



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN TABLETAS
COMERCIALES**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARINO ALEJANDRO OLMEDO GARCÍA



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente..... Profesor Pedro Villanueva González
Vocal..... Profesora. Ernestina Cervera Flores
Secretario Profesora. María del Socorro Alpizar Ramos
1er. Suplente Profesor. Francisco García Olivares
2º. Suplente Profesor. Iván Alejandro Franco Morales

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA LABORATORIO 3D EDIFICIO A
FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA UNAM

ASESOR DEL TEMA

PROFESOR PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE

MARINO ALEJANDRO OLMEDO GARCÍA

Dedicatorias:

Este trabajo se lo dedico principalmente a mi mamá... Gracias Alejandra Justina García Valverde... ya que me diste la oportunidad de poder realizar mi sueño... El de ser un profesionista... gracias mamá con mi infinito amor y afecto... ..tus años de incertidumbre y preocupación, no fueron en vano.....

A mis hermanos Alfredo, Agustín y Víctor Hugo, gracias hermanos por soportarme y apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida, con mi profundo cariño les dedico este trabajo.

A mis apreciables amigos, a los que se debo su afecto, comprensión y solidaridad Delia, Jorge, Omar, Germán, Nohemí, Roberto, Alberto, Shantal León Felipe, David, Leobardo, Laura, Elizabeth, Karla, Guillermina, Sonia, Juan Carlos, Fernando, Anel, Tonatzin, Graciela, Yazmín, Javier Alejandro, René, Mauricio y Genaro.

*A todos mis compañeros del laboratorio 3D, de la Facultad de Química Sandra, Sonia, Elena, Leslie, Pietr, Rafael, Fernando, Karina, Cinthia, Irasema,
A Juan Manuel gracias manolín por ayudarme te debo una*

*A mis tíos Eusebio García Valverde, Moises Valverde Ruiz, Toribio Castañeda Infante y a su familia, gracias por su apoyo y amistad.
Y aunque no lo crean a mi cotorrita tuzita.*

Este trabajo tiene una dedicación especial para dos personas a los que nunca olvidaré y que son una muy parte importante en mi vida...

A Eduardo Blas Añorve Soto (q. e. p. d)... Gracias Eduard por tu apoyo... el destino quiso que te fueras, pero por siempre te recordaremos, fuiste una persona importante y querida Eduard

A mi papá el Licenciado Marino Olmedo Castañeda (q. e. p. d.) con mi profundo amor y cariño... lamentablemente ya no estás presente físicamente papá... sin embargo este trabajo te lo dedico con mucho afecto y cariño profundo.....

Agradecimientos.

A Pedro Villanueva por darme la oportunidad, la confianza y la paciencia de poder acabar este trabajo experimental, gracias Pedro.....

A la profesora Ernestina Cervera Flores

A la profesora María del Socorro Aspizar Ramos

A los suplentes, el profesor Francisco García Olivares e Iván Alejandro Franco Morales

A la Facultad de Química por haberme la cual me dio la oportunidad de conocer a grandes personas, a mis maravillosos amigos, a estupendos profesores, y sobre todo a desarrollarme como profesionista.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi querida y máxima casa de estudios del país, siendo para mí un honor haber estudiado en esta estupenda Universidad, tanto en nivel de preparatoria como en licenciatura.

Índice.

| | |
|--|-----------|
| Introducción | 1 |
| Objetivo | 2 |
| Antecedentes | 2 |
| Equilibrios oxidación – reducción | 9 |
| Complejo de ortofenantrolina con hierro (II) | 11 |
| Espectroscopia de absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible. | 12 |
| Espectro electromagnético | 12 |
| Análisis cuantitativo | 14 |
| Ley de Lambert – Beer | 14 |
| Instrumentación espectroscópica | 16 |
| Validación del método analítico | 18 |
| Clasificación de los métodos analíticos | 18 |
| Determinaciones, metodología y criterios de aceptación | 21 |
| Precisión del sistema. | 21 |
| Linealidad del sistema | 21 |
| Especificidad | 22 |
| Exactitud y Repetibilidad del método | 23 |
| Linealidad del método | 24 |
| Precisión del método | 24 |
| Estabilidad analítica de la muestra | 25 |
| Límite de detección | 26 |

| | |
|---|-----------|
| Parte experimental | 29 |
| Material empleado en el laboratorio para la validación del método analítico para la cuantificación del ácido ascórbico. | 30 |
| Procedimiento experimental propuesta para la validación del método analítico. | 32 |
| Diagrama de flujo para obtener el espectro de absorción del producto de la reacción entre el ácido ascórbico a diferentes concentraciones, y el ión complejo, FeL_3^{3+}. | 32 |
| Diagrama de flujo para obtener la cinética de la reacción entre el ácido ascórbico y el complejo ferrina oxidado. | 33 |
| Diagrama de flujo para la especificidad del analito | 34 |
| Diagrama de flujo de la especificidad del placebo adicionado | 35 |
| Diagrama de flujo para la precisión del sistema | 36 |
| Diagrama de flujo para la linealidad del sistema | 37 |
| Diagrama de flujo para la exactitud y repetibilidad del método | 38 |
| Diagrama de flujo para la linealidad del método | 39 |
| Diagrama de flujo para el límite de detección | 40 |
| Diagrama de flujo para la precisión del método, precisión interdía o tolerancia interdía / analista. | 41 |
| Diagrama de flujo para la estabilidad analítica de la muestra | 42 |
| Diagrama de flujo para el análisis de muestra comercial | 43 |
| Diagrama de flujo para manejo de residuos | 44 |
| Tabla de resultados | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Cinética de la reacción | 47 |
| Especificidad | 49 |
| Precisión del sistema | 50 |
| Linealidad del sistema | 51 |
| Linealidad del sistema, absorbancia contra concentración promedio | 52 |
| Exactitud y repetibilidad del método | 53 |
| Placebo con muestra analítica | 53 |
| Resultados para muestras estándar | 53 |
| Ejemplo del cálculo realizado | 54 |
| Linealidad del método | 54 |
| Cantidad adicionada – Cantidad recuperada, de la linealidad del método. | 55 |
| Datos del estándar | 55 |
| Ejemplo del cálculo realizado | 56 |
| Precisión del método, precisión intermedia o tolerancia interdía/analista. | 57 |
| Primer día, analista 1 | 57 |
| Primer día, analista 2 | 57 |
| Ejemplo del cálculo realizado para la precisión del método | 57 |
| Estándar para el analista 1 y 2, primer día | 58 |
| Segundo día, analista 1 | 58 |
| Segundo día, analista 2 | 58 |
| Estándar para los analistas 1 y 2, segundo día | 59 |

| | |
|--|-----------|
| Ejemplo del cálculo realizado para la precisión del método | 59 |
| Precisión intermedia interdía / analista | 59 |
| Estabilidad analítica de la muestra | 60 |
| Estabilidad analítica de la muestra | 61 |
| Estabilidad analítica del estándar | 61 |
| Ejemplo del cálculo para la estabilidad analítica de la muestra | 62 |
| Por ciento de recobro de la estabilidad analítica de la muestra | 63 |
| Relación entre el por ciento de recobro para las condiciones de almacenaje en los diferentes tiempos. | 63 |
| Estabilidad analítica, límite de detección | 65 |
| Límite de detección | 65 |
| Absorbancia contra concentración estándar, curva patrón para el límite de detección. | 66 |
| Resultados de los blancos (placebo analítico) | 67 |
| Muestra comercial | 68 |
| Análisis del producto I | 68 |
| Análisis del producto II | 69 |
| Muestra estándar para el producto comercial I y II | 69 |
| Ejemplo del cálculo de la cantidad de principio activo en mg / tableta del ácido ascórbico. | 69 |
| Análisis de Resultados | 70 |
| Conclusiones | 73 |
| Anexo | 74 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Formulación | 74 |
| Celulosa microcristalina | 74 |
| Sucrosa | 75 |
| Kollidon | 75 |
| Ciclamato sódico | 76 |
| Polietilenglicol (PEG) | 76 |
| Aerosil | 77 |
| Sacarina Sódica | 77 |
| 1,10 – fenantrolina | 78 |
| Abreviaturas | 79 |
| Glosario | 83 |
| Bibliografía | 89 |

Lista de tablas.

| | |
|--|-----------|
| Tabla No. 1 Regiones del espectro: UV, visible e IR | 12 |
| Tabla No. 2 Parámetros de desempeño a estudiar durante la validación de un método analítico | 20 |
| Tabla No. 3 Formulación de los excipientes obtenidos de la BASF para tabletas masticables de ácido ascórbico. | 74 |

Tabla de resultados

| | |
|--|-----------|
| Tabla No. 1 Por ciento de transmitancia y absorbancia para las diferentes disoluciones obtenidas al hacer reaccionar ácido ascórbico con la ferrina en su forma oxidada. | 45 |
| Tabla No. 2 Datos de la absorbancia de la ferroína en su forma reducida en función de la concentración del ácido ascórbico. | 46 |
| Tabla No. 3 Absorbancia de la ferroína en su forma reducida en intervalos de 10 minutos. | 47 |
| Tabla No. 4 Datos de las absorbancias obtenidas del producto de la reacción, constituido por la muestra estándar, placebo con la muestra analítica y el placebo. | 49 |
| Tabla No. 5 Absorbancias constantes obtenidas de la ferroína en su forma reducida. | 50 |
| Tabla No. 6 Resultados de las absorbancias obtenidas a diferentes concentraciones, para la linealidad del sistema. | 51 |
| Tabla No. 7 Promedio de las absorbancias obtenidas para las diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ a partir de los datos de la tabla No. 8 en al linealidad del sistema. | 52 |
| Tabla No. 8 Absorbancias de la cantidad adicionada de la muestra problema. | 53 |
| Tabla No. 9 Resultados de la muestra estándar | 53 |
| Tabla No. 10 Triplicado para cada nivel de concentración de la linealidad del método. | 54 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla No. 11 Valores de la cantidad adicionada, cantidad recuperada y por ciento de recobro, para la linealidad del método. | 55 |
| Tabla No. 12 Datos del estándar para la linealidad del método, validación de un método analítico. | 55 |
| Tabla No. 13 Datos de la precisión del método, primer día analista 1 | 57 |
| Tabla No. 14 Datos de la precisión del método, primer día analista 2 | 57 |
| Tabla No. 15 Datos del estándar para el analista 1 y 2, primer día | 58 |
| Tabla No. 16 Datos de la precisión del método, segundo día analista 1 | 58 |
| Tabla No. 17 Datos de la precisión del método, segundo día analista 2 | 58 |
| Tabla No. 18 Datos del estándar para el analista 1 y 2, segundo día | 59 |
| Tabla No. 19 Datos finales del analista 1 y 2 con respecto a la cantidad recuperada, en los dos días que se emplearon para el análisis de la muestra. | 59 |
| Tabla No. 20 Absorbancias de la muestra analítica, cantidad adicionada y cantidad recuperada, en las diferentes condiciones de almacenamiento propuestos para en análisis de la estabilidad analítica de la muestra. | 60 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Tabla No. 21 | Datos de las absorbancias, cantidad recuperada, cantidad adicionada, para la estabilidad analítica de la muestra. | 61 |
| Tabla No. 22 | Datos de las absorbancias, cantidad recuperada, cantidad adicionada, para la estabilidad analítica del estándar. | 62 |
| Tabla No. 23 | Datos del por ciento de recobro para la estabilidad analítica de la muestra. | 63 |
| Tabla No. 24 | Datos comparativos finales del por ciento de recobro en las diferentes condiciones de almacenaje. | 63 |
| Tabla No. 25 | Datos correspondientes a las concentraciones propuestas para el límite de detección, con sus respectivas absorbancias. | 65 |
| Tabla No. 26 | Curva patrón para el límite de detección | 66 |
| Tabla No. 27 | Datos de las absorbancias de los blancos (placebo analítico). | 67 |
| Tabla No. 28 | Datos del análisis del producto comercial “Cevalin”. | 68 |
| Tabla No. 29 | Datos del análisis del producto comercial ácido ascórbico en productos similares. | 69 |
| Tabla No. 30 | Datos de la muestra estándar para el análisis de las muestras comerciales. | 69 |

Lista de gráficas

| | |
|---|-----------|
| Gráfica No. 1 Curvas de absorción de los productos de la reacción entre el ácido ascórbico con el complejo ferrina en su estado oxidado. | 46 |
| Gráfica No. 2 Linealidad de la disolución de la ferroína reducida, absorbancia en función de la concentración del ácido ascórbico. | 47 |
| Gráfica No. 3 Cinética de la reacción | 48 |
| Gráfica No. 4 Especificidad | 50 |
| Gráfica No. 5 Precisión del sistema | 51 |
| Gráfica No. 6 Linealidad del sistema | 52 |
| Gráfica No. 7 Linealidad del método | 56 |
| Gráfica No. 8 Estabilidad analítica de la muestra, luz a temperatura ambiente | 64 |
| Gráfica No. 9 Estabilidad analítica de la muestra, temperatura a 4 °C | 64 |
| Gráfica No. 10 Estabilidad analítica de la muestra, oscuridad a temperatura ambiente | 65 |
| Gráfica No. 11 Límite de detección | 66 |
| Gráfica No. 12 Curva patrón para la absorbancia en el límite de detección | 67 |

Lista de reacciones.

| | |
|---|-----------|
| Reacción 1 Equilibrio óxido – reducción del ácido ascórbico | 3 |
| Reacción 2 Equilibrio ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico inducido enzimáticamente. | 5 |
| Reacción 3 Importancia del ácido ascórbico en la formación de la hidroxiprolina. | 6 |
| Reacción 4 Ejemplo de las reacciones óxido – reducción | 10 |
| Reacción 5 Ejemplo de las reacciones óxido – reducción | 10 |
| Reacción 6 Equilibrio óxido – reducción del sistema ferrina en su forma oxidada y ferroína en su forma reducida. | 11 |
| Reacción 7 Excitación electrónica | 13 |
| Reacción 8 Conversión de la energía de excitación en calor | 13 |
| Reacción 9 Reacción entre el ión complejo, ortofenantrolina hierro (III) en su forma oxidada y ácido ascórbico. | 29 |

Lista de figuras.

| | |
|---|----------|
| Figura 1 Estructura del ácido ascórbico | 3 |
| Figura 2 Fórmula estructural del ácido L – idónico | 3 |
| Figura 3 Dimetil éter del ácido ascórbico | 4 |
| Figura 4 Ácido L – treónico | 4 |
| Figura 5 Ácido oxálico | 4 |

Introducción.

El Ácido Ascórbico conocido como vitamina C, forma parte de la dieta de los seres humanos, la deficiencia de esta vitamina puede provocar enfermedades como: escorbuto, gingivorrea, problemas cardiovasculares, cáncer, etc., por lo cual se han realizado importantes investigaciones que abarcan métodos biológicos y métodos fisicoquímicos para la cuantificación e identificación de esta vitamina.

Este trabajo está enfocado a validar un método analítico para cuantificar ácido ascórbico basado en una reacción de oxidación – reducción, donde el ácido ascórbico se oxida por el complejo del hierro, Fe (III)-1,10–fenantrolina (FeL_3^{3+}) que pasa a ácido dehidroascórbico, mientras se reduce el complejo del hierro que pasa a ferroína (FeL_3^{2+}), presentando la reacción un cambio de coloración de azul claro a rojo intenso, donde la absorbancia máxima se presenta a la longitud de onda de 510 nm, teniendo como medio una disolución reguladora de acetatos de pH 4.7.

Se aplicará la ley de Lambert - Beer para el ácido ascórbico, está se cumple a concentraciones bajas mientras por Fierro (III) se manejan un poco más altas.

El equipo de medición a emplear es el Espectrofotómetro UV/Visible marca Hitachi Perkin- modelo Elmer 139.

En el desarrollo del método analítico se utilizó: el estándar de ácido ascórbico, el producto comercial que lo contiene y el placebo. El método analítico establecido se validó

En la validación de este método se determinará si es exacto, preciso y lineal, por lo que es importante realizar las buenas prácticas de laboratorio con el fin de evitar errores que puedan ser determinantes.

Objetivos:

- Validar un método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico en su presentación comercial tabletas, diseñar y desarrollar la parte experimental de la validación a partir de sus propiedades físicas y químicas.
- Determinar que parámetros pueden afectar a la validación, y si en dado caso no existen tales parámetros indicar los beneficios de este método.

Antecedentes.

El ácido ascórbico conocido también como vitamina C, al igual que todas las vitaminas, es un compuesto biológicamente activo esencial para la salud, el crecimiento y el desarrollo general del hombre.

Histy y Frohlich, en 1907, descubrieron la vitamina C y L. Per y C. Rinh, pusieron de manifiesto la naturaleza química de la vitamina C. Szent-Gyorgyi y W. King, fueron los primeros en aislar el ácido ascórbico de diversos productos, asignándole la fórmula empírica de $C_6 H_8 O_6$ y dándole el nombre de ácido hexurónico, así como también demostraron sus propiedades antiescorbúticas.

El ácido ascórbico (ácido L-ascórbico, ácido ioascórbico, ácido L-idónico, 3-oxo-L-gulofuranolactona, vitamina antiescorbútica o ácido cevitamico), pertenece a las vitaminas hidrosolubles, se le considera como una sustancia antioxidante y tiene una función importante en la reducción y absorción del hierro.

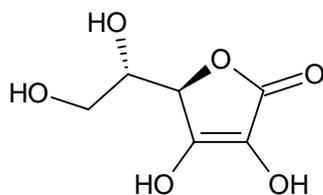
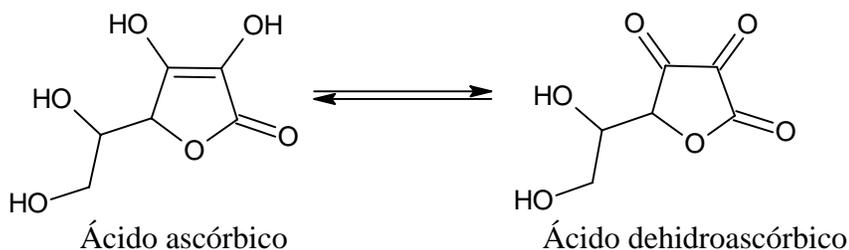


Figura 1. Estructura del ácido ascórbico

Su fuerte capacidad reductora depende del sistema enodiol, que da lugar a una 1,2 – diona cuando se oxida a ácido dehidroascórbico



Reacción 1. Equilibrio óxido-reducción del sistema ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico.

El ácido dehidroascórbico, tiene la misma actividad vitamínica del ácido ascórbico y, casualmente no es ácida. El ácido 2,3-diceto-L-gulónico, producto de la hidrólisis del ácido dehidroascórbico, es inactivo. El sistema reversible de oxidación-reducción, justifica la función biológica de la vitamina, los grupos enólicos son causantes del carácter ácido de la molécula.

La reducción catalítica del ácido ascórbico dio lugar al compuesto denominado ácido L - idónico que sirvió para establecer la cadena lineal del esqueleto carbonado, mientras que por acetilación del ácido, dio origen al tetraacetato con lo que se comprobó la existencia de cuatro grupos hidroxilo

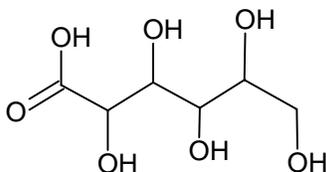


Figura 2. Fórmula estructural del ácido L - idónico

Dos de ellos son enólicos y forman un éter metílico que ya no tiene propiedades reductoras.

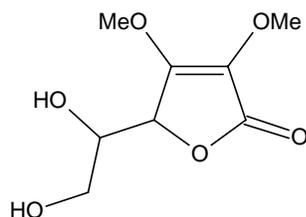


Figura 3 Dimetil éter del ácido ascórbico

La oxidación del ácido ascórbico con hipoyodito sódico proporciona ácido L-treónico y ácido oxálico, con rendimientos cuantitativos. El ácido L-treónico sirvió para fijar dos centros asimétricos.

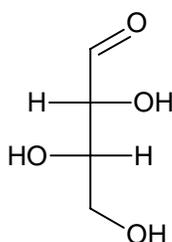


Figura 4 Ácido L- treónico

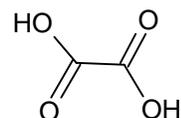


Figura 5 ácido oxálico

El ácido ascórbico, es ópticamente activo y solo la forma levógira es antiescorbútica. Se presenta en forma de cristales blancos monocíclicos, su punto de fusión es de 190-192 °C, estable a temperatura ambiente, cuando está seco, en preparaciones acuosas se oxida al ser expuesto al aire y a la luz.

