



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ACETAMINOFÉN EN UN PRODUCTO FARMACÉUTICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MORALES PRESA CLAUDIA



MÉXICO, D.F

2008



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: Prof. PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

VOCAL: Prof. ISAURA LUISA CARRERA GARCÍA

SECRETARIO: Prof. MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS

1^{er} SUPLENTE: Prof. CONSUELO AYALA MONDRAGÓN

2^{do} SUPLENTE: Prof. MARÍA TERESA BUENTELLO RODRÍGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Facultad de Química, Edificio A Laboratorio 3D
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA

Pedro Villanueva González

SUSTENTANTE

Claudia Morales Presa

AGRADECIMIENTOS

Te agradezco Dios por cada instante en mi vida, por la fortaleza y las lecciones a las que me has enfrentado.

A mis padres: Ema Presa Reyes y Arturo Morales Cruz, son lo mejor que he tenido en mi vida, por que son las personas que han encauzado mi vida. Gracias por todo el amor, confianza, paciencia y el sacrificio que han realizado, ya que nunca podré pagar su esfuerzo. Este triunfo es de ustedes los quiero.

A mis hermanos: Arturo, Alejandro, Gracias por el cariño y sobre todo por sus cualidades humanas ya que siempre tenían una palabra de consuelo cuando lo necesitaba y estar alentando mi camino para llegar a mi meta.

A mis abuelitos: Matilde, María, Teodoro y Carlos, gracias por que me dieron el mejor regalo en mi vida, a mis padres.

A la familia Morales y Presa, por que cada miembro de esta, a llenado mi vida de amor, cariño e ilusiones.

A la familia Gómez Roa en especial a la güera, tú eres como una hermana para mí, ustedes son una parte de mi familia, ya que me han brindado más que una amistad, gracias por su apoyo y estímulo constante.

A Pedro Villanueva gracias por el apoyo, enseñanza, paciencia y sobre todo la amistad que me brindas, eres una persona muy especial nunca cambies.

A mis amigos: Haideé, Karla, Sonia, Ana, Carlos, Aidee, Aremi, América, Fernando, Efrén, Sandra, Dagny, Minerva y Tere, gracias por la amistad ya que ustedes hicieron mi estancia más agradable y espero que la distancia no logre separarnos.

Vilchís, Kari, Vero, Ira, Marino, Sr. Javier y Sra. Beti gracias, por su amplia y valiosa ayuda ya que la estancia en el laboratorio fue divertida y los considero como mis amigos.

A mis profesores ya que nunca terminare de agradecer los conocimientos que me han transmitido.

A las profesoras Isaura Carrera y Socorro Ramos, gracias por dedicar tiempo a la revisión de mi trabajo, por las sugerencias, comentarios y atenciones. Ya que ustedes me ayudaron a llegar al último eslabón de mi meta.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química Te agradezco la formación profesional, ya que eres la máxima casa de estudios y estoy orgullosa de pertenecer a esta.

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de la DGAPA, a través del proyecto PAPIIT PE204905

DONES

Mi padre es muy bueno: me donó su lealtad,
sus ganas de trabajar, su carácter
¡Gran ofrenda la suya! Pero tú, madre mía,
tú me hiciste el regalo de apacible candor.

Tú pusiste en mi alma la enfermiza ternura,
el anhelo nervioso e incansable de amar;
las recónditas ansias de creer; la dulzura
de sentir la belleza de la vida, y soñar.

Del ósculo fecundo que se dieron dos seres
-el gozo y el triste- en una hora de amor,
nació mi alma inarmónica; pero tú, madre, eres
quien me ha dado el secreto de la paz interior.

A merced de los vientos, como una barca rota
Va, doliente, el espíritu; desesperado.
La placidez alegre poco a poco se agota;
más sobre la sonrisa que me dio mi padre, brota
de mis ojos la lágrima que la madre me dio.

Luis G. Urbina

ÍNDICE

Introducción	7
Objetivos	9
CAPITULO I “GENERALIDADES”	
1.1 Monografía del Acetaminofén	11
1.2 Métodos analíticos utilizados para determinación de acetaminofén	14
Validación de proceso	
1.3 Definición de validación	16
1.4 Revisión de la NOM-059-SSA1-2006	16
1.5 Clasificación de Métodos Analíticos	19
1.6 Planificación para la Validación de Métodos Analíticos	20
CAPITULO II “DESARROLLO EXPERIMENTAL”	
2.1 Fundamento del método desarrollado para cuantificar acetaminofén	22
2.2 Material, equipo, reactivos	23
2.3 Especificidad	25
Parámetros de validación del sistema	
2.4 Linealidad	26
2.5 Precisión	27
Parámetros de validación del método	
2.6 Linealidad del método	28
2.7 Exactitud del método	28
2.8 Precisión del método	29
2.9 Estabilidad analítica de la muestra	29
2.10 Determinación de Acetaminofén en tabletas	30

