ERROR	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F DE CALCULO
Ai	(a-1)	$\frac{Y_i}{bc} - \frac{\sum Y^2}{abc}$	$\frac{SCA}{(a-1)}$	$\frac{MCA}{MCAD}$
Dj	(b-1)	$\frac{\sum Y.^2_j}{ac} - \frac{\sum Y^2}{abc}$	$\frac{SCD}{(b-1)}$	$\frac{MCD}{MCAD}$
ADij	(a-1)(b-1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{c} - \frac{\sum Y_i^2}{bc} - \frac{\sum Y.^2_j}{ac} + \frac{\sum Y^2}{abc}$	$\frac{SCAD}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{MCAD}{MCError}$
Eijk	(a x b)(c-1)	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum Y_{ij}^2}{c}$	$\frac{SCE}{(a \times b)(c-1)}$	