En agua presenta una densidad de 1,65 g/mL y una rotación específica de 20,5 ° mientras que en metanol de 48°, su peso molecular es de 176,12 g/mol, donde C = 40,92%, H= 4,58% y O = 54,51%.

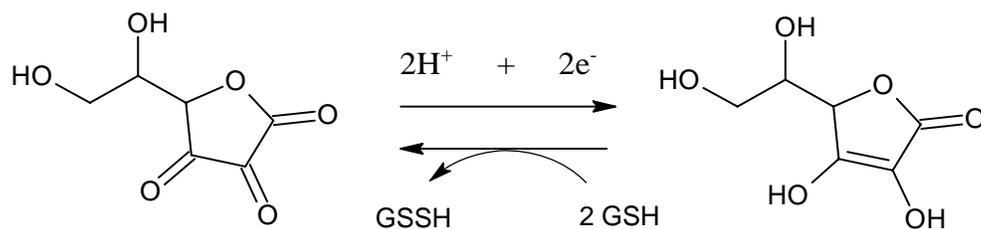
El espectro de absorción, presenta en ultravioleta una λ de máxima absorción a 245 nm a pH=2, y a 265 nm a pH=6,4 con un coeficiente de absorción $\epsilon = 170000$.

Es muy soluble en agua (1 gramo en 3 mL), alcohol (1 gramo en 30 mL), en glicerol (1 gramo en 100 mL), en propilenglicol (1 gramo en 20 mL). Es insoluble en éter, cloroformo, benceno.

El ácido ascórbico se encuentra en las células vegetales vivas como son los tomates, lechuga, perejil, pimiento verde, etc., y en frutas cítricas como la naranja, limón, toronja y la mandarina.

Algunas especies de animales, incluidos el hombre, cobayos, monos y algunas aves y peces, carecen de la enzima gulonolactona oxidasa, también denominada L-gluconolacton oxidasa, por lo que son incapaces de sintetizar ácido ascórbico y lo ha de incorporar en la dieta.

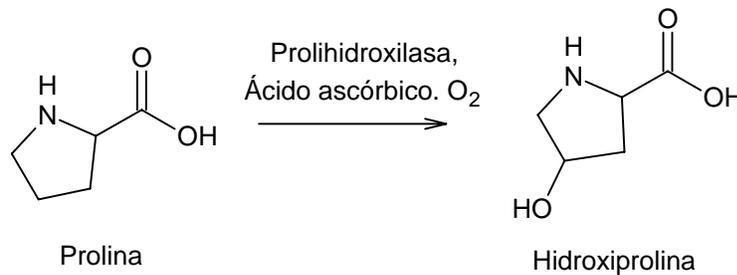
En su forma oxidada el ácido dehidroascórbico, puede reducirse nuevamente ante varios agentes reductores, como por ejemplo el glutatión, que de esta manera, las dos formas del ácido ascórbico, constituyen un sistema reversible del óxido reducción.



Reacción 2 Equilibrio ácido ascórbico- ácido dehidroascórbico inducido enzimáticamente

La exacta función del ácido ascórbico en el organismo, es desconocida, se piensa que ejerce su acción en la respiración celular, también, que se requiere para el metabolismo de la tiroxina y la biosíntesis del ácido fólico y folínico, es necesario para la producción normal de fibrillas del tejido conectivo y de sustancias de base celular e interviene en diversos sistemas enzimáticos de oxidación.

El ácido ascórbico, es esencial para procesos metabólicos, crecimiento normal especialmente de huesos y dientes, también es un factor antiestrés e influye en glándulas suprarrenales y tiene acción antiinfecciosa, toma parte en la hidroxilación de la prolina, para la formación de la hidroxiprolina, catalizada por la hidroxilasa de la colágena prolina, el cual participa en la estabilización de la estructura del colágeno



Reacción 3. Importancia del ácido ascórbico en la formación de la hidróxiprolina

El ácido ascórbico, es importante en la hidroxilación de la dopamina para formar noradrenalina, participa como reductor en el metabolismo de la tiroxina, se le relaciona con la síntesis de purinas y de timina, para la formación de DNA y es necesario para la incorporación del hierro en la ferritina.

Las enfermedades que se generan debido a las bajas concentraciones de vitamina C en los leucocitos incluyen el hipertiroidismo, neoplasia y úlcera péptica. También suele haber carencia de vitamina C, durante el embarazo y la lactancia, así como también en la lentitud en la consolidación de las fracturas óseas y en el retraso de la cicatrización de heridas.

La deficiencia de la vitamina C, conduce al escorbuto provocando lesiones patológicas en huesos y en vasos sanguíneos, puede producir trastornos físicos, los cuales son fáciles de advertir por síntomas no específicos como laxitud, irritabilidad, pérdida de peso y dolores musculares y articulares en piernas y muslos. Su deficiencia, deteriora la formación del colágeno, comprometiendo la integridad estructural del tejido conectivo. Se producen hemorragias en la piel, muslos y encías, con edemas progresivos.

La dosis alta de vitamina C, puede reducir la frecuencia de cáncer vesical, en fumadores de cigarrillos. Se han encontrado, altas concentraciones de un metabolito del triptófano, el ácido 3-hidroxiantranílico, que es frecuente en la orina de quienes fuman y en pacientes con cáncer vesical.

El ácido ascórbico se absorbe casi en su totalidad, en el tracto intestinal, se le encuentra en la sangre, tanto en suero como en glóbulos, encontrándose en mayor proporción en el suero, también se le encuentra distribuido por todos los tejidos del organismo. Las concentraciones mayores, se encuentran en tejido glandular y las menores, en tejido adiposo.

El contenido de ácido ascórbico en la sangre, refleja el estado general de un organismo sano, todo individuo con un nivel de ácido ascórbico en sangre de 1,5 – 2,0 mg en 100 mL, esta saturado de vitamina C, de 0,5 mg/100 mL, está en estado normal bajo y menores a 0,5 mg/mL, se asocia al escorbuto clínico. El riñón lo elimina cuando el nivel sanguíneo es superior al umbral, que es aproximadamente de 1,4 mg/100 mL.

Pocas son las acciones farmacológicas que posee la vitamina C, la administración de cantidades mayores a las necesidades fisiológicas, no producen efectos demostrables, sin embargo en mujeres embarazadas produce sangrado tipo menstruación, la cual demuestra que este ácido, induce al aborto, así como también puede causar infertilidad.

Las necesidades diarias de la vía vitamina C en el hombre:

- | | |
|-------------|-------------|
| ▪ Lactantes | 8 – 50 mg |
| ▪ Niños | 22 – 100 mg |
| ▪ Adultos | 28 – 100 mg |

En ciertas circunstancias la tasa de desnutrición y consecuentemente la necesidad de vitamina C, se encuentra significativamente aumentada como ocurre en algunas enfermedades infecciosas. Un tuberculoso, necesita doble ingesta que un individuo normal, para quedar saturado. Análogamente de necesidades vitamínicas ocurre en el hipertiroidismo, úlcera péptica, tumores embarazo y lactancia.

Los métodos analíticos encontrados en la literatura, para llevar a cabo estudios de cuantificación e identificación de ácido ascórbico están basados en las propiedades óxido - reductoras que posee éste ácido, de interaccionar con luz en determinada longitud de onda, en la respuesta electroanalítica que posee dicho ácido, o en la combinación de cualquiera de estas tres propiedades.

Los métodos analíticos para la detección y principalmente para la cuantificación del ácido ascórbico, se pueden clasificar en:

- Métodos cromatográficos
- Métodos titulométricos
- Métodos espectroscópicos
 - Ultravioleta
 - Visible
 - Infrarrojo
 - Espectrometría de masas
 - Fluorescencia
- Métodos electroquímicos
 - Potenciometría
 - Polarografía
 - Voltamperometría
 - Coulumbimetría

Esto nos lleva a clasificar a los métodos analíticos apropiados para cuantificar al ácido ascórbico, sin importar su procedencia en:

- Métodos instrumentales
- Métodos no instrumentales

Y los métodos instrumentales, a su vez, se dividirán en forma general en:

- Métodos ópticos
- Métodos electrométricos
- Métodos de separación.

De los métodos analíticos más utilizados en la actualidad se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución o de presión, simbolizada como CLAR o HPLC por sus siglas en inglés, el cual es una de las técnicas con el mayor número de trabajos reportados para la determinación de ácido ascórbico. En la realización de este trabajo el método utilizado para la determinación de ácido ascórbico en preparaciones farmacéuticas siendo estas tabletas comprimidas, es un método simple, rápido y exacto, basado en la medición de la absorbancia producida por el complejo ferroína, (tris[1,10-fenantrolina]hierro (II)), obtenido al hacer reaccionar el ácido ascórbico con el complejo formado al hacer reaccionar al hierro(III), con la 1,10-fenantrolina a pH controlado denominado ferrina midiendo a una longitud de onda de 510 nm, por tanto se hará un resumen breve de reacción de redox y espectrometría visible.

Equilibrios oxidación – reducción.

El equilibrio de oxidación–reducción, al que se le designa por su nombre abreviado de redox, es un proceso químico en el que cambia el número de oxidación de un elemento, ión o molécula. El proceso puede implicar la transferencia completa de electrones para formar enlaces iónicos, o sólo la transferencia parcial o corrimiento de electrones para formar enlaces covalentes.

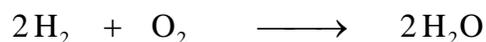
Hay oxidación siempre que el número de oxidación de un elemento aumente como resultado de pérdida de electrones, la reducción es cuando el número de oxidación de un elemento disminuye como resultado de ganancia de electrones.

Por ejemplo, el cambio del número de oxidación de +2 a +3, o de -1 a 0, es oxidación; en cambio de +5 a +2, o de -2 a -4, es reducción. La oxidación y la reducción

se llevan a cabo simultáneamente en una reacción química; no se puede efectuar una sin que se presente la otra.

La oxidación-reducción sucede en muchas reacciones de combinación, descomposición y de desplazamiento sencillo.

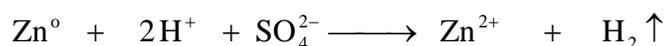
Ejemplo 1



Reacción 4

Ambos reactivos, el hidrógeno y el oxígeno, son elementos en estado libre y tienen un número de oxidación de cero. En el producto, agua, el hidrógeno se ha oxidado a +1, y el oxígeno se ha reducido a -2. La sustancia que causa un aumento en el estado de oxidación de otra se llama agente oxidante y la sustancia que causa una disminución del estado de oxidación de otra se denomina reductor, por lo que en la reacción anterior el agente oxidante es oxígeno libre y el reductor es hidrógeno libre.

Ejemplo 2



Reacción 5

En esta reacción se oxida el zinc metálico, y los iones hidrógeno se reducen. El zinc es el agente reductor, y los iones hidrógeno el agente oxidante. Los electrones pasan del zinc metálico a los iones hidrógeno.

Por tanto:

Oxidación: Aumento en el número de oxidación. Pérdida de electrones.

Reducción: Disminución en el número de oxidación. Ganancia de electrones.

El número o índice de oxidación de un átomo, que a veces se le llama su estado de oxidación, representa al número de electrones ganado, perdido, o compartido desigualmente por dichos átomos. El número de oxidación pueden ser cero, positivos o

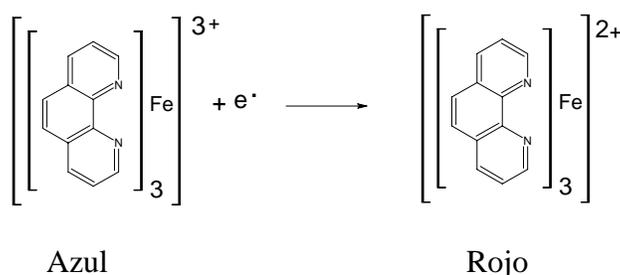
negativos. Cuando el índice o número de oxidación de un átomo es cero, el átomo tiene el mismo número de electrones asignados que los que tiene el átomo neutro. Cuando el número de oxidación es positivo, el átomo tiene menos electrones asignados que los que hay en el átomo neutro. Cuando el número de oxidación es negativo, el átomo tiene más electrones asignados.

Complejos de ortofenantrolinas con hierro (II).

Una serie de compuestos orgánicos, conocidos con el nombre de las 1,10-fenantrolina u ortofenantrolina forman complejos estables con el hierro (II) y otros iones. El compuesto original tiene un par de átomos de nitrógeno, situados en posición tal que cada átomo puede formar un enlace covalente con el ión hierro (II).

Tres moléculas de ortofenantrolina se combinan con un ión de hierro, de modo que se forma la estructura al margen conocida como ferroína y se representa por medio $[(\text{fen})_3\text{Fe}]^{2+}$.

El hierro en el complejo de la ferroína experimenta una reacción de oxidación-reducción que es reversible y que se puede escribir en la siguiente ecuación:



Reacción 6. Equilibrio óxido-reducción del complejo ortofenantrolina con fierro, donde en su forma oxidada se denominada ferrína, mientras que la reducida se denominada ferroína.

En la práctica, el color de la forma oxidada es demasiado tenue para detectar, de modo que el cambio de color que acompaña a esta reducción va desde casi incoloro hasta rojo.

De todos los indicadores redox, la ferroína es la que más se acerca al indicador ideal. Su reacción es rápida y reversible, su cambio de color es intenso y sus disoluciones son estables y de fácil preparación.

Espectroscopia de absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible.

Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por los analitos, los métodos de absorción se basan en la disminución de la potencia (atenuación) de un haz de radiación electromagnética como consecuencia de su interacción con el analito. Los términos absorción y emisión tienen el mismo significado que en su uso cotidiano: la absorción significa tomar algo, y la emisión significa desprenderlo.

El modelo onda no explica fenómenos relacionados con absorción y emisión de la energía radiante. En relación con estos procesos, se puede considerar a la radiación electromagnética como paquetes discretos de energía o partículas, llamados fotones o cuantos. Estas dos consideraciones de la radiación como partícula y ondas no son excluyentes entre sí, sino más bien complementarias.

Espectro electromagnético

El espectro electromagnético abarca un amplio intervalo de longitudes de onda y de frecuencias, en el siguiente cuadro se muestra algunas de las diferentes regiones del espectro electromagnético con sus respectivos intervalos de longitudes de onda.

| Región | Intervalo de longitudes de onda |
|------------|---------------------------------|
| UV | 180 – 380 nm |
| Visible | 380 – 780 nm |
| IR cercano | 0.78 – 2.5 μm |
| IR medio | 2.5 – 50 μm |

Tabla 1 Regiones del espectro: UV, visible e IR

Espectrofotometría visible ultravioleta.

Las medidas de absorción basadas en la radiación ultravioleta o visible encuentran extensa aplicación en la determinación cualitativa y cuantitativa de especies moleculares y iónicas.

La absorción de radiación ultravioleta o visible por especie atómica, molecular M o iónicas, se puede considerar que es un proceso en dos etapas, la primera de las cuales implica una excitación electrónica, como se muestra a continuación:



Reacción 7

El producto de la reacción entre M y el fotón $h\nu$, donde h es la constante de Planck, mientras que ν es la frecuencia de la radiación electromagnética, es una especie electrónicamente excitada que se representa por M^* . El tiempo de vida de la especie excitada es breve, de 10^{-8} a 10^{-9} s, su existencia acaba por alguno de los diversos procesos de relajación. El tipo más común de relajación implica la conversión de la energía de excitación en calor; esto es:



Reacción 8

La relajación puede tener lugar también por descomposición de M^* dando nuevas especies; un proceso de este tipo se llama reacción fotoquímica. Alternativamente, la relajación puede implicar reemisión de radiación fluorescente o fosforescente. La cantidad de energía térmica desprendida por la relajación es por lo general no detectable, de este modo, las medidas de absorción provocan una perturbación mínima en el sistema en estudio.

La absorción de radiación ultravioleta o visible proviene de la excitación de los electrones enlazantes y como consecuencia, las longitudes de onda de los picos de

absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces que existen en las especies en estudio, por tanto las aplicaciones de la espectroscopia de absorción ultravioleta y visible son importantes para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes como son los grupos funcionales de compuestos orgánicos, cetonas, aminas, derivados nitrados, etc. no tienen en general un alto grado de especificidad, sin embargo son muy adecuados en el caso de muchas sustancias, ya que constituyen un medio útil adicional de identificación.

Análisis cuantitativo: leyes de la absorción molecular

Ley de Lambert - Beer.

La región ultravioleta – visible se ha utilizado ampliamente en análisis cuantitativo. Las medidas se basan en la Ley de Lambert – Beer que relaciona, en determinadas condiciones, la absorción de la radiación con la concentración de un compuesto en disolución.

El origen de esta ley se remonta a los trabajos del matemático francés Lambert que estableció, en el siglo XVIII, las bases de la fotometría. Igualmente Beer, físico alemán del siglo XIX, estableció la ley que permite calcular la cantidad de radiación transmitida por un compuesto en disolución en una matriz no absorbente, después de su paso a través de un determinado espesor, la expresión matemática de la ecuación de Lambert-Beer es:

$$A = \epsilon l C$$

Donde A, representa la absorbancia, parámetro óptico adimensional registrado por el espectrofotómetro, l es el paso óptico de la radiación en cm, C es la concentración molar y ϵ_{λ} es el coeficiente de absorción cuyas unidades son $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a la longitud de onda λ a la cual se realiza la medida. El coeficiente de absorción, llamado también coeficiente de extinción, es característico del compuesto analizado y depende de la temperatura y del disolvente.

Esta ley, que se refiere a la fracción de la luz absorbida, se cumple con las siguientes condiciones:

- La radiación utilizada debe ser monocromática.
- Las concentraciones deben ser bajas.
- La disolución de los analitos no debe ser fluorescente ni heterogénea.
- El soluto no debe sufrir transformaciones fotoquímicas.
- El soluto no debe originar asociaciones variables con el disolvente.

La transmitancia T es una medida de la atenuación del haz luminoso basada en la comparación entre la intensidad transmitida I , y la intensidad incidente I_0 dependiendo de que la muestra esté o no situada en el trayecto óptico entre la fuente y el detector. La transmitancia T , se expresan por un cociente o como un porcentaje:

$$T = \frac{I}{I_0} \qquad \%T = \frac{I}{I_0} * 100$$

Mientras la absorbancia está definida por:

$$A = -\log T \qquad A = 2 - \log \%T$$

El error fotométrico es el error aleatorio asociado con las mediciones de luz, y la precisión de una medición depende del mismo. Sin embargo, debido a la relación logarítmica entre T y A , la precisión de la medición de concentración difiere dentro del intervalo de absorbancia medible.

En general se emplea la absorbancia en los análisis, porque su valor es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz.

Instrumentación espectroscópica

Fuente de radiación.

Para las longitudes de onda mayores a 320 nm, se utiliza una lámpara de tungsteno la cual opera a una temperatura de 2900K, produciendo una radiación adecuada para la región de longitud de onda entre 350 y 2500 nm.

La lámpara de filamento de tungsteno contiene una pequeña cantidad de yodo dentro de la caja de cuarzo que aísla el filamento. El cuarzo permite que el filamento opere a una temperatura aproximada a 3500 K, con lo cual se producen intensidades mayores y aumenta el intervalo de la lámpara a la región ultravioleta, La lámpara de deuterio, es la más utilizada en la región del ultravioleta.

Selectores de longitud de onda.

Normalmente vienen equipados con uno o más dispositivos que restringen a la radiación que se va a medir a una banda estrecha para que se absorba o emita por el analito. Estos dispositivos aumentan mucho la selectividad y sensibilidad de un instrumento. Para proporcionar bandas estrechas de radiación, se utilizan dos tipos generales de selectores de longitudes de onda: los monocromadores y los filtros.

Los monocromadores tienen la ventaja de que la señal de salida de longitud de onda se puede variar continuamente a lo largo de un intervalo espectral considerable, hay 2 tipos generales, uno de ellos utiliza una red para dispersar la radiación en sus longitudes de onda individuales; en el otro se utiliza un prisma para este fin.

Los filtros tienen la ventaja de que son simples, resistentes y económicos. En general, los filtros se catalogan por la longitud de onda a la cual se obtiene la transmisión máxima y por sus anchos de banda efectivos.

Detectores de radiación y transductores.

Un detector es un dispositivo que registra la existencia de algún fenómeno físico, hay dos tipos de transductores: uno que responde a los fotones y otro que responde al calor.

Todos los detectores de fotones se basan en la interacción de la radiación con una superficie reactiva para producir electrones (emisión de fotones) o para promover electrones a estados de energía en los que se puedan conducir la electricidad (fotoconducción). Únicamente la radiación ultravioleta, visible e infrarrojo cercano tienen energía suficiente para producir estos procesos.

Los detectores más ampliamente utilizados son del tipo de:

- Fototubos (150 – 1000 nm)
- Tubos fotomultiplicadores (150 – 1000 nm)
- Fotodiodos de silicio (350 – 1000 nm)
- Celdas fotovoltaicas (380 – 780 nm)

Procesadores de señal y dispositivos de lecturas.

El procesador de señal es, normalmente, un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica proveniente del detector; además puede alterar la señal de corriente directa a corriente alterna, cambiarla de fase y filtrarla, para eliminar los componentes no deseados. Entre los dispositivos de lectura se tienen: medidores digitales, escalas de los potenciómetros, registradores, tubos de rayos catódicos y monitores de microcomputadoras

Recipiente para muestras.

Los recipientes para muestras, conocidos como celdas, deben tener ventanas fabricadas con un material que permita el paso de la radiación de la región espectral de interés.

Para la región ultravioleta (por debajo de 350 nm) se necesitan celdas de cuarzo o sílice fundida. Estas celdas se pueden emplear en la región visible y a 3000 nm, aproximadamente, en el infrarrojo. Debido a su bajo costo, generalmente se utiliza el vidrio de silicatos para la región comprendida entre 375 y 2000 nm.

Los recipientes de plástico también pueden emplearse para la región visible. Las mejores celdas tienen ventanas que son normales a la dirección del rayo para minimizar las pérdidas por reflexión. La longitud más común de la celda que se utiliza en la región visible y ultravioleta es 1 cm.

Validación del método analítico.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico en una muestra a medir en un análisis y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con el propósito.

Clasificación de métodos analíticos.

a) En función de su estado regulatorio en :

- Métodos farmacopeicos. Son todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicano, farmacopea de los Estados Unidos, Farmacopea de Japón, etc.
- Métodos no farmacopeicos: Son aquellos métodos no compendiados en una farmacopea.

b) En función de su aplicación basados en una norma, ejemplo: NOM 059 Y NOM-073 SSA1, en:

- Métodos para producto a granel.
- Métodos para producto terminado.
- Método para materia prima.
- Métodos indicadores de estabilidad.

c) En función de la naturaleza de la respuesta analítica en :

- Métodos físicos. Cuando la respuesta es de carácter físico como la absorción de luz, emisión de luz, medición del voltaje, el pH, la conductividad, etc.
- Métodos químicos. Cuando la respuesta es de carácter químicos como: el consumo de iones hidrógeno o hidroxilo, formación de complejos, equilibrios óxido-reducción, etc.
- Métodos biológicos: Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

d) En función de su propósito analítico, los métodos de validación se clasifican en:

- Métodos para cuantificar el analito, contenido o potencia.
- Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
- Métodos para identificar el analito.

Cualquier método analítico puede estar constituido por diversas técnicas analíticas como: aplicación de equilibrios ácido-base, óxido-reducción, precipitación, de separación como los métodos cromatográficos, de extracción líquido-líquido, etc., y por técnicas de medición como los métodos espectrofotométricos, métodos potenciométricos, polarográficos etc.) los cuales permiten medir la respuesta del analito en la muestra, se denomina Sistema de Medición.

e) En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifica en:

- Métodos en los cuales el instrumento de medición da la respuesta analítica, y permite medir una señal de ruido: cromatógrafo de líquidos, cromatógrafos de gases, espectrofotómetros, etc.
- Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido: volumetrías, potenciómetros, conductimetrías. etc.

Parámetros de Desempeño. Los parámetros que se deben estudiar durante el desarrollo de una validación, se indican en la tabla 2

| Parámetro de desempeño | Contenido/ Potencia/ Valoración | Pruebas de impurezas | | Identificación |
|--|---------------------------------------|--------------------------|--------|----------------|
| | | Contenido/ Valoración | Límite | |
| Precisión/adecuabilidad del sistema | Si | Si | Si | ◆ |
| Linealidad del sistema | Si | Si | No | No |
| Especificidad ¹ | Si ³ | Si | Si | Si |
| Exactitud y Repetibilidad | Si | Si | No | No |
| Linealidad del método | Si | Si | No | No |
| Precisión del método o Precisión intermedia ² | Si | Si | No | No |
| Estabilidad analítica de la muestra ² | ◆ | ◆ | No | No |
| Límite de detección | No | No | Si | No |
| Límite de cuantificación | No | Si | No | No |
| Robustez | ◆ | ◆ | ◆ | No |
| Tolerancia | ◆ | ◆ | ◆ | No |

Tabla 2 Se indica los parámetros de desempeño a estudiar durante la validación de un método analítico

◆ Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

1) La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.

2) También es definido como un estudio de tolerancia.

3) Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

Determinaciones, metodología y criterios de aceptación:

En esta sección se describirán, la metodología y los criterios estadísticos de aceptación recomendados en el Guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C., tanto para sistema como para método, como son: el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación, el intervalo de confianza para la media poblacional de un porcentaje de recobro, el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza para la pendiente y para la ordenada al origen.

Precisión del sistema.

Metodología: se preparan por sextuplicado disoluciones a la concentración de la disolución de referencia o al 100 % de la concentración de la muestra procesada, preparadas por dilución o por pesadas independientes y se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones y se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El criterio de aceptación el de que el coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5 porcentual.

Linealidad del sistema.

Metodología: se preparan por triplicado cinco niveles de concentración de la disolución de referencia, ya sea por dilución o por pesadas independientes, siendo la concentración a la que se prepara la disolución de referencia del método o el 100 % de la concentración en la muestra procesada para su medición, y en donde el intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para, contenido/potencia/valoración, midiendo la respuesta analítica bajo las mismas condiciones y se reporta la relación concentración contra respuesta analítica.

Se calcula: el valor de la pendiente, la ordenada en el origen, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente.

El criterio de aceptación es el de que, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual al 0.98 y el intervalo de confianza para la media poblacional no debe incluir

el cero, también se recomienda trazar la gráfica de la concentración contra la respuesta analítica e incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

Especificidad.

Metodología: se deben establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas, a la muestra y evaluar su respuesta al método.

- a. Para métodos de identificación: seleccionar sustancias que potencialmente interfieran en la determinación.
- b. Para métodos de contenido / potencia / valoración: analizar placebos del producto como lo indica el método, muestras de producto y cuando proceda, sustancias relacionadas, precursores y homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.
- c. Para métodos de contenido / valoración de impurezas: cuando se dispone de las impurezas, adicionarlas al analito y / o a la muestra en niveles que incluya la especificación.

Cuando no se dispone de las impurezas la muestra que contiene al analito debe someterse a condiciones que generan su inestabilidad química.

- d. Para métodos de límites de impurezas: analizar muestras individuales de la impureza, el producto y la mezcla de estos.
- e. Para métodos indicadores de estabilidad:
 - Si se cuenta con los productos de degradación preparar muestras con placebo adicionado de éstos, el placebo adicionado del analito y de placebo adicionado de analito y productos de degradación y analizar con el método.

- Si no se cuenta con los productos de degradación, crear condiciones para favorecer la inestabilidad del analito en la muestra. Se recomienda, de acuerdo a la naturaleza química del analito.
- f. Para métodos no selectivos: la especificidad es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método, con los criterios de aceptación.

Criterios de aceptación: La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

Exactitud y Repetibilidad del método.

Metodología: la metodología a seguir estará en función de si se conoce o no, la constitución del placebo en la muestra.

- Si se conocen los componentes de la muestra, se debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente se encuentran presentes en la muestra y se preparar por sextuplicado placebos adicionados de una cantidad de analito correspondiente al 100 % de éste en la muestra.
- No se conocen los componentes de la muestra, se deben preparar por lo menos seis muestras adicionadas del analito, utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito hasta completar lo que representa el 100% de éste en la muestra.

Se calcula el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación, el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

El criterio de aceptación es que, el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro debe incluir el 100% o que el promedio aritmético de porcentaje de recobro se incluya en el intervalo del $100 \pm 3\%$ y el valor del coeficiente de variación no debe ser mayor al 3%

Linealidad del método:

Metodología: Se conocen los componentes de la muestra por lo que se preparó por triplicado, tres niveles placebos adicionados con una cantidad de analito correspondiente al 100% incluyendo los límites inferior (menor al 10%) y superior (mayor al 10%) del intervalo para el contenido/potencia/valoración, y para el contenido/valoración para pruebas de impurezas de límites superior al 20%, manteniendo constantemente la cantidad adicionada de placebo para los tres niveles.

El criterios de aceptación para la cantidad adicionada contra cantidad recuperada es de que el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual al 0.98%, el intervalo de confianza para la pendiente poblacional debe incluir la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional debe incluir el cero, el coeficiente de variación de regresión del porcentaje de recobro, no debe ser mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico y no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Por ciento de recobro.

El Intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100%, o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103 % si el método es químico o espectrofotométrico, el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor del 3% si es químico o espectrofotométrico.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado. Es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) contra la cantidad de recuperada (y), e incluir la ecuación, su línea y el coeficiente de determinación.

Precisión del método (Precisión Intermedia o Tolerancia interdía / analista).

Metodología: Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% (en caso de contenido / potencia / valoración) o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos

analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y equipos. Reportar el contenido / potencia / valoración del analito de todas las muestras. Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del contenido / potencia / valoración, empleando todos los resultados obtenidos.

El criterio de aceptación su coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3 % para métodos químicos o espectrofotométricos, los resultados pueden ser analizados utilizando otros métodos estadísticos apropiados, que permitan sustentar que la precisión del método es aceptable. Puede ser utilizado un modelo estadístico lineal de diseño experimental considerando como factores al analista y al día anidado en el analista o considerando al analista como un factor jerárquico respecto al día. Este modelo permite investigar el efecto del analista y del día, así como estimar la variabilidad entre analistas (reproducibilidad interdías) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad). Este análisis es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de tolerancia del método a estas fuentes de variación.

Estabilidad Analítica de la Muestra.

Metodología: El analista debe establecer la etapa de análisis en el cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar (muestras dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Muestras dependientes: Procesar por triplicado una muestra homogénea hasta la etapa preestablecida y fraccionar de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés. Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje utilizando una sustancia de referencia recientemente preparada. Reportar el contenido / potencia / valoración de cada fracción.

Muestras independientes: A partir de una muestra homogénea analizar por triplicado. Simultáneamente y de la misma muestra procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida al menor por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje utilizando una sustancia de referencia recientemente preparada. Reportar el contenido / potencia / valoración de cada preparación.

Calcular la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje, calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial $|d_i|$.

El criterio de aceptación, la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial $|d_i|$ debe ser menor o igual al 3% para métodos químicos o espectrofotométricos.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe de ser justificado. Los resultados pueden ser analizados utilizando otros métodos estadísticos apropiados. Uno de ellos es la obtención de intervalos de confianza que describen la diferencia de los resultados de una condición específica respecto de los resultados iniciales, basados en la distribución t de Dunnett.

Límite de Detección (LD) con base en señal de ruido.

Metodología: Este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebos analíticos, etc., según proceda) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados, según proceda) en un intervalos de concentraciones del analito que incluya especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Este procedimiento se utiliza para verificar el límite de detección estimado por otros procedimientos.

El criterio de aceptación, el límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

a) Límite de Detección con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos.

Metodología: Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos tres concentraciones de la sustancia

de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Simultáneamente, preparar por lo menos cinco blancos (reactivos, placebos analíticos, etc., según proceda). Medir las respuestas analíticas. Para la curva de calibración, sin incluir los blancos, calcular el valor de la pendiente, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente. Para los blancos, calcular, la desviación estándar de los blancos.

Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1}$$

El valor estimado para el límite de detección debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

El criterio de aceptación, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, el Intervalo de confianza para la pendiente poblacional no debe incluir el cero y el límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

b) Límite de Detección con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión.

Metodología: Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos tres concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente, el coeficiente de determinación, la desviación estándar de regresión y el intervalo de confianza para la pendiente, calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

El valor estimado para el límite de detección debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

El criterio de aceptación, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, el Intervalo de confianza para la pendiente poblacional no debe incluir el cero y el límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

c) Límite de detección con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Metodología: Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos tres concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente, el coeficiente de determinación, la desviación estándar de la ordenada al origen y el intervalo de confianza para la pendiente. Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{b0}}{b_1}$$

El valor estimado para el límite de detección debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

El criterio de aceptación, el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, el Intervalo de confianza para la pendiente poblacional no debe incluir el cero y el límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

Parte Experimental.

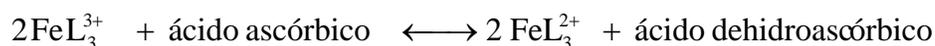
El desarrollo experimental de este trabajo se basa en la determinación espectrofotométrica del ácido ascórbico, en el cual se mide la absorbancia que produce el complejo ferroína (tris [1, - 10- fenantrolina] hierro (II)), que se obtiene al hacer reaccionar el ácido ascórbico con el complejo $[\text{Fe}(\text{orto-fenantrolina})_3]^{3+}$.

Se han encontrado artículos recientes (Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II) – neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals, 2004 *Elsevier Estambul University, Turkey) sobre la medición de la absorbancia a partir de las reacciones redox, este artículo señala el empleo de Cu (II) en vez de Fe (III) obteniendo buenos resultados, por tanto los métodos espectrofotométricos son particularmente atractivos debido a que son fáciles de manejar y rápidos para poder medir las absorbancias.

Para el desarrollo de esta validación se tomaron en cuenta las buenas prácticas de laboratorio, con el fin de obtener resultados creíbles, además de indicar que la reacción redox es lenta.

Debido a su lenta reacción se propuso el calentamiento a baño maría, permitiendo acelerar la reacción en un determinado tiempo, por lo que se determinó el tiempo máximo a emplear, indicando en que tiempo aproximado permanece constante la absorbancia, el cual se tomará en cuenta para realizar la validación.

Después de que se hayan realizado las mediciones de las absorbancias, se instruye a realizar la validación de método, los resultados obtenidos se analizarán por métodos estadísticos para posteriormente realizar un análisis de resultado final y las conclusiones pertinentes.



Reacción 9. Reacción entre el ion complejo, ortofenantrolina hierro III presentándose su forma oxidada y el ácido ascórbico

Material empleado para la validación del método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico por el método de la ferroína

- Matraces volumétricos de 10 mL
- Matraces volumétricos de 25 mL
- Matraz volumétrico de 1000 mL
- Micro pipeta de 1000 μ L
- Puntas para micro pipeta
- Bureta de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, mL
- Celda de plástico de 1 cm de paso óptico
- Espátula
- Naves de vidrio para pesar
- Piseta
- Vasos precipitados de 50, 100 y 250 mL
- Papel de pH
- Envases de 600 mL para decantar los residuos de los reactivos
- Refrigerador
- Marco de pesas
- Termómetro
- Baño maría
- Etiquetas para rotular material

Equipos:

- Balanza analítica digital marca Sartorius BP 210S con una capacidad de máxima de 210 g y una d de 0.001 g
- Espectrofotómetro UV/Visible marca Hitachi Perkin- Elmer 139, UNAM 153182

Reactivos:

- Disolución amortiguadora de acetatos a un pH de 4.7
- Disolución de 1,10-Fenantrolina con un 99.0 % de pureza, a una concentración de 1mg/mL en un pH de 4.
- Disolución de cloruro férrico a una concentración de 100 ppm.
- Agua destilada.
- Disolución estándar de ácido ascórbico con una pureza del 99.0 %, preparada diariamente.

Procedimiento experimental propuesta para la validación del método analítico.

A partir del diagrama de flujo se indicará el procedimiento experimental de la determinación y metodología de la validación.

Diagrama de flujo, para obtener el espectro de absorción del producto de la reacción entre el ácido ascórbico y el ion complejo, FeL_3^{3+} , a diferentes concentraciones.

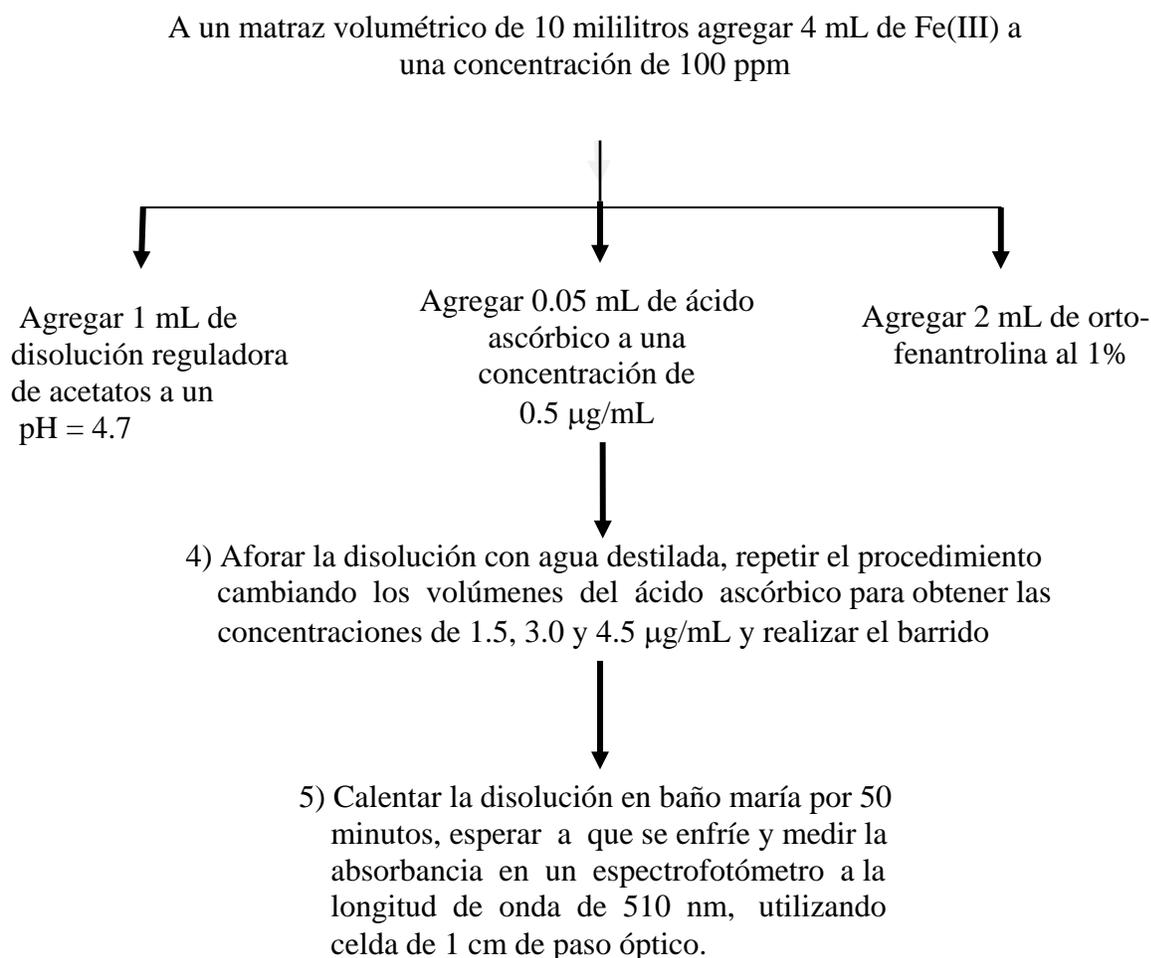


Diagrama de flujo para obtener la cinética de la reacción entre el ácido ascórbico 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el complejo FeL_3^{3+} .

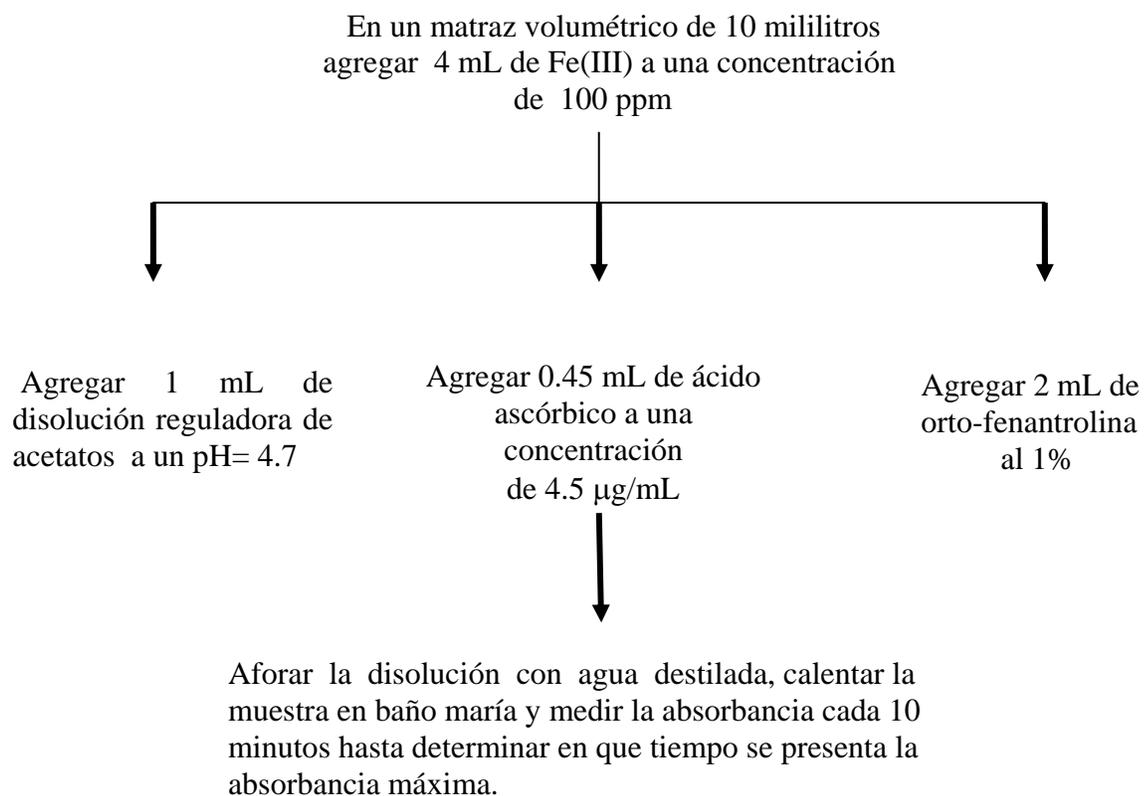


Diagrama de flujo para la realización de la especificidad del analito.

A un matraz aforado de 10 mililitros, agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de orto-fenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.6 mg de ácido ascórbico estándar (99%).

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL de esta muestra agregarlo al matraz volumétrico de 10 mL previamente preparado
- Aforar la disolución con agua destilada.



Calentar la disolución por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir la absorbancia de la disolución a partir de una longitud de onda de 400 hasta 700 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico.

Diagrama de flujo para la especificidad del placebo adicionado.

A un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) 100 ppm de concentración.



Agregar 1 mL de la disolución del reguladora de acetatos a un pH 4.7



Agregar 2 mL de orto fenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 26.6 mg del placebo con muestra analítica.

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL, agregarlo al matraz aforado de 10 mL previamente preparado
- Aforar la disolución con agua destilada



Calentar la disolución por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir la absorbencia de la disolución a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico



Realizar el mismo procedimiento pero ahora pesando la muestra estándar del ácido ascórbico, calentar la disolución por 50 minutos y esperar a que se enfríe, posteriormente medir la absorbencia máxima de la disolución a una longitud de onda de 510 nm y utilizando celda de 1 cm de paso óptico

Diagrama de flujo para la precisión del sistema.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) de 100 ppm en concentración



Agregar 1 mL de disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de ortofenantrolina de concentración al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL de esta muestra y agregarlo al matraz volumétrico de 10 mL, previamente preparado
- Aforar la disolución con agua destilada



Preparar por sextuplicado la disolución anterior.

Calentar la disolución por 50 minutos, esperar a que se enfríe y posteriormente medir la absorbancia máxima de la disolución a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico.

Diagrama de flujo para la determinación de la linealidad del sistema.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución Fe (III) en una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar exactamente 25.5 mg de ácido ascórbico estándar.

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL
- Preparar 5 niveles de concentración tomando de la disolución estándar preparada y transferirlo los matraces volumétricos de 10 mL, previamente preparados y rotulados.
- Las concentraciones a tomar de ácido ascórbico son 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1.5 µg/mL, 3.0 µg/mL y 4.5 µg/mL



Preparar por triplicado cada nivel de concentración propuesto. Calentar las disoluciones por 50 minutos, esperar a que se enfríe y posteriormente medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico

Diagrama de flujo para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra, tomar una alícuota de 0.025 mL de esta muestra y agregarlo al matraz aforados de 10 mL, previamente preparado.
- Aforar la disolución con agua destilada



Preparar por sextuplicado la disolución anterior. Calentar la disolución por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir la absorbancia de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico



Preparar muestra estándar siguiendo el mismo procedimiento para determinar el por ciento de recobro.

Diagrama de flujo para la linealidad del método

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.015, 0.025, 0.045 mL de estas muestras y agregarlo a matraces aforados de 10 mL previamente preparados y rotulados.
- Hacer por triplicado cada disolución
- Aforar la disolución con agua destilada



Calentar las disoluciones por 50 minutos y esperar a que se enfríe, posteriormente medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico



Preparar muestra estándar siguiendo el mismo procedimiento para determinar el por ciento de recobro.

Diagrama de flujo para la determinación del Límite de Detección.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de la disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar alícuotas de muestras que sean adecuadas para realizar el límite de detección, agregarlos posteriormente a los matraces volumétricos de 10 mL previamente preparados y rotulados.



Calentar las disoluciones por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico



Preparar por lo menos cinco blancos siguiendo el protocolo establecido solo que esta vez se pesa solamente el placebo

Diagrama de flujo para la determinación de la precisión del método, precisión interdía o tolerancia interdía/ analista.

A un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de la disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz aforado de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL, agregarlo al matraz volumétrico de 10 mL, previamente preparado y rotulado.
- Aforar la disolución con agua destilada



Preparar por triplicado la disolución anterior.
Calentar las disoluciones por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico



- Realizarlo por dos analistas diferentes y en dos días diferentes.
- Cada analista debe de realizar pesadas independientes por día tanto para la muestra como para el estándar.
- Hacer el mismo procedimiento pero ahora pesar solo el estándar.

Diagrama de flujo para la estabilidad analítica de la muestra.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe(III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de la disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Pesar con exactitud 25.5 mg del placebo con muestra analítica

- Transferir la cantidad pesada a un matraz aforado de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL de esta muestra, agregarlo al matraz volumétrico de 10 mL, previamente preparada y rotulada.
- Aforar la disolución con agua destilada



- Preparar por triplicado la disolución anterior para las diferentes condiciones propuestas.
- Preparar el estándar para determinar el % de recobro realizando el mismo procedimiento, solo que se pesa muestra estándar.
- Rotular las disoluciones preparadas para las diferentes condiciones de interés:
 - Luz blanca y temperatura ambiente
 - Oscuridad y temperatura ambiente
 - Temperatura a 4 °C
- Calentar las disoluciones por 50 minutos para el primer día y esperar a que se enfríe, posteriormente medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm.
- Para los siguientes días solo se miden las absorbancias obtenidas de las disoluciones en las diferentes condiciones de interés.

Diagrama de flujo para el análisis de muestra comercial.

En un matraz aforado de 10 mililitros agregar 4 mL de disolución de Fe (III) a una concentración de 100 ppm



Agregar 1 mL de la disolución reguladora de acetatos a un pH = 4.7



Agregar 2 mL de disolución de ortofenantrolina al 1%



Obtener el peso promedio de 20 tabletas de producto comercial del mismo lote.

Pesar con exactitud el peso de la muestra comercial a analizar.

- Transferir la cantidad pesada a un matraz aforado de 25 mL.
- Disolver homogéneamente la muestra y tomar una alícuota de 0.025 mL de esta muestra y agregarlo al matraz aforado de 10 mL. Previamente preparado y rotulado
- Aforar la solución con agua destilada



Preparar el estándar para determinar el % de recobro realizando el mismo procedimiento, solo que se pesa muestra estándar.



Calentar las disoluciones por 50 minutos y esperar a que se enfríe, medir las absorbancias de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de 1 cm de paso óptico

Diagrama de flujo para manejo de residuos.

El compuesto formado entre el Fe (II) y la 1,10 fenantrolina (ferroína), es de color rojo intenso, se coloca en un recipiente adecuado preferentemente envases de vidrio limpio



Rotular los envases, poniendo nombre del residuo, nombre del analista y fecha



Se evapora un 40 % del disolvente y se trata con disolución de yoduro de potasio 2.5 M, se extrae con cloroformo y de la fase acuosa se cristaliza la ferroína.

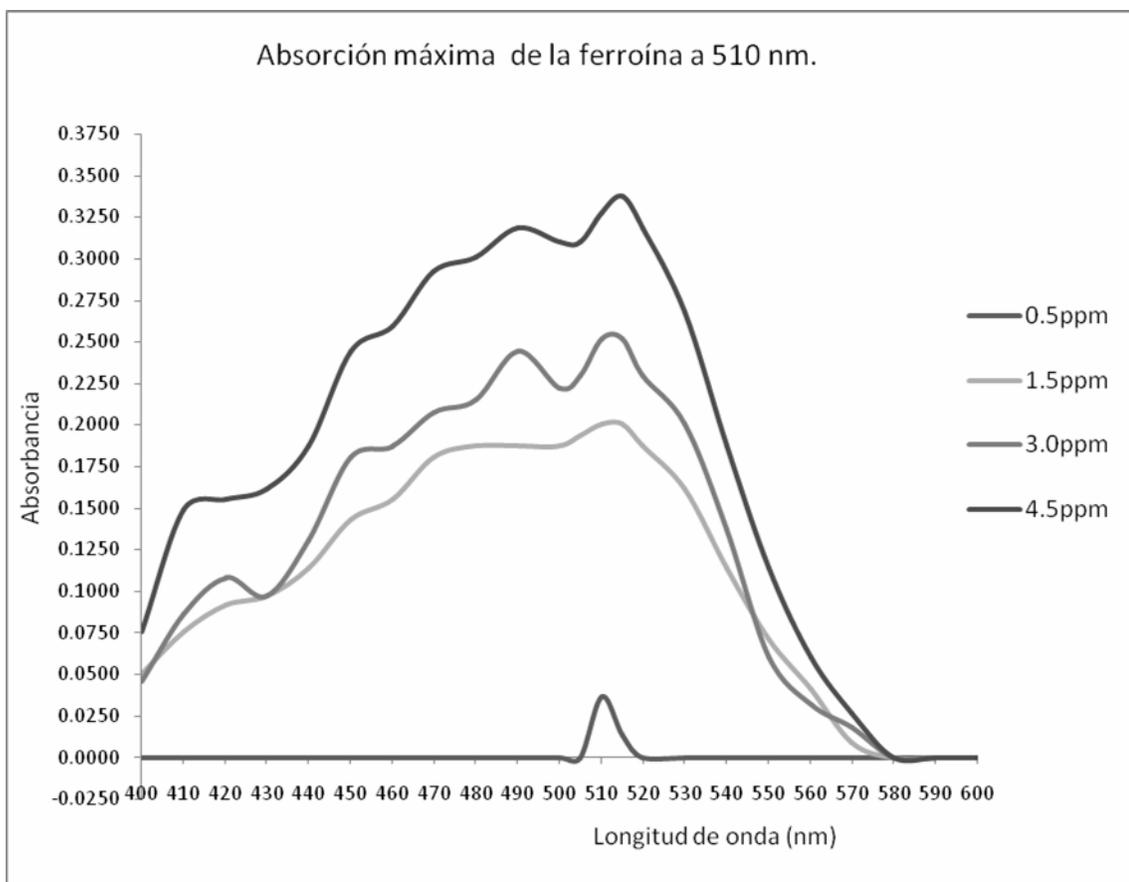


La ferroína se recristaliza y se guarda en un frasco apropiadamente rotulado como Indicador para equilibrios oxido-reducción
Se coloca el nombre del alumno y la fecha de almacén

Tabla de resultados.

| λ (nm) | % T ₁ [0.5] | % T ₂ [1.5] | % T ₃ [3.0] | % T ₄ [4.5] | ABS. ₁ | ABS. ₂ | ABS. ₃ | ABS. 4 |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| 400 | 100 | 89 | 90 | 84 | 0.0000 | 0.0506 | 0.0458 | 0.0757 |
| 410 | 100 | 84 | 82 | 71 | 0.0000 | 0.0757 | 0.0862 | 0.1487 |
| 420 | 100 | 81 | 78 | 70 | 0.0000 | 0.0915 | 0.1079 | 0.1549 |
| 430 | 100 | 80 | 80 | 69 | 0.0000 | 0.0969 | 0.0969 | 0.1612 |
| 440 | 100 | 77 | 74 | 65 | 0.0000 | 0.1135 | 0.1308 | 0.1871 |
| 450 | 100 | 72 | 66 | 57 | 0.0000 | 0.1427 | 0.1805 | 0.2441 |
| 460 | 100 | 70 | 65 | 55 | 0.0000 | 0.1549 | 0.1871 | 0.2596 |
| 470 | 100 | 66 | 62 | 51 | 0.0000 | 0.1805 | 0.2076 | 0.2924 |
| 480 | 100 | 65 | 61 | 50 | 0.0000 | 0.1871 | 0.2147 | 0.3010 |
| 490 | 100 | 65 | 57 | 48 | 0.0000 | 0.1871 | 0.2441 | 0.3188 |
| 500 | 100 | 65 | 60 | 49 | 0.0000 | 0.1871 | 0.2218 | 0.3098 |
| 505 | 100 | 64 | 59 | 49 | 0.0000 | 0.1938 | 0.2291 | 0.3098 |
| 510 | 92 | 63 | 56 | 47 | 0.0362 | 0.2007 | 0.2518 | 0.3279 |
| 515 | 97 | 63 | 56 | 46 | 0.0132 | 0.2007 | 0.2518 | 0.3372 |
| 520 | 100 | 65 | 59 | 48 | 0.0000 | 0.1871 | 0.2291 | 0.3188 |
| 530 | 100 | 69 | 63 | 54 | 0.0000 | 0.1612 | 0.2007 | 0.2676 |
| 540 | 100 | 77 | 73 | 65 | 0.0000 | 0.1135 | 0.1367 | 0.1871 |
| 550 | 100 | 85 | 87 | 77 | 0.0000 | 0.0706 | 0.0605 | 0.1135 |
| 560 | 100 | 91 | 93 | 87 | 0.0000 | 0.0410 | 0.0315 | 0.0605 |
| 570 | 100 | 98 | 96 | 94 | 0.0000 | 0.0088 | 0.0177 | 0.0269 |
| 580 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 590 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 600 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 610 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 620 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 630 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 640 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 650 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 660 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 670 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 680 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 690 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 700 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |

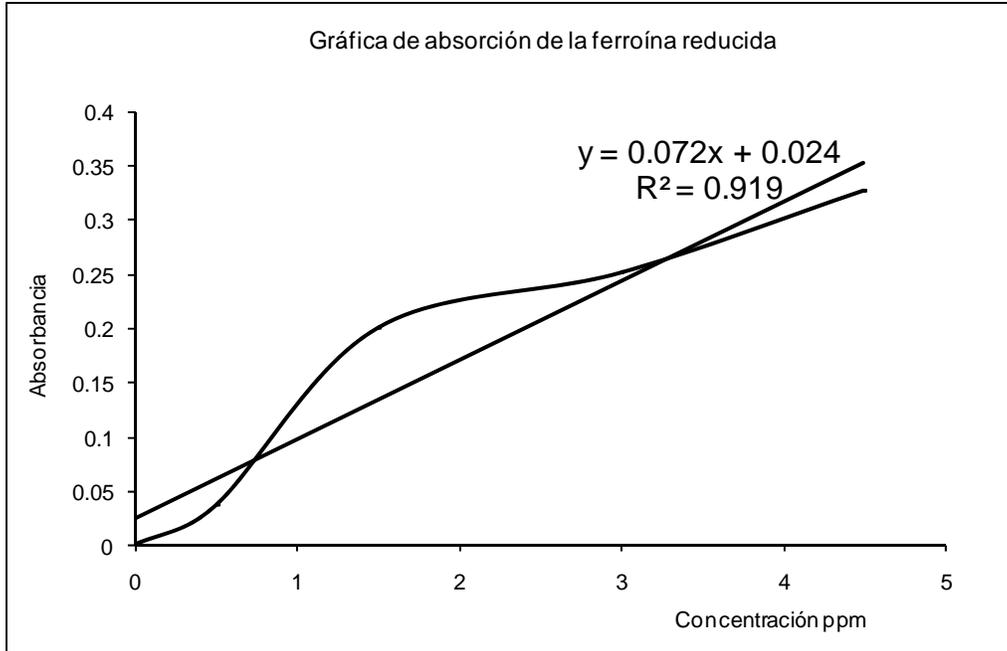
Tabla No. 1 Lecturas de %T y absorbancias para las diferentes disoluciones obtenidas al hacer reaccionar ácido ascórbico en concentraciones de 0.5, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm con la ferrina en su forma oxidada, leídas en un ámbito de longitudes de onda de (400 a 700 nm).



Gráfica No. 1 Curvas de absorción de los productos de reacción entre el ácido ascórbico en concentraciones de 0.5, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm con el complejo $\text{Fe}(\text{ortofenantrolina})_3^{3+}$ la absorbancia máxima que presenta el producto de la reacción siendo esta el complejo ferroína en su forma reducida, a longitud de onda de 510 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

| Absorbancias | Concentración en ppm |
|--------------|----------------------|
| 0 | 0 |
| 0.036 | 0.5 |
| 0.181 | 1.5 |
| 0.252 | 3.0 |
| 0.328 | 4.5 |

Tabla No. 2 Datos de las absorbancias de la ferroína en su forma reducida en función de la concentración del ácido ascórbico.



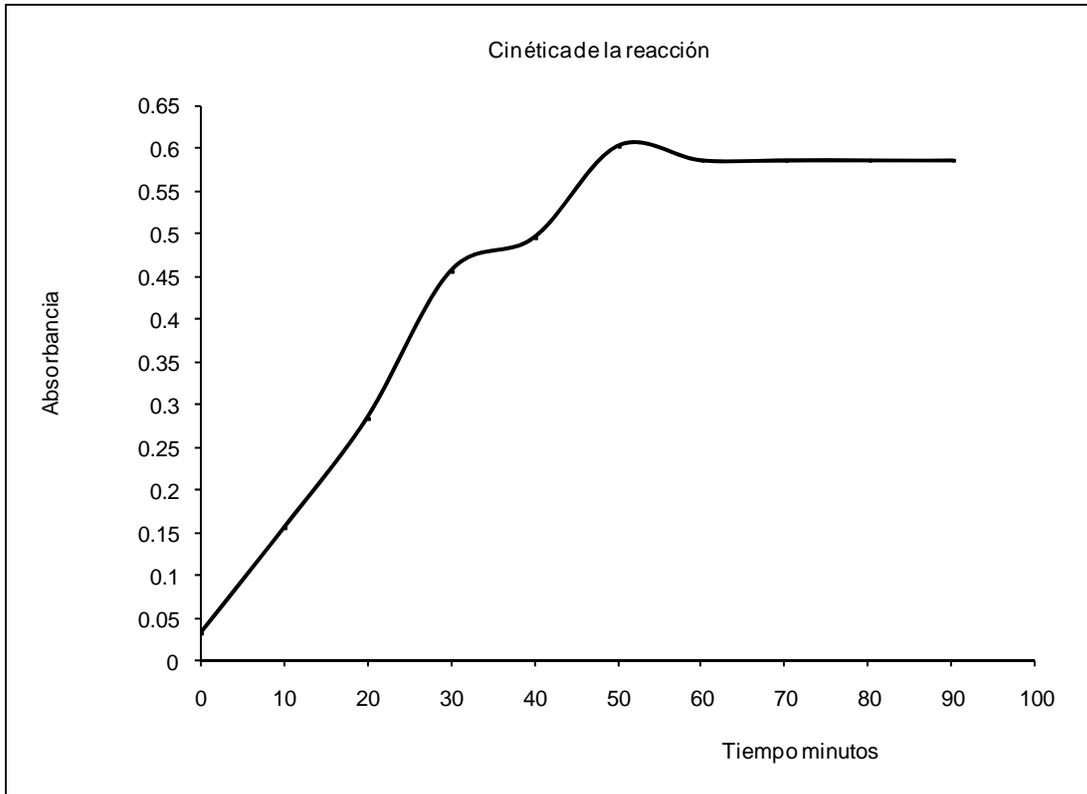
Gráfica No. 2 Linealidad que presenta la relación de la absorbancia en función de la concentración de la ferroína en su forma reducida con pH de 4.7 y leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 510 nm, empleando celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Cinética de la reacción.

Datos obtenidos:

| Tiempo en minutos | Por ciento de transmitancia | Absorbancia |
|-------------------|-----------------------------|-------------|
| 0 | 93 | 0.0315 |
| 10 | 70 | 0.1549 |
| 20 | 52 | 0.2840 |
| 30 | 35 | 0.4559 |
| 40 | 32 | 0.4949 |
| 50 | 25 | 0.6021 |
| 60 | 26 | 0.5850 |
| 70 | 26 | 0.5850 |
| 80 | 26 | 0.5850 |
| 90 | 26 | 0.5850 |

Tabla No. 3 Absorbancia de la ferroína en su forma reducida en intervalos de 10 minutos.

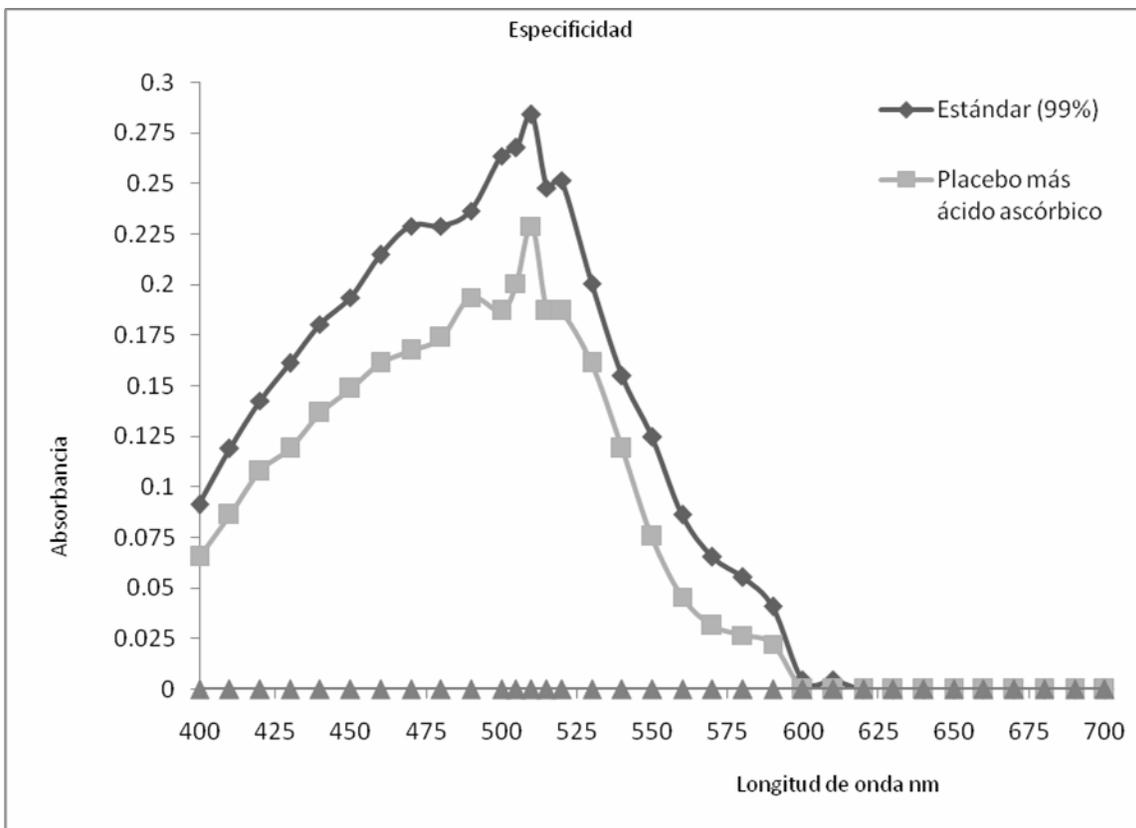


Gráfica No. 3 La reacción óxido – reducción entre el complejo ferrina en su forma oxidada y el ácido ascórbico presenta una de reacción lenta, donde en un tiempo aproximado a los 50 minutos se obtiene la absorbancia máxima del producto de la reacción siendo la ferroína en su forma reducida a una longitud de onda de 510nm, se tomara en cuenta para realizar la validación del método analítico.

Especificidad.

| longitud de onda (nm) | absorbancia estándar | absorbancia del placebo mas muestra analítica | absorbancia del placebo |
|-----------------------|----------------------|---|-------------------------|
| 400 | 0.0915 | 0.0655 | 0 |
| 410 | 0.1192 | 0.0862 | 0 |
| 420 | 0.1427 | 0.1079 | 0 |
| 430 | 0.1612 | 0.1192 | 0 |
| 440 | 0.1805 | 0.1367 | 0 |
| 450 | 0.1938 | 0.1487 | 0 |
| 460 | 0.2147 | 0.1612 | 0 |
| 470 | 0.2291 | 0.1675 | 0 |
| 480 | 0.2291 | 0.1739 | 0 |
| 490 | 0.2366 | 0.1938 | 0 |
| 500 | 0.2636 | 0.1871 | 0 |
| 505 | 0.2676 | 0.2007 | 0 |
| 510 | 0.2840 | 0.2291 | 0 |
| 515 | 0.2480 | 0.1871 | 0 |
| 520 | 0.2518 | 0.1871 | 0 |
| 530 | 0.2007 | 0.1612 | 0 |
| 540 | 0.1549 | 0.1192 | 0 |
| 550 | 0.1249 | 0.0757 | 0 |
| 560 | 0.0862 | 0.0458 | 0 |
| 570 | 0.0655 | 0.0315 | 0 |
| 580 | 0.0555 | 0.0269 | 0 |
| 590 | 0.0410 | 0.0223 | 0 |
| 600 | 0.0044 | 0.0000 | 0 |
| 610 | 0.0044 | 0.0000 | 0 |
| 620 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 630 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 640 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 650 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 660 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 670 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 680 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 690 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |
| 700 | 0.0000 | 0.0000 | 0 |

Tabla No. 4 Datos de las absorbancias obtenidas del producto de la reacción que estuvo constituido por la muestra estándar, el placebo con la muestra analítica y el placebo.



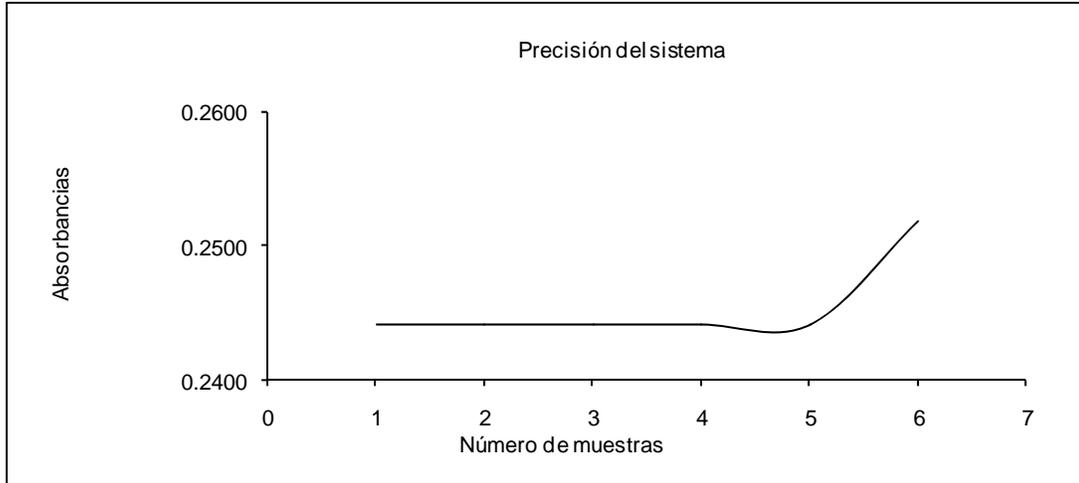
Gráfica No. 4 A una longitud de onda de 510 nm se obtiene la absorbancia máxima de la ferroína en su forma reducida, que estuvo constituido por la muestra estándar, el placebo con el analito y el placebo en donde dicha muestra no reacciona con el complejo ferroína en su forma oxidada teniendo como resultado absorbancias con valores de cero.

Precisión del sistema.

Concentración de analito que representa el 100% es equivalente a 2.5 µg/mL

| Número de disoluciones | absorbancia a una λ de 510 nm |
|------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.2441 |
| 2 | 0.2441 |
| 3 | 0.2441 |
| 4 | 0.2441 |
| 5 | 0.2441 |
| 6 | 0.2518 |

Tabla No. 5 Absorbancias constantes obtenidos de la ferroína en su forma reducida, teniendo un coeficiente de variación del 1.28 % y una desviación estándar del $3.143 \cdot 10^{-03}$, se observa que en la última disolución su absorbancia no coincide con las primero cinco diluciones



Gráfica No. 5 En el desarrollo de la precisión del sistema se muestra que la mayor parte de los resultados se obtuvo una buena precisión a excepción del último pero no es significativo debido a que su CV es menor al 2%, indicando que la desviación estándar es mínima.

Linealidad del sistema

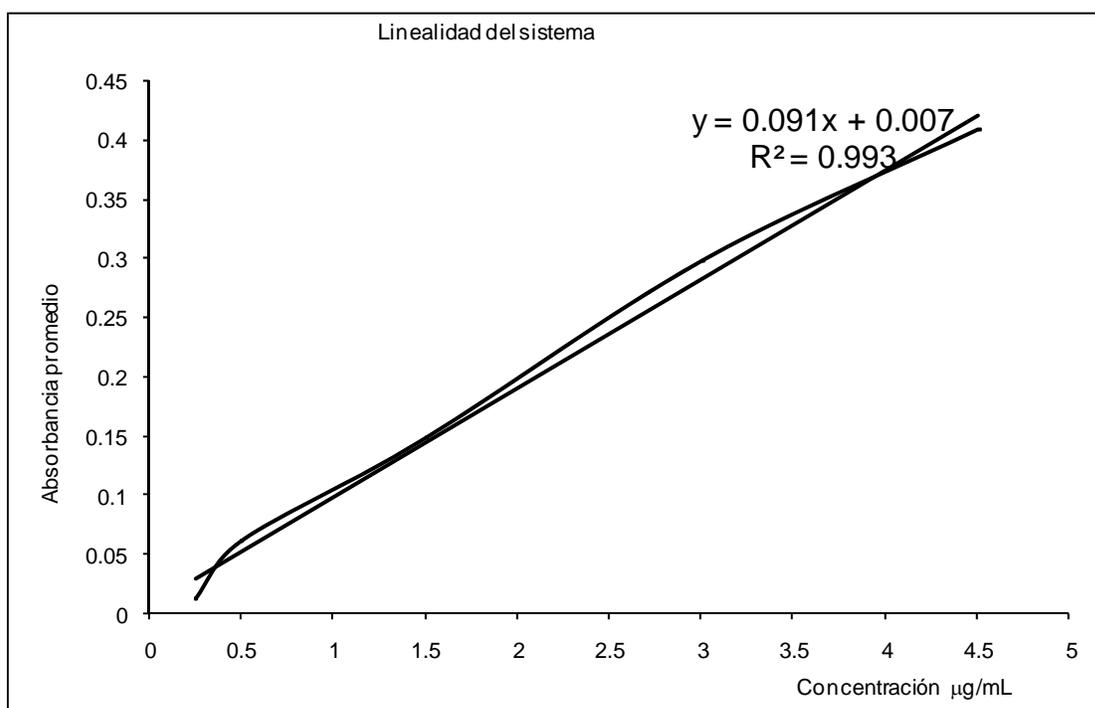
| Muestras analíticas | Peso de las muestras estándar (mg) | Alícuotas tomadas para las concentraciones propuestas (mL) | X concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Y absorbancia máxima a 510 nm |
|---------------------|------------------------------------|--|---|-------------------------------|
| 1 | 25.5 | 0.025 | 0.25 | 0.0132 |
| 2 | 25.5 | 0.025 | 0.25 | 0.0132 |
| 3 | 25.5 | 0.025 | 0.25 | 0.0132 |
| 4 | 25.5 | 0.005 | 0.5 | 0.0605 |
| 5 | 25.5 | 0.005 | 0.5 | 0.0605 |
| 6 | 25.5 | 0.005 | 0.5 | 0.0605 |
| 7 | 25.5 | 0.015 | 1.5 | 0.1487 |
| 8 | 25.5 | 0.015 | 1.5 | 0.1487 |
| 9 | 25.5 | 0.015 | 1.5 | 0.1487 |
| 10 | 25.5 | 0.030 | 3.0 | 0.3010 |
| 11 | 25.5 | 0.030 | 3.0 | 0.3010 |
| 12 | 25.5 | 0.030 | 3.0 | 0.3010 |
| 13 | 25.5 | 0.045 | 4.5 | 0.4089 |
| 14 | 25.5 | 0.045 | 4.5 | 0.4089 |
| 15 | 25.5 | 0.045 | 4.5 | 0.4089 |

Tabla No. 6 Resultados de las absorbancias obtenidas a las diferentes concentraciones propuestas para la linealidad del sistema, cada concentración se hizo por triplicado.

Linealidad del sistema, absorbancia contra concentración promedio

| X (µg/mL) | Y PROMEDIO | VALORES DE LA GRÁFICA |
|-----------|------------|--|
| 0.25 | 0.0132 | Ordenada = 0.007 |
| 0.5 | 0.0621 | Pendiente = 0.0919 |
| 1.5 | 0.1487 | $R^2 = 0.9931$ |
| 3.0 | 0.2981 | $(S_{y/x}) = 0.01885, S_{b_1} = 0.02697$ |
| 4.5 | 0.4089 | $(IC(\beta_1)) = 0.1501552, 0.0336448$ |
| | | $t_{0.975,13} = 2.160$ |

Tabla No. 7 Promedio de las absorbancias obtenidas para las diferentes concentraciones propuestas para la linealidad del sistema a partir de los datos de la tabla No. 8, se calcula la desviación estándar de la regresión, la desviación estándar de la pendiente, el intervalo de confianza para la pendiente poblacional y el valor de la t- Student.



Gráfica No. 6 La linealidad obtenida fue a partir de la relación entre la concentración contra las absorbancias promedios, siendo esta linealidad aceptable ya que el coeficiente de determinación R^2 es de 0.9931.

Exactitud y repetibilidad del método.

Placebo con muestra analítica

| Muestras del placebo analítico adicionado | Absorbancia a 510 nm de la cantidad adicionada | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada (mg) al matraz aforado de 10 mL | % de recobro Y |
|---|--|---|---|----------------|
| 1 | 0.1427 | 0.0255 | 0.02586 | 100.40 |
| 2 | 0.1457 | 0.0255 | 0.02641 | 98.65 |
| 3 | 0.1427 | 0.0255 | 0.02586 | 100.40 |
| 4 | 0.1427 | 0.0255 | 0.02586 | 100.40 |
| 5 | 0.1397 | 0.0255 | 0.02532 | 98.30 |
| 6 | 0.1427 | 0.0255 | 0.02586 | 100.40 |

| n (Y) | S (Y) | Promedio Y | % CV(Y) |
|-------|-------|------------|---------|
| 6 | 1.00 | 99.76 | 1.00 |

Tabla No. 8 Absorbancia de la cantidad adicionada de la muestra problema, dicha cantidad se recupera, obteniendo un por ciento de recobro aceptable. El valor de t-Student (a 0.975,n-1) fue de 2.571, mientras su intervalo de confianza para la media poblacional está entre 100.81 a 98.71.

Y: Es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto a la cantidad adicionada.

Resultados para muestra estándar

| Peso estándar mg | Peso estándar mg | Peso estándar mg | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Absorbancia 3 | Pureza de la muestra estándar % |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| 25.5 | 25.5 | 25.5 | 0.1427 | 0.1427 | 0.1367 | 99 |
| \bar{X} Promedio: 25.5 | | | \bar{X} Promedio: 0.1407 | | | |
| | | | Desviación estándar:0.003464 | | | |
| | | | % CV = 2.46 | | | |

Tabla No. 9 Peso promedio y absorbancia promedio de la muestra estándar con una pureza del 99 %

Ejemplo de cálculo realizado.

$$\text{mg Recuperado} = \frac{\text{Abs. de la muestra } 1(0.1427) * \text{Peso del estándar } (0.0255 \text{ mg})}{\text{Abs. promedio del estándar } (0.1407)} = 0.02586$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperado } (0.02586 \text{ mg}) * \text{Por ciento de pureza } (99\%)}{\text{Cantidad pesada de la muestra } (0.0255 \text{ mg})} = 100.40$$

Linealidad del método.

| Placebo con muestra analítica adicionado | Nivel de concentración en $\mu\text{g/mL}$ | Absorbancia máxima 510 nm. |
|--|--|----------------------------|
| 1 | 1.53 | 0.1426 |
| 2 | 1.54 | 0.1366 |
| 3 | 1.53 | 0.1307 |
| 4 | 2.56 | 0.2596 |
| 5 | 2.56 | 0.2518 |
| 6 | 2.56 | 0.2412 |
| 7 | 4.608 | 0.4317 |
| 8 | 4.626 | 0.4317 |
| 9 | 4.626 | 0.4089 |

Tabla No. 10 Triplicado para cada nivel de concentración, las absorbancias obtenidas son de la cantidad adicionada de la muestra.

Linealidad del método, cantidad adicionada - cantidad recuperada,

| Placebo analítico adicionado | X Cantidad real adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Y Cantidad recuperada (mg) al matraz aforado de 10 mL | % Recobro | Valores de la gráfica |
|------------------------------|--|---|-----------|--|
| 1 | 0.01536 | 0.01320 | 85.08 | Ordenada = 0.0032 |
| 2 | 0.01536 | 0.01263 | 81.40 | Pendiente = 1.0337 |
| 3 | 0.01536 | 0.01209 | 78.00 | $R^2 = 0.9951$ |
| 4 | 0.0255 | 0.02401 | 93.22 | $(S_{y/x}) = 0.01885, S_{b_1} = 0.02697$ |
| 5 | 0.0255 | 0.02330 | 90.46 | $(IC(\beta_1)) = 0.1501552, 0.0336448$ |
| 6 | 0.0255 | 0.02231 | 90.50 | $t_{0.975,7} = 2.365$ |
| 7 | 0.04096 | 0.03993 | 96.51 | % CV = 7.18 |
| 8 | 0.04112 | 0.03993 | 96.13 | |
| 9 | 0.04112 | 0.03782 | 91.05 | |

Tabla No. 11 Valores de la cantidad adicionada, cantidad recuperada y por ciento de recobro siendo éstas menores al 95 por ciento, el coeficiente de determinación de la linealidad es aceptable, ya que el valor obtenido es mayor al 0.98, se obtienen la desviación estándar de la regresión, intervalo de confianza para la pendiente poblacional, el valor de la t de Student(n-1) y el coeficiente de variación siendo esta mayor a lo especificado en la guía de validación.

Datos Estándar

| Peso estándar 1 mg | Peso estándar 2 mg | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Pureza de la muestra estándar % |
|--------------------------|--------------------|------------------------------|---------------|---------------------------------|
| 25.5 | 25.5 | 0.2839 | 0.2757 | 99 |
| \bar{X} Promedio: 25.5 | | \bar{X} Promedio: 0.2757 | | |
| | | Desviación estándar: 0.00579 | | |
| | | % CV = 2.07 | | |
| | | | | |

Tabla No. 12 Absorbancia y peso promedio de la muestra estándar, la pureza de la muestra estándar es del 99.0%.

Ejemplo del cálculo realizado.

$$\text{mg Recuperados} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra } 1(0.1426) * \text{Peso del estándar } (0.0255 \text{ mg})}{\text{Absorbancia promedio del estándar } (0.2757)} = 0.01320$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperados } (0.01320 \text{ mg}) * \text{Por ciento de pureza } (99\%)}{\text{Cantidad pesada de la muestra } (0.01536 \text{ mg})} = 85.08$$

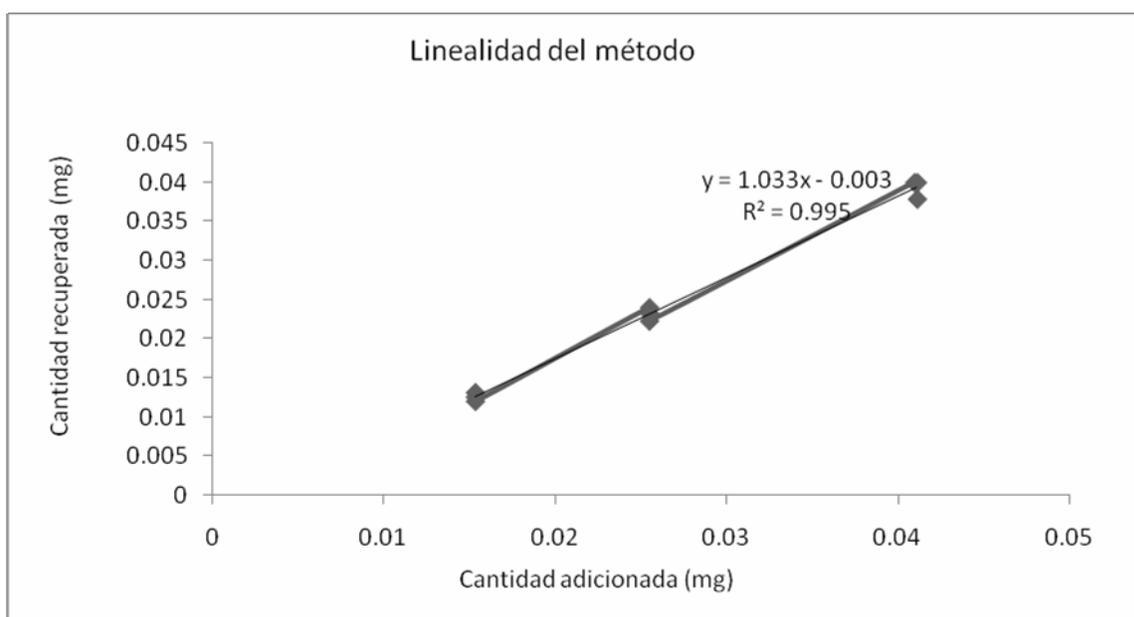
Determinar el valor de t Student, n= número de recobros

$$t_{0.975, n-1}$$

$$t_{0.975, 8} = 2.365$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC_{(\mu)} = 100.57, 98.94$$



Gráfica No. 7 Relación entre la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada es directamente proporcional, misma que se detalla en esta gráfica, donde el coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9951, el cual es adecuado para la determinación de la linealidad del método.

Precisión del método, precisión intermedia o tolerancia interdía / analista.

Primer día, analista 1

| Placebo analítico adicionado | Absorbancia a λ 510 nm | Cantidad adicionada mg al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada mg al matraz aforado de 10 mL | % Recobro |
|------------------------------|--------------------------------|---|---|-----------|
| 1 | 0.1308 | 0.0256 | 0.01783 | 69.00 |
| 2 | 0.1337 | 0.0256 | 0.01823 | 70.50 |
| 3 | 0.1308 | 0.0256 | 0.01783 | 68.95 |

Tabla No. 13 Absorbancias del analista uno en el primer día, cantidad adicionada, cantidad recuperada y el por ciento de recobro el cual se obtiene resultados menores al 90 %.

Primer día, analista 2

| Placebo analítico adicionado | Absorbancia a λ 510 nm | Cantidad adicionada mg al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada mg al matraz aforado de 10 mL | % Recobro |
|------------------------------|--------------------------------|---|---|-----------|
| 1 | 0.1367 | 0.0255 | 0.01864 | 72.37 |
| 2 | 0.1367 | 0.0225 | 0.01864 | 72.37 |
| 3 | 0.1308 | 0.0255 | 0.01783 | 69.23 |

Tabla No. 14 Absorbancias del analista dos en el primer día, cantidad adicionada, cantidad recuperada y el por ciento de recobro que al igual que el analista uno es menor al 90%.

Ejemplo del cálculo realizado para la precisión del método.

$$\text{mg Recuperados} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra } 1(0.1308) * \text{Peso del estándar } (0.0255\text{mg})}{\text{Absorbancia promedio del estándar } (0.18705)} = 0.01783$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperados}(0.01783 \text{ mg}) * \text{Por ciento de pureza } (99\%)}{\text{Cantidad pesada de la muestra } (0.0256 \text{ mg})} = 69.00$$

Estándar para analista 1 y 2, primer día.

| Peso estándar (1) mg | Peso estándar (2) mg | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Pureza de la muestra estándar % |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| 25.5 | 25.5 | 0.1837 | 0.1904 | 99 |
| \bar{X} Promedio: 25.5 | | \bar{X} Promedio: 0.18705 | | |
| | | Desviación estándar: 0.00473 | | |
| | | % CV = 2.53 | | |

Tabla No. 15 Datos de la muestra estándar para la obtención de la cantidad recuperada y el por ciento de recobro de las muestras analizadas por el analista uno y dos, para el primer día.

Segundo día, analista 1

| Placebo analítico adicionado | Absorbancia máxima a λ 510 nm | Cantidad adicionada mg al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada mg al matraz aforado de 10 mL | % Recobro |
|---------------------------------|---|--|--|--------------|
| 1 | 0.1191 | 0.0255 | 0.01638 | 63.60 |
| 2 | 0.1249 | 0.0255 | 0.01717 | 66.66 |
| 3 | 0.1249 | 0.0256 | 0.01717 | 66.40 |

Tabla No. 16 Absorbancias del analista uno en el segundo día, cantidad adicionada y cantidad recuperada y el por ciento de recobro teniendo valores menores al 90%.

Segundo día, analista 2

| Placebo analítico adicionado | Absorbancia máxima a λ 510 nm | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada (mg) al matraz aforado de 10 mL | % Recobro |
|---------------------------------|---|---|---|--------------|
| 1 | 0.1163 | 0.0255 | 0.01600 | 62.12 |
| 2 | 0.1163 | 0.0255 | 0.01600 | 62.12 |
| 3 | 0.1191 | 0.0255 | 0.01638 | 63.60 |

Tabla No. 17. Datos de las absorbancias obtenidas del analista dos para el segundo día, cantidad adicionada, cantidad recuperada y el por ciento de recobro teniendo valores menores al 90%.

Estándar para los analistas 1 y 2. Segundo día.

| Peso estándar (1) mg | Peso estándar (2) mg | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Pureza de la muestra estándar % |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------|---------------------------------|
| 25.5 | 25.5 | 0.1871 | 0.1838 | 99 |
| \bar{X} Promedio: 25.5 | | \bar{X} Promedio: 0.18545 | | |
| | | Desviación estándar: 0.00233 | | |
| | | % CV = 1.25 | | |

Tabla No. 18 Datos de la muestra estándar para la obtención de la cantidad recuperada y el por ciento de recobro de las muestras analizadas por el analista uno y dos, para el segundo día.

Ejemplo del cálculo realizado para la precisión del método.

$$\text{mg Recuperado} = \frac{\text{Abs. de la muestra } 1(0.1191) * \text{peso del estándar } (25.5\text{mg})}{\text{Abs. promedio del estándar } (0.18545)} = 16.38$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperado } (16.38 \text{ mg}) * \text{Por ciento de pureza } (99\%)}{\text{Cantidad pesada de la muestra } (25.5 \text{ mg})} = 63.60$$

Precisión intermedia interdía / analista

| | ANALISTA 1 | ANALISTA 2 | n= 12 |
|-------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Cantidad recuperada (mg) | Cantidad recuperada (mg) | |
| Día 1 | 0.01783 | 0.01864 | S= 0.000972 |
| | 0.01823 | 0.01864 | |
| | 0.01783 | 0.01783 | |
| Día 2 | 0.01638 | 0.01600 | \bar{X} = 0.01734 |
| | 0.01717 | 0.01600 | |
| | 0.01717 | 0.01638 | |

% CV= 5.6

Tabla No. 19 Datos finales del analista uno y dos con respecto a la cantidad recuperada, en los dos días que se emplearon para el análisis de la muestra, se obtuvo un coeficiente de variación mayor al 3.0 %.

Estabilidad analítica de la muestra

| Almacenamiento luz y temperatura ambiente | | | |
|---|---------------------------------|--|-----------------------------|
| Tiempo cero | | | |
| Muestras | Absorbancia λ 510 nm | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada (mg) |
| 1 | 0.2146 | 0.0256 | 0.02055 |
| 2 | 0.2218 | 0.0256 | 0.02124 |
| 3 | 0.2076 | 0.0255 | 0.01987 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2365 | 0.0256 | 0.02322 |
| 2 | 0.2441 | 0.0256 | 0.02397 |
| 3 | 0.1938 | 0.0255 | 0.01903 |
| Tiempo 48 horas | | | |
| 1 | 0.1938 | 0.0256 | 0.01883 |
| 2 | 0.2041 | 0.0256 | 0.01983 |
| 3 | 0.1804 | 0.0255 | 0.01753 |
| Almacenamiento en la oscuridad y temperatura ambiente | | | |
| Tiempo cero | | | |
| 1 | 0.2076 | 0.0256 | 0.02028 |
| 2 | 0.2146 | 0.0256 | 0.02097 |
| 3 | 0.2076 | 0.0255 | 0.02028 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2076 | 0.0256 | 0.02124 |
| 2 | 0.2218 | 0.0256 | 0.02270 |
| 3 | 0.2146 | 0.0255 | 0.02196 |
| Tiempo 48 horas | | | |
| 1 | 0.1739 | 0.0256 | 0.02021 |
| 2 | 0.1870 | 0.0256 | 0.02173 |
| 3 | 0.2006 | 0.0255 | 0.02331 |
| Almacenamiento a 4 °C | | | |
| Tiempo cero | | | |
| 1 | 0.2218 | 0.0256 | 0.02200 |
| 2 | 0.2076 | 0.0256 | 0.02060 |
| 3 | 0.2146 | 0.0255 | 0.02130 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2218 | 0.0256 | 0.02468 |
| 2 | 0.2218 | 0.0256 | 0.02468 |
| 3 | 0.2365 | 0.0255 | 0.02631 |

Tabla No. 20 Absorbancias de la muestra analítica, cantidad adicionada y cantidad recuperada, en las diferentes condiciones de almacenamiento propuestos para en análisis de la estabilidad analítica de la muestra.

| almacenamiento a 4 °C | | | |
|-----------------------|---------------------------------|--|-----------------------------|
| Tiempo 48 horas | | | |
| Muestras | Absorbancia λ 510 nm | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Cantidad recuperada (mg) |
| 1 | 0.2006 | 0.0256 | 0.02460 |
| 2 | 0.1804 | 0.0256 | 0.02213 |
| 3 | 0.1870 | 0.0255 | 0.02294 |

Tabla No. 21. Absorbancias de la muestra analítica, cantidad adicionada y cantidad recuperada obtenidas a 4°C para en análisis de la estabilidad analítica.

Estabilidad analítica del estándar.

| almacenamiento luz y temperatura ambiente | | | |
|---|------------------------------------|--|---------------------------|
| Tiempo cero | | | |
| Muestras | Absorbancia λ 510 nm | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Absorbancia promedio |
| 1 | 0.2596 | 0.0255 | $\bar{X}_{(0)} = 0.2663$ |
| 2 | 0.2757 | 0.0255 | $S = 0.00838$ |
| 3 | 0.2636 | 0.0255 | % CV= 3.14 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2596 | 0.0255 | $\bar{X}_{(24)} = 0.2597$ |
| 2 | 0.2518 | 0.0255 | $S = 0.00790$ |
| 3 | 0.2676 | 0.0255 | % CV= 3.04 |
| Tiempo 48 horas | | | |
| 1 | 0.2596 | 0.0255 | $\bar{X}_{(48)} = 0.2624$ |
| 2 | 0.2518 | 0.0255 | $S = 0.01219$ |
| 3 | 0.2757 | 0.0255 | % CV= 4.6 |
| Almacenamiento en la oscuridad y temperatura ambiente | | | |
| Tiempo cero | | | |
| 1 | 0.2557 | 0.0255 | $\bar{X}_{(0)} = 0.2610$ |
| 2. | 0.2636 | 0.0255 | $S = 0.00456$ |
| 3 | 0.2636 | 0.0255 | % CV= 1.75 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2518 | 0.0255 | $\bar{X}_{(24)} = 0.2492$ |
| 2 | 0.2441 | 0.0255 | $S = 0.00445$ |
| 3 | 0.2518 | 0.0255 | % CV= 1.8 |
| Tiempo 48 horas | | | |
| 1 | 0.2218 | 25.5 | $\bar{X}_{(48)} = 0.2194$ |
| 2 | 0.2218 | 25.5 | $S = 0.00410$ |
| 3 | 0.2147 | 25.5 | % CV= 1.9 |

| almacenamiento a 4 °C | | | |
|-----------------------|------------------------------------|--|---------------------------|
| Tiempo cero | | | |
| Muestras | Absorbancia λ 510 nm | Cantidad adicionada (mg) al matraz aforado de 10 mL | Absorbancia promedio |
| 1 | 0.2596 | 0.0255 | $\bar{X}_{(0)} = 0.2570$ |
| 2. | 0.2518 | 0.0255 | S = 0.00450 |
| 3 | 0.2596 | 0.0255 | %CV= 1.75 |
| Tiempo 24 horas | | | |
| 1 | 0.2366 | 0.0255 | $\bar{X}_{(24)} = 0.2292$ |
| 2 | 0.2218 | 0.0255 | S = 0.00740 |
| 3 | 0.2291 | 0.0255 | % CV= 3.2 |
| Tiempo 48 horas | | | |
| 1 | 0.2076 | 0.0255 | $\bar{X}_{(48)} = 0.2079$ |
| 2 | 0.1870 | 0.0255 | S = 0.02105 |
| 3 | 0.2291 | 0.0255 | % CV= 10.1 |

Tabla No. 22 Absorbancia para la muestra estándar, estos valores se emplearán para obtener la cantidad (mg) recuperados y el por ciento de recobro del analito, para las diferentes condiciones propuestas para la estabilidad analítica

Ejemplo del cálculo para estabilidad analítica del estándar.

$$\text{mg Recuperado} = \frac{\text{Abs. de la muestral (0.2146)} * \text{peso de estándar (0.0255 mg)}}{\text{Abs. promedio de estándar (0.2663)}} = 0.02055$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperado (0.02055 mg)} * \text{Porcentaje de pureza (99\%)}}{\text{Cantidad pesada de la muestra (0.0256 mg)}} = 79.47$$

Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial (d_1).

$$|d_1| = |y_1 - y_0|$$

Ejemplo del cálculo para el almacenamiento a la luz a temperatura ambiente en tiempo de 24 horas.

$$|d_{24 \text{ hrs}}| = |85.46 - 79.58| = 5.88$$

Por ciento de recobro de la estabilidad analítica de la muestra.

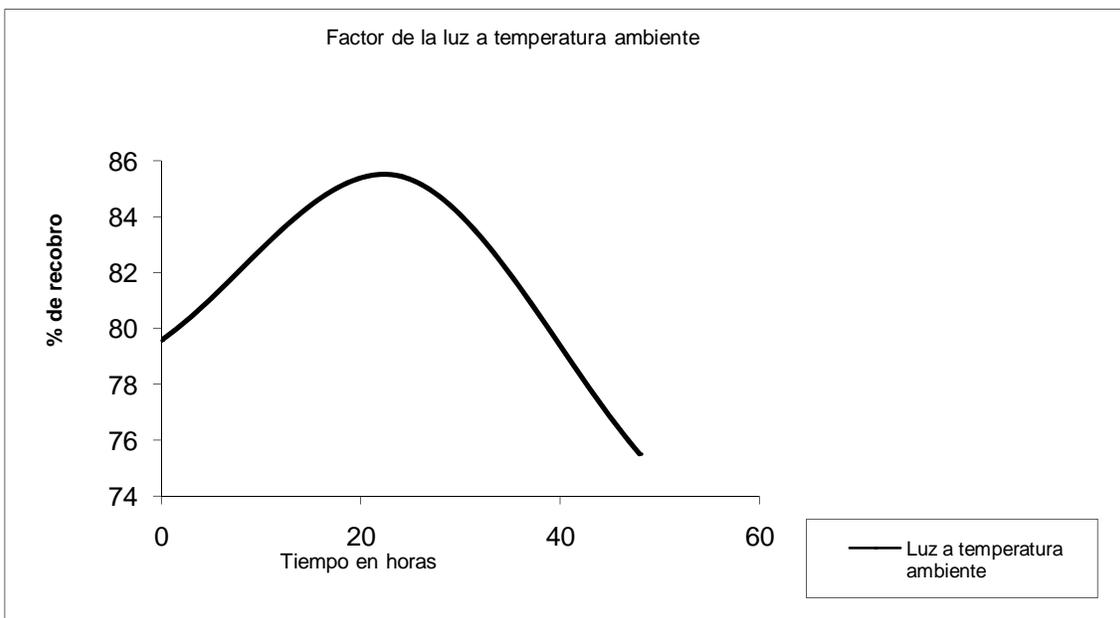
| Almacenamiento en la luz y temperatura ambiente | | | |
|---|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Muestras | % Recobro tiempo 0 h. | % Recobro 24 horas | % Recobro 48 horas |
| 1 | 79.47 | 89.80 | 72.82 |
| 2 | 82.14 | 92.70 | 76.70 |
| 3 | 77.14 | 73.88 | 68.05 |
| \bar{X} | 79.58 | 85.46 | 72.52 |
| /d/ | | 5.88 | 7.06 |
| Almacenamiento en la oscuridad y a temperatura ambiente | | | |
| Muestra | % Recobro tiempo 0 h. | % Recobro 24 horas | % Recobro 48 horas |
| 1 | 78.43 | 82.14 | 78.16 |
| 2 | 81.10 | 87.79 | 84.03 |
| 3 | 78.73 | 85.26 | 90.50 |
| \bar{X} | 79.42 | 85.06 | 84.23 |
| /d/ | | 5.64 | 4.81 |
| Almacenamiento a 4 °C | | | |
| Muestra | % Recobro tiempo 0 h. | % Recobro 24 horas | % Recobro 48 horas |
| 1 | 85.08 | 95.44 | 95.13 |
| 2 | 79.66 | 95.44 | 85.58 |
| 3 | 82.70 | 102.14 | 89.06 |
| \bar{X} | 82.47 | 97.67 | 89.92 |
| /d/ | | 15.2 | 7.45 |

Tabla No. 23 Datos del por ciento de recobro en las diferentes condiciones propuestas para la estabilidad analítica de la muestra, las cuales son: almacenamiento a la luz a temperatura ambiente, almacenamiento en la oscuridad a temperatura ambiente y almacenamiento a 4°C, con su respectiva diferencia absoluta de la media aritmética (/d₁/).

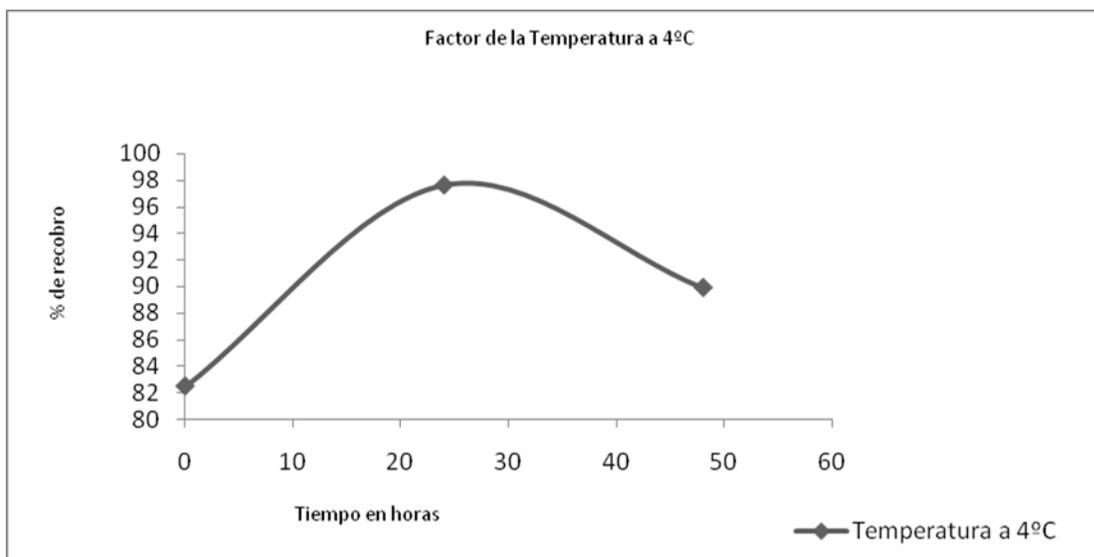
Relación entre el por ciento de recobro para las condiciones de almacenaje en los diferentes tiempos.

| Tiempo en horas | Luz a temperatura ambiente % de recobro | Oscuridad a temperatura ambiente % de recobro | Temperatura a 4 °C de recobro |
|-----------------|---|---|-------------------------------|
| 0 | 79.58 | 79.42 | 82.47 |
| 24 | 85.46 | 85.06 | 97.67 |
| 48 | 72.52 | 84.23 | 89.92 |

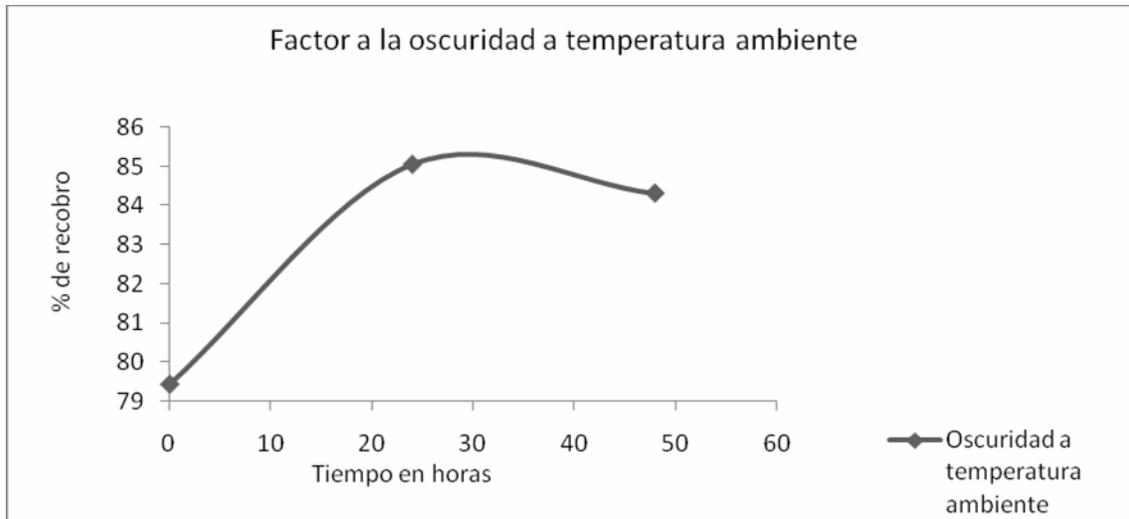
Tabla No. 24 Datos comparativos finales del por ciento de recobro en las diferentes condiciones de almacenaje



Gráfica No. 8 En la estabilidad analítica de la muestra se realizaron diferentes condiciones de almacenaje para determinar el % de recobro, la primera condición de almacenaje luz a temperatura ambiente se muestra que el por ciento de recobro disminuye al tercer día por lo que la muestra no presenta una estabilidad continua.



Gráfica No. 9 La segunda condición de almacenaje, fue colocar la muestra a 4°C, donde el por ciento de recobro al tercer día también disminuye, por lo que la estabilidad de la muestra no es tan continua en estas condiciones.



Gráfica No. 10 Tercera condición de almacenaje, colocar la muestra en la oscuridad a temperatura ambiente, el por ciento de recobro obtenido al tercer día muestra una disminución siendo esta menor que en las dos condiciones de almacenajes anteriores, por lo que muestra una mejor estabilidad.

Estabilidad Analítica, Límite de detección

Límite de detección.

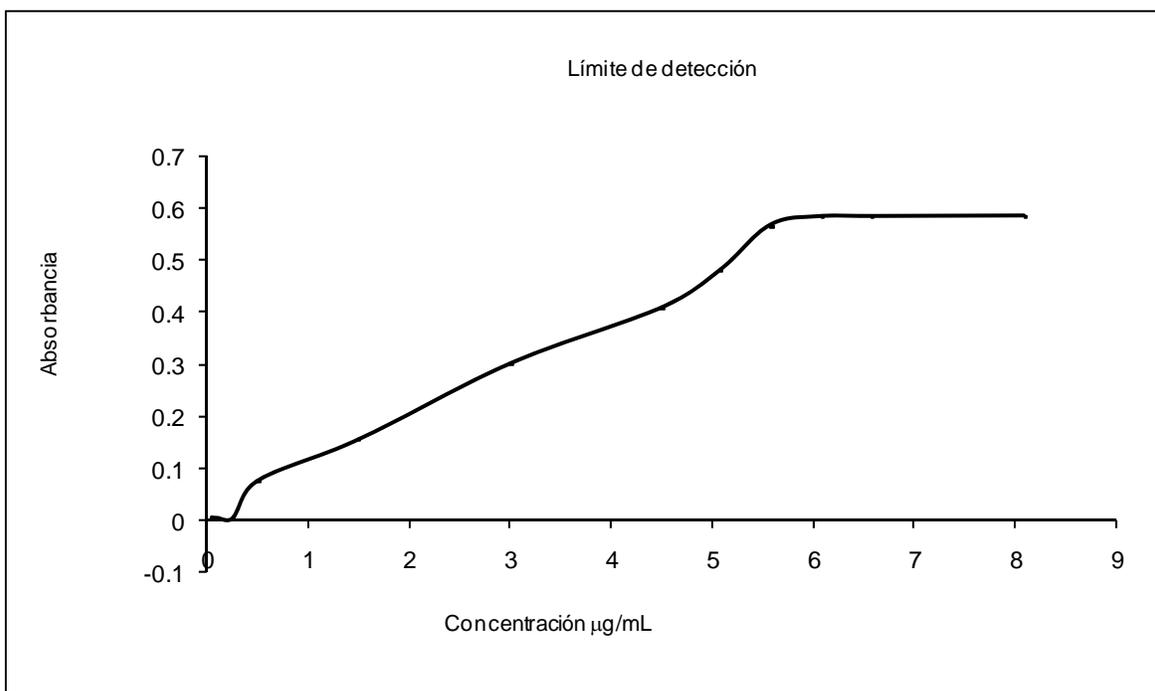
| Absorbancia a 510 nm | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------|------------------------------------|
| 0.0044 | 0.04 |
| 0.0032 | 0.10 |
| 0.0032 | 0.25 |
| 0.0757 | 0.50 |
| 0.1549 | 1.50 |
| 0.3010 | 3.00 |
| 0.4089 | 4.50 |
| 0.4814 | 5.08 |
| 0.5686 | 5.58 |
| 0.5850 | 6.09 |
| 0.5850 | 6.58 |
| 0.5860 | 8.09 |

Tabla No. 25 Datos correspondientes a las concentraciones propuestas para el límite de detección con sus respectivas absorbancias, siendo estas, las respuestas analíticas a analizar.

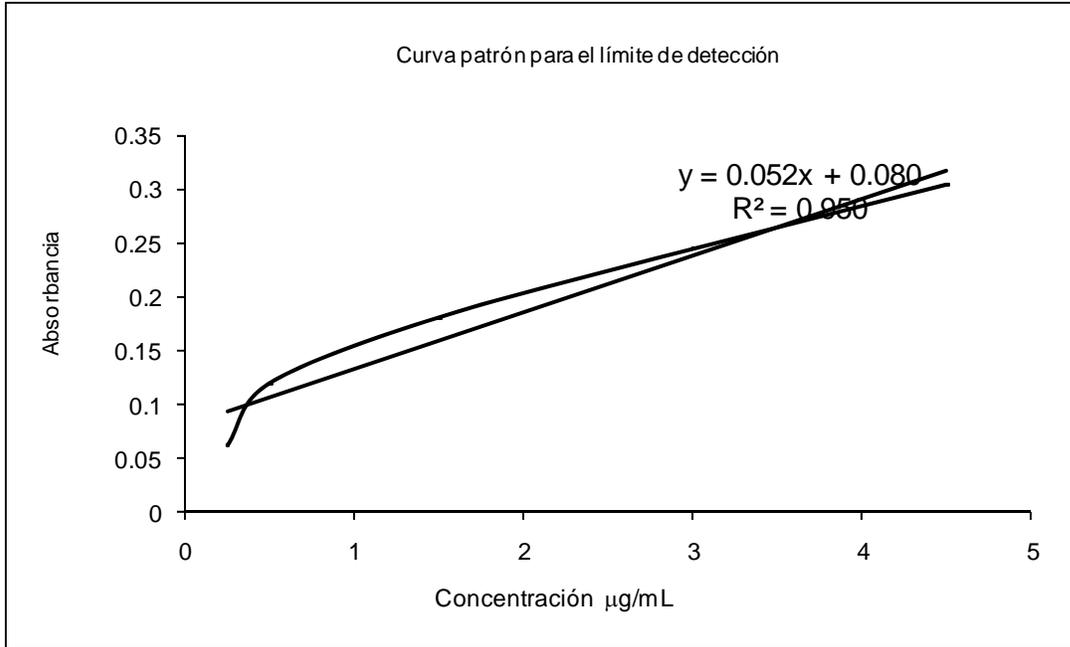
Estándar para la determinación del límite de detección

| Concentración (µg/mL) | Absorbancia | Resultados | Límite de Detección(LD) |
|-----------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------|
| 0.25 | 0.0630 | $r^2 = 0.98$ | $LD_{(Sb)} = 0$ |
| 0.50 | 0.1208 | Ord=0.0809 | $LD_{(Sy/x)} = 1.6437$ |
| 1.50 | 0.1818 | Pend.=0.0524 | $LD_{(Sbo)} = 1.1588$ |
| 3.00 | 0.2452 | $(IC(\beta_1)) = 0.0756, 0.0292$ | |
| 4.50 | 0.3050 | $t_{0.975, n-2} = 3.182$ | |

Tabla No. 26 Resultados obtenidos de la muestra estándar para el límite de detección, el coeficiente de determinación es de 0.98, el intervalo de confianza para la pendiente poblacional, el dato de la t de Student y de los límites de detección.



Gráfica No. 11. Se emplearon concentraciones bajas, mismas que se pudieron detectar en el espectrofotómetro visible, así la concentración mínima detectada en el equipo fue de 0.04 µg/mL, mientras que la concentración máxima donde se obtienen respuestas analíticas constantes fue de 6.09 µg/mL.



Gráfica No.12 Relación entre concentración y la absorbancia, misma que muestra una linealidad teniendo como coeficiente de determinación r^2 de 0.95305, que es menor al 0.98.

Resultados de los blancos (placebos analíticos).

| Peso del blanco mg | Concentración µg/mL | Absorbancia máxima a 510 nm |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| 25.5 | 25.5 | 0 |
| 25.5 | 25.5 | 0 |
| 25.5 | 25.5 | 0 |
| 25.5 | 25.5 | 0 |
| 25.5 | 25.5 | 0 |

Tabla No. 27 Absorbancias de los blancos (placebos analíticos), para el límite de detección.

Muestra comercial.

Producto 1

Cevalin infantil.

Ácido ascórbico, tabletas masticables.

Cada tableta contiene 100 mg de ácido ascórbico

Peso promedio de las 20 tabletas = 0.506195 gramos

Desviación estándar = 0.00461

% CV = 0.9

Análisis del producto I

| Muestra | Masa mg | Absorbancia máxima a 510 nm | mg/tableta | % principio activo con respecto al marbete |
|---------|---------|-----------------------------|------------|--|
| 1 | 129.2 | 0.1904 | 506.2 | 92.3 |
| 2 | 129.2 | 0.1772 | 510.6 | 86.6 |
| 3 | 129.2 | 0.2041 | 499.9 | 97.7 |
| | | | | $\bar{X} = 92.2$ |
| | | | | $S = 5.55$ |
| | | | | % CV = 6.02 |

Tabla No. 28 Datos del análisis del producto comercial Cevalin infantil, se obtiene un coeficiente de variación mayor al 5.0 %

Producto II.

Ácido ascórbico, Doctor Simi.

Cada tableta contiene 100 mg de ácido ascórbico

Peso promedio de las 20 tabletas = 1,42134 gramos.

Desviación estándar: 0.004295

% CV = 0.3022

Análisis del producto II

| Muestra | Masa mg | Absorbancia máxima a 510 nm | mg/tableta | % principio activo con respecto al marbete |
|---------|---------|-----------------------------|------------|--|
| 1 | 362.5 | 0.0915 | 1423.0 | 45.0 |
| 2 | 362.5 | 0.0888 | 1415.0 | 43.0 |
| 3 | 362.5 | 0.1051 | 1426.1 | 51.1 |
| | | | | $\bar{X} = 46.36$ |
| | | | | $S = 4.22$ |
| | | | | $\% CV = 9.1$ |

Tabla No. 29 Datos del análisis del producto comercial ácido ascórbico Doctor Simi, se obtiene un coeficiente de variación mayor al 5.0 %.

Muestra estándar para el producto comercial I y II.

| Muestra | Peso mg | Absorbancia |
|-------------|---------|-------------|
| 1 | 25.5 | 0.2006 |
| 2 | 25.5 | 0.2076 |
| $\bar{X} =$ | 25.5 | 0.2041 |
| $S =$ | 0 | 0.0049 |
| $\% CV =$ | 0 | 2.43 |

Tabla No. 30 Datos de la muestra estándar para el análisis de las muestras comerciales, se obtiene un coeficiente de variación menor mayor al 2.0 %.

Ejemplo del cálculo, de cantidad de principio activo en mg/ tableta de ácido ascórbico.

$$\text{mg/ tableta} = \frac{\text{Abs. de la muestra}}{\text{Abs. estándar}} \times \frac{\text{mg del estándar}}{\text{aforo(mL)}} \times \frac{\text{alícuota(mL)}}{\text{aforo(mL)}} \times \frac{\text{pureza}}{100} \times \frac{\text{aforo(mL)}}{\text{mg muestra}} \times \frac{\text{aforo(mL)}}{\text{alícuota(mL)}} \times \frac{\text{PTableta(mg)}}{1 \text{ tableta}}$$

$$\text{mg/ tableta} = \frac{0.1904}{0.2041} \times \frac{25.5}{25} \times \frac{0.025}{10} \times \frac{99}{100} \times \frac{25}{129.2} \times \frac{10}{0.025} \times \frac{506.2}{1 \text{ tableta}} = 92.3$$

Análisis de resultados

La gráfica No. 1 nos señala la absorbancia máxima obtenida de la reacción del ácido ascórbico a diferentes concentraciones (ppm) con el complejo ferrina en su estado oxidado, la cual se presenta a una longitud de onda a 510 nm. Por tanto se empleará esta longitud de onda para medir la absorbancia máxima del complejo ferroína en su estado reducido, en el desarrollo de la validación para la cuantificación del ácido ascórbico.

Cinética de la reacción.

La reacción óxido - reducción que se presenta con el ácido ascórbico a reaccionar con la ferrina en su forma oxidada es lenta, ya que el producto de la reacción ferroína en su forma reducida presenta en un principio una coloración débil el cual no puede ser detectado por el espectrofotómetro en la región visible, por lo que es necesario calentar en baño maría la muestra, esto con la finalidad de acelerar la reacción.

Como resultado se obtuvo que en un tiempo máximo de 50 minutos, la reacción presenta una coloración intensa y la absorbancia es constante, por tanto el tiempo a emplear para el calentamiento de la reacción y medir la absorbancia máxima de la reacción es de 50 minutos.

Especificidad.

Se analizó el placebo con muestra analítica y el estándar del analito, la absorbancia máxima del complejo de la ferroína en su estado reducido esta a una longitud de onda de 510 nm, no hay interferencia del placebo por lo que la muestra analítica es específica a esa longitud de onda y por tanto se puede emplear en el desarrollo de la validación.

Precisión del sistema.

Se realizó el sextuplicado de disoluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la disolución de referencia, el coeficiente de variación

obtenido es menor al 1.5 % en la respuesta analítica y una desviación estándar menor $3.143 * 10^{-03}$, por tanto es aceptable y preciso el sistema.

Linealidad del sistema.

Se prepararon 5 niveles de concentración por triplicado para realizar la linealidad del sistema y se obtienen sus respectivos promedios, su coeficiente de determinación fue de $r^2 = 0.9931$ mostrando una aceptable linealidad, por lo que la relación de absorbancia y concentración es directamente proporcional, no presenta ninguna interferencia en su respuesta analítica y la desviación estándar es menor.

Exactitud y repetibilidad del método.

Se preparó el sextuplicado del placebo analítico con su respectiva cantidad analítica, el cual representa el 100 % de la muestra procesada para su medición.

En la tabla No. 10, los resultados indican que el coeficiente de variación es menor al 3%, mientras que su porcentaje de recobro es aceptable, ya que está dentro del intervalo especificado por lo que el error que pueda presentarse es mínimo y no afecta a la validación del método.

Linealidad del método.

En la linealidad del método la cual presenta un nivel superior e inferior en las concentraciones, se obtuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9951$, por lo que la relación entre la absorbancia y la concentración es lineal.

El porcentaje de recobro en el intervalo de confianza de la media poblacional, se obtuvo un porcentaje menor a lo establecido en la guía de validación, mientras que el por ciento de coeficiente de variación es mayor al 3 %, la desviación estándar de la linealidad del método fue mayor por lo que se infiere que hubo un error al desarrollar el procedimiento experimental, el cual podría ser por varias causas (el manejo del equipo, buenas prácticas

de laboratorio, reactivos, proceso del calentamiento en baño maría, etc.), mismas que se pueden corregir, teniendo la precaución pertinente.

Precisión del método, precisión intermedia o tolerancia interdía.

Se requirió de dos analistas los cuales realizaron por triplicado la muestra homogénea del producto, previamente se determinó cual nivel de concentración representa el 100% de la muestra.

La metodología se realizó en dos días diferentes, los resultados señalan que tanto el analista 1 como el analista 2, no fueron precisos ya que el por ciento del coeficiente de variación total fue del 3,0% teniendo una desviación estándar grande, además los resultados indican que el analista 2 obtuvo una mayor recuperación de la cantidad adicionada, a diferencia del analista 1, que sin embargo al llevar más tiempo aplicando esta técnica experimental, no obtiene un buen porcentaje de recobro, mientras que el analista 2 lo realizó por primera vez.

Para el segundo día al analista 1 obtuvo una mayor recuperación que el analista 2, por lo que se debe de realizar un mejor manejo con respecto al equipo del laboratorio y en hacer buenas prácticas de laboratorio para el desarrollo de la validación, debido a que sus porcentaje de recobros son bajos.

Estabilidad analítica de la muestra.

Se evaluó la estabilidad de la muestra, realizando por triplicado la muestra homogénea para cada almacenamiento propuesto.

Se analizaron las diferencias absolutas de la media aritmética, respecto del análisis inicial denominado ($|d_i|$), obteniéndose valores mayores al 3%, el cual nos señala que la muestra analítica presenta problemas al llevarlo al almacenamiento, probablemente sea por factores externos como son temperatura, luz, oscuridad, recipiente, los cuáles pudieron haber provocado la inestabilidad de la muestra, esta situación se evidencia al observar los porcentajes de recobro de las muestras en las gráficas No. 8, 9, y 10, las cuales muestran la relación entre el por ciento de recobro contra el tiempo de incubación a la que fueron

sometidos las disoluciones en las diferentes condiciones de almacenaje propuestos, en la gráfica 10 se muestra que en la oscuridad a temperatura ambiente presenta una mayor estabilidad, que a diferencia de la gráfica 8 y 9 siendo esta luz a temperatura ambiente e incubación a 4 °C respectivamente, son inestables.

Límite de detección

En la tabla No. 26 de resultados, se indica que la concentración mínima detectable para una respuesta analítica en el equipo de Espectrofotómetro UV/Visible marca Hitachi Perkin- Elmer 139 es de 0.04 µg/mL, mientras la concentración de 8.09 µg/mL se obtiene la respuesta analítica máxima, ya que las concentraciones mayores a 8 µg/mL, la respuesta analítica se mantiene constante.

Se realiza la curva de calibración presentando un coeficiente de determinación (r^2) de 0.98 presentando una relación lineal.

Se midieron la respuesta analítica del blanco (solo el placebo analítico), los cuales no tuvieron ninguna respuesta, lo que indica que ningún excipiente interviene en el proceso de reacción mostrado la especificidad de la muestra analítica, debido a que no presenta ninguna señal de ruido que pueda detectar el equipo espectrofotométrico en la región visible

Análisis de las respuestas comerciales.

Se realizó el análisis para las muestras comerciales Cevalin (Bayer) y de la Vitamina C (Doctor Simi), el resultado indica que en una de las muestras se obtiene un porcentaje mayor al 90 % de principio activo, mientras que en la otra muestra el principio activo fue menor al 50%.

Conclusiones.

Se concluye que el método analítico para cuantificar ácido ascórbico de tabletas comerciales por medio de un espectrofotómetro UV/Visible marca Hitachi Perkin- Elmer 139, es preciso, exacto y lineal, ya que en la determinación del sistema como del método están dentro del criterio de aceptación, teniendo coeficientes de determinación (r^2) y coeficientes de variación resultados aceptables. Al realizar buenas prácticas de laboratorio los errores presentados en el desarrollo de la validación fueron mínimos.

Es específica debido a que la absorbancia máxima que presenta el producto de la reacción es de 510 nm, el placebo no presenta ninguna reacción con la ferrina por lo que no interviene en el desarrollo de la validación.

La muestra no es estable a las condiciones propuestas para la estabilidad analítica de la muestra, presenta inestabilidad al colocarlos a los diferentes tipos de almacenaje, esto es evidente debido a las propiedades físicas como químicas que tiene el ácido ascórbico, por lo que es importante que este tipo de muestras no tengan contacto con la luz.

El espectrofotómetro UV/Visible marca Hitachi Perkin- Elmer 139, presenta una rapidez y sensibilidad adecuadas por lo que es un equipo de detección importante para el implemento de esta validación, debido a que puede detectar cantidades mínimas del analito así como cantidades grandes, los cuales deben de cumplir con la Ley de Lambert - Beer.

El desarrollo de la validación del método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico en tabletas comerciales por espectrofotometría visible, representa un método apropiado y confiable que nos permite llevar a cabo el análisis de nuestro componente específico de la muestra, esto a partir de las propiedades químicas del ácido ascórbico que nos permitan desarrollar nuevos métodos para su estudio.

Anexo

Formulación.

Vitamina C, ácido Ascórbico, para tabletas masticables de 100 mg, 500 mg, y 1000 mg

Formulación.

| Sustancia | Por ciento | Cantidades equivalentes para 20 gramos del placebo analítico |
|---|------------|--|
| Ácido ascórbico polvo | 42.2 | 8.3896 |
| Microcristalina celulosa e.g. Avicel P.H. 101 | 28.3 | 5.6262 |
| Sucrosa polvo | 13.0 | 2.5845 |
| Sucrosa cristalina | 8.0 | 1.5904 |
| Kollidon VA 64 | 2.4 | 0.4771 |
| Ciclamato sódico | 2.4 | 0.4771 |
| Polietilenglicol 6000 | 2.0 | 0.3976 |
| Sabor naranja + sabor fresa | 1.2 | 0.2385 |
| Aerosil | 0.2 | 0.0398 |
| Sacarina sódica | 0.1 | 0.0198 |

Tabla No. 3 Formulación a partir de sustancias obtenidos de la BASF, para tabletas masticables del ácido ascórbico.

Celulosa microcristalina Avicel PH 101.

Sinónimos: Avivel PH, gel celulosa, cristal celulosa, vivapur, tabulosa.

Fórmula empírica: $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde $n \approx 220$

Peso molecular: 36000

Funciones: Adsorbente se emplea en tabletas y cápsulas como diluyente, en tabletas como desintegrante y a veces como lubricante.

Densidad: 1.512 – 1.668 g/cm³

Punto de fusión: 260 – 270 °C.

Solubilidad: Es soluble en un 5% de hidróxido de sodio, en ácidos, solventes orgánicos insoluble en agua.

Incompatibilidad: La celulosa microcristalina es incompatible con agentes oxidantes.

Sucrosa.

Sinónimos: Sacarosa, azúcar refinada, azúcar

Fórmula empírica: $C_{12}H_{22}O_{11}$ Peso molecular: 342,30

Funciones: Base de los medicamentos confeccionados, agente granulante, agente endulzante, se emplea en tabletas y cápsulas como diluyente, incrementa la viscosidad.

Densidad: 1.6 g/cm^3

Punto de fusión: $160 - 186 \text{ }^\circ\text{C}$.

Constante de disociación, $\text{pK}_a = 12.62$

Solubilidad: Es soluble en agua, menos soluble en etanol y propanol, insoluble en cloroformo

Incompatibilidad: La sucrosa en polvo puede ser contaminada con trazas de metales pesados, que puede provocar incompatibilidad con el ácido ascórbico.

También la sucrosa puede ser contaminado con sulfito, ya que cambia el color a las tabletas granuladas de su forma original

Kollidon.

Sinónimos: Plasdon, povidona, PVP.

Fórmula empírica: $(C_6H_9NO)_n$, Peso molecular: 2500 - 3000000

Funciones: Desintegrante ayuda a disolver tabletas granuladas, también se emplea como agente sodificante, empleado para la suspensión, estabilización e incremento de la viscosidad en suspensiones orales.

Densidad: 1.180 g/cm^3

Punto de fusión: $150 \text{ }^\circ\text{C}$.

Acidez /alcalinidad: $\text{pH} = 3.0 - 7.0$ (5% w/v solución acuosa).

Solubilidad: Soluble en disoluciones ácidas, cloroformo, etanol, cetonas, metanol y agua. Prácticamente insoluble en éter y aceite mineral.

Incompatibilidad: Es compatible en disoluciones de sales inorgánicas, resinas sintéticas y naturales.

Ciclamato sódico

Sinónimos: Ácido ciclohexilsulfámico monosódico

Fórmula empírica: $C_6H_{12}NNaO_3S$ Peso molecular: 201.22

Funciones: Agente endulzante

Dosis letal LD₅₀: LD₅₀ en ratón= 17 g/ Kg oral, LD₅₀ en rata= 15.25 g/ Kg oral.

Acidez /alcalinidad: pH = 5.5 – 7.5 (10% w/v solución acuosa).

Solubilidad: Soluble en agua, propilenglicol, poco soluble en etanol, insoluble en benceno, cloroformo y éter.

Incompatibilidad: No hay incompatibilidad.

Polietilenglicol. (PEG).

Sinónimos: Lipo, Lipoxol, Lutrol E; PEG, Pluriol E, Carbowax.

Fórmula empírica: $HOCH_2 (CH_2OCHA_2)_m CH_2OH$, donde m representa el promedio de grupos oxietileno. Peso Molecular PEG 600: 570 - 613

Funciones: Se emplea en una variedad de formulaciones farmacéuticas que incluyen los oftálmicos, parentales, tópicos, orales, y preparaciones rectales.

Se emplea como solvente en la miscibilidad del agua para cápsulas de gelatina suave, en la formulación para la dosificación sólida, su alto peso molecular permite a las tabletas recubiertas prolongar la desintegración.

Densidad: 1.15 – 1.21 g/cm³ a 25 °C de forma sólida.

Punto de fusión: 250 °C. en un PEG 600

Solubilidad: Todos los grados de PEG son solubles en agua y es miscible en todas las proporciones de PEG, soluble en acetona, diclorometano, etanol y metanol, es insoluble en aceite minerales.

Incompatibilidad: Puede ser incompatible en agentes colorantes, la actividad antibacteriana como son las penicilinas y bacitricinas reducen las bases del PEG.

Aerosil.

Sinónimos: Sílica coloide, ácido silícico, dióxido silicon

Fórmula empírica: SiO_2 Peso molecular: 60.08

Funciones: Adsorbente, estabiliza la emulsión, se emplea en las tabletas como desintegrante.

Densidad: En un grado de 380 g/cm^3

Gravedad específica: 2.2

Dosis letal LD_{50} : $\text{LD}_{50 \text{ en rata}} = 3.16 \text{ g/ Kg oral}$

Acidez /alcalinidad: $\text{pH} = 3.5 - 4.4$ (4% w/v solución acuosa).

Solubilidad: Prácticamente insoluble en solventes orgánicos, agua y ácidos, excepto ácido hidrofúrico, forma coloides dispersos en el agua

Incompatibilidad: Es incompatible con preparaciones con dietilestilbestrol.

Sacarina Sódica.

Sinónimos: Cristalosa, sacarina soluble.

Fórmula empírica: $\text{C}_7\text{H}_4\text{NNaO}_3\text{S}$, Peso molecular: 205.16

Funciones: Se emplea como agente endulzante, y en algunos casos se emplea en la preparación de vitaminas.

Densidad: 1.70 g/cm^3 (84% de la sacarina de sodio).

Punto de fusión: Se descompone en caliente.

Dosis letal LD_{50} : $\text{LD}_{50 \text{ en rata}} = 14.2 \text{ g/ Kg oral}$, $\text{LD}_{50 \text{ en ratón}} = 17.5 \text{ g/ Kg oral}$

Solubilidad: Soluble en agua, disolución reguladora (ftalato a $\text{pH} 2.2$, borato pH a 9.0 , citrato fosfato a $\text{pH} 7$ y 4), propilenglicol, poco soluble en etanol, insoluble en propanol.

Incompatibilidad: No hay incompatibilidad.

Ortofenantrolina.

Sinónimos: Orto- fenantrolina, 1, 10 - fenantrolina

Fórmula empírica: $C_{12}H_8N_2$ Peso molecular: 180.20

Funciones: Se emplea para formar compuestos complejos con el ión hierro, bajo el nombre de ferroína siendo un sistema indicador en oxido – reducción.

Punto de fusión: De 93 – 94 °C, anhídrido a 117°C.

Solubilidad: Poco soluble en agua (300 partes en agua), y en benceno (70 partes en agua). Soluble en acetona y en alcohol.

Símbolos y abreviaturas.

AS Authentic substance

b_1 Pendiente

b_{11} Pendiente del método

b_{12} Pendiente del método 2.

b_0 Ordenada al origen.

b_{01} Ordenada al origen del método 1.

b_{02} Ordenada al origen del método 2.

BP British Pharmacopeia

BPF Buenas prácticas de fabricación.

CLAR Cromatografía de líquidos de alta resolución.

CONSUFAR Comité de Sustancias Farmacéutica de Referencia.

CV Coeficiente de variación o desviación estándar relativa.

$CV_{y/x}$ Coeficiente de variación de regresión.

$|d_i|$ Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.

$F_{0.975,gl}$ Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 97.5 % y a grados de libertad (gl) establecidos.

$F_{0.05, gl}$ Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 97.5 % y a grados de libertad (gl) establecidos.

$F_{0.025,gl}$ Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza a una confianza del 5% y a grados de libertad (gl) establecidos.

FDA Food and Drug Administration

FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

g Gramos

gl Grados de libertad.

IC (β_1) Intervalo de confianza para la pendiente poblacional

IC ($\beta_{11} - \beta_{12}$) Intervalo de confianza para la diferencia de 2 pendientes poblacionales.

IC (β_0) Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional.

IC ($\beta_{01} - \beta_{02}$) Intervalo de confianza para la diferencia de 2 ordenadas al origen poblacionales.

IC (μ_1) Intervalo de confianza para la media poblacional.

IC ($\mu_1 - \mu_2$) Intervalo de confianza para la diferencia de 2 medias poblacionales.

K' Factor capacidad.

LC Límite de cuantificación

LD Límite de detección

LGS Ley General de Salud.

LNSP Laboratorio Nacional de Salud Pública.

mg miligramos.

n Número de mediciones o recobros o blancos o muestras o determinaciones.

n_0 Número de muestras del análisis inicial.

n_1 Número de mediciones del método 1.

n_2 Número de mediciones del método 2.

NF National Formulary

NOM Norma Oficial Mexicana

OMS Organización Mundial de la Salud

PNO Procedimiento Normalizado de Operación

ppm Partes por millón.

r^2 Coeficiente de determinación.

S Desviación estándar

S_b Desviación estándar de los blancos.

S_{b0} Desviación Estándar de la ordenada al origen.

$S_{b0_1 - b0_2}$ Desviación estándar para la diferencia de 2 ordenadas al origen.

S_{b1} = Desviación estándar de la pendiente

$S_{b1_1 - b1_2}$ Desviación estándar para la diferencia de 2 pendientes.

S^2 Varianza.

S^2_1 Varianza del método 1

S^2_2 Varianza del método 2

σ^2 Varianza poblacional.

σ^2_2/σ^2_1 Razón de varianzas poblacionales.

Sref Sustancia de Referencia

SSA Secretaría de Salud.

$S_{y/x}$ Desviación estándar de regresión

$t_{0.975,gl}$ Valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 95% y a grados de libertad (gl) establecidos.

USP United States Pharmacopoeia

VMA Validación de métodos analíticos.

\bar{X} Media aritmética de x.

y Media aritmética de y.

y_1 Media aritmética del método 1

y_2 Media aritmética del método 2

y_0 Media aritmética del análisis inicial

y_1 Media aritmética de cada condición de almacenaje

% Porcentaje o por ciento

Glosario

- Adecuabilidad del sistema: Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
- Almacén: Área donde se guardan materias primas, materiales, intermedios y fármacos, en condiciones controladas de orden y limpieza.
- Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.
- Calibración: Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.
- Contaminación: Es la presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables
- Documentación: Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.
- Especificaciones: Descripción de material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

- Estudio colaborativo: Reproducibilidad realizada en distintos laboratorios, por diferentes químicos.
- Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- Estabilidad analítica de la muestra: Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación. De conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.
- Fecha de caducidad: Fecha que se indica en el material de envase primario y/o secundario y que determina el periodo de vida útil del fármaco, se establece a partir de la fecha de fabricación, con base en estudios de estabilidad.
- Forma Farmacéutica: Es la mezcla de uno o más fármacos con o sin aditivos, que presentan características para su adecuada dosificación, conservación y administración.
- Intervalo: Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.
- Límite de cuantificación: Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.
- Límite de detección: Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

- Linealidad: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.
- Lote: Cantidad específica de cualquier materia prima o insumo, que haya sido elaborada en un ciclo de producción, bajo condiciones equivalentes de operación y durante un periodo determinado.
- Metodología de prueba: Procedimiento o grupo de procedimientos, para determinar si un producto o materia prima cumple con las especificaciones establecidas.
- Método analítico: Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.
- Método analítico desarrollado internamente: Método desarrollado por el propio laboratorio.
- Método analítico indicativo de estabilidad: Método cuantitativo capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado, debidas a las condiciones de almacenaje.
- Método analítico oficial: Método que aparece en la literatura oficial reconocida,
- Método analítico no oficial: Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

- Muestra: Porción del material a evaluar.
- Muestra analítica: Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.
- Muestra adicionada: Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.
- Parámetros de desempeño: Parámetros específicos a estudiar en un protocolo de validación.
- Placebo analítico: Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.
- Placebo adicionado: Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.
- Precisión: Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.
- Precisión intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.
- Proporcionalidad: Relación establecida por una ecuación matemática entre los resultados obtenidos por dos métodos analíticos.

- Protocolo de validación: Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.
- Recobro: Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.
- Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.
- Reproducibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.
- Revalidación: Comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico, o cambios críticos en los procesos de fabricación.
- Robustez: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
- Sustancia de referencia: Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.
- Sustancia de referencia primaria: Sustancia que es designada o reconocida por tener la más alta calidad metrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

- Sustancia de referencia secundaria: Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido.

- Validación, a la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

- Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Bibliografía.

1. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.
Editores de Thomson PLM año 2005.
Páginas: 2459, 2460, 3515, 3516, 3763, 3979.
2. The Merck Index.
Merck y Co., INC, Whitehouse Station, New Jersey, Décimo tercera edición,
Año 2001.
Página: 837.
3. USP (29) NF (24).
Farmacopea de los Estados Unidos de América.
Año 2006.
Páginas: 217, 218.
4. Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
Goodman y Gilman. Décima edición, año 2001.
Editoreal Mc Graw Hill.
Página: 1787 - 1790
5. Diccionario de Química y de Productos Químicos.
N. Irving Sax / Richard J. Lewis, SR. Nueva edición 1993.
Editoreal Omega S. A.
Página: 89, 99.
6. Farmacia Remington.
Editoreal Panamericana, Vigésima edición, año 2000.
Tomo II.
Página 1787 – 1790.

7. Handbook of Pharmaceutical Excipients.
Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Paul J. Weller.
Editoreal Staff Pharmaceutical Press, American Pharmaceutical Association.
Cuarta edición.
Páginas: 532 - 534, 454 - 459, 161 - 164, 508 - 513, 563 - 565, 622 - 625, 108 - 111.

8. Fundamentos de Química Analítica.
Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler y Stanley R. Crouch
Editoreal Reverte. Cuarta Edición 1996.
Páginas: 536 - 555, 532 - 582, 876, 508 - 531.

9. Análisis Instrumental.
Douglas Skoog / Leary.
Mc Graw Hill. Cuarta Edición, año 1994.
Páginas: 66 - 70, 91 - 139, 142 - 170, 173 - 180

10. Curso de análisis Farmacéutico.
Kenneth A. Connors.
Editoreal Reverté S. A. Segunda edición 1980.
Páginas: 200 - 222.

11. Análisis Químico Farmacéuticos de Medicamentos.
Yves Cohen, Dominique Pradeau.
Editoreal Noriega, Editores UTEHA. Primera edición 1998.
Páginas 564 - 590.

12. Principios de Química Farmacéutica.
W. O. Foye.

Editoreal Reverté S. A., año 1991.

Páginas: 694 – 696.

13. Guía de validación de métodos analíticos

Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México,
A.C. Año 2002

14. Fundamentos de Química Analítica..

Duglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler y Stanley R. Crouch

Editoreal Thomson, octava edición, año 2005

Páginas: 561, 562.

15. Generic Drug Formulations

Völker Buhler

BASF. Fine chemicals, primera edición 1997

16. Bioquímica

Cristopher K. Mathews, K. E. van Holde, Kevin G. Holde

Tercera edición, Person Educación S. A. Madrid, 2002

Página 195-196

Artículos.

1. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II) – neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals.
Kubilar Güçlü, Kevser Sözgen, Esmâ Tütem, Mustafa Özyürek, Reşat Apak.
Istanbul University, Faculty Chemistry Department, Avcular. Turkey
Talanta 65 (2005) 1226 – 1232
2. Development and application of novel UV method for the analysis of ascorbic acid.
Wenming Zeng, Frank Martinuzzi, Alexander McGregor
Research and Development, Toronto Institute of Pharmaceutical Technology.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2005) 1107 - 1111
3. Kinetic method for determination of ascorbic acid on flow injection system by using its catalytic effect on the complexation reaction of an ultra sensitive colorimetric reagent of porphyrin with Cu (II).
Jianhua Liu, Jun – Ichi Itoh
Department of Applied and Environmental Chemistry. Kitami Institute of Kitami
Japan.
Spectrochimica acta Part A XXX (2007) XXX – XXX
4. Oxidation reaction of L – ascorbic by dicyanobis (1, 10 phenantroline) iron (III) in dimethyl sulfoxide at elevated pressures: evidence for adiabatic electron transfer.
Mitsuru Matsumoto, Toshiyasu Tarumi, Ken – Ichi Sugimoto, Nobuyoshi Kagayama Shigenobu Funahashi, Hideo D. Takagi.
Department of Chemistry, Nagoya University, Nagoya Japan.
Inorgánica clinic acta 255 (1997) 81 - 85

Páginas de la red.

<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>

<http://www.whooc.no/atcddd/>

Normas

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996)

Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY – NOM – 059 – SSA1 – 2004, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM – 059 – SSA1-1993.

Norma Oficial Mexicana NOM – 177 SSA1 – 1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.