CAPITULO III “RESULTADOS”

Determinación de longitud de onda	33
3.1 Especificidad	34
Resultados del sistema	
3.2 Linealidad	36
3.3 Precisión	38
Resultados del método	
3.4 Linealidad del método	39
3.5 Exactitud y repetibilidad al 100 %	42
3.6 Precisión del método	43
3.7 Estabilidad analítica de la muestra	44
3.8 Resultados de la validación del método	46
3.9 Determinación de acetaminofén en productos comerciales.	47

CAPITULO IV “CONCLUSIONES”

4.1 Conclusiones	51
------------------	----

“BIBLIOGRAFÍA”

Bibliografía	53
ANEXO 1	56
ANEXO 2	72

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica tiene el objetivo de producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Para poder conseguir un dominio de la calidad surge del concepto de validación, por lo cual se puede decir, que el grado de seguridad depende de la validación de los procesos, sin olvidar que para tener medicamentos seguros y eficaces de forma continua es importante la calidad constante.

La validación, es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SSA1-2006).

Para la validación es necesario que se cumplan con las Buenas Prácticas de Laboratorio con las que se garantiza la calidad a los procesos y condiciones, bajo los cuales se han de planificar, realizar, controlar, registrar, archivar e informar los estudios realizados. El cumplimiento con este estándar proporciona una garantía pública de los derechos, la seguridad y el bienestar de los consumidores.

(Buenas Prácticas de Laboratorio)

La validación de un método analítico debe realizarse con la materia prima de referencia y un medicamento de prueba, en ambos se utiliza la misma técnica de validación. Si se tiene disponible el placebo de la forma farmacéutica, se debe realizar la validación mediante la determinación del porcentaje de recuperación, al mismo tiempo realizar la validación mediante el método de estándar adicionado, esto es, agregar a cada medicamento cantidades conocidas del fármaco y determinarlo.

(NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998).

El acetaminofén (paracetamol) presenta acción analgésica, al impedir la formación de prostaglandinas en el organismo. Las prostaglandinas se producen en respuesta a una lesión, o a ciertas enfermedades, y provocan dolor, entre otros efectos.

A diferencia de la aspirina, el paracetamol no posee efecto lesivo sobre la barrera mucosa del tracto gastrointestinal, no produce disfunción plaquetaria, posee mayor rango terapéutico.

El acetaminofén es un ácido débil y tiene un pKa de 9.5 debido a su grupo hidroxilo aromático. La absorción digestiva (oral y rectal) es rápida consiguiéndose niveles terapéuticos (10-20 µg/Kg) y efecto clínico entre 30 min y 2 horas después de una dosis (10-15 mg/Kg cada 4 horas). El volumen de distribución es 0.9-1 L/Kg, y la unión a proteínas transportadoras es prácticamente insignificante. La eliminación, vía urinaria tras su metabolización en gran parte en el hígado, muestra una cinética de primer orden, con una vida media de 2-4 horas, alargándose en niños, ancianos y en pacientes con disfunción hepática. Los efectos clínicos persisten 3-4 horas después de ingerir la dosis terapéutica.

El método que se utilizara para llevar a cabo la determinación del acetaminofén, es por espectrofotometría. Este método de cuantificación es empleado en laboratorios químicos y clínicos en todo el mundo.

El acetaminofén es soluble en 1 en 70 partes de agua y en 1 en 20 partes de agua caliente. Por lo que el disolvente es un punto importante para espectroscopia ultravioleta-visible, debe ser transparente en la región del espectro donde absorbe el paracetamol y debe disolver una cantidad suficiente de la muestra para obtener un espectro confiable del analito.

Esta tesis está conformada por cuatro capítulos y un anexo. En el primer capítulo se presenta las generalidades, monografía del acetaminofén, los conceptos como validación y su importancia. En el segundo se menciona el fundamento del método desarrollado para la cuantificación del acetaminofén, así mismo el desarrollo experimental. En el tercero se aborda los resultados emanados de esta validación. Se presentan las conclusiones en el cuarto capítulo y para finalizar la bibliografía.

El presente trabajo es, una guía de validación de métodos analíticos, que hace más fácil y productivo el trabajo rutinario en un laboratorio, partiendo del hecho de que se deben cumplir con todos los atributos de confiabilidad.

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método analítico por espectroscopía visible para la cuantificación de acetaminofén en tabletas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar un método de cuantificación de los azo-compuestos, que sea fácil de realizar en el laboratorio 3D y menos costoso que otros métodos de cuantificación.
- Efectuar la validación del método analítico elaborado, evaluando los parámetros correspondientes a especificidad, linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad.
- Una vez validado el método que se desarrolló, cuantificar el acetaminofén en tabletas comerciales.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 MONOGRAFIA DE ACETAMINOFÉN

Nomenclatura

Nombre químico: Acetaminofén, p-acetamidofenol, p-acetaminofenol, N-acetil-p-aminofenol, 4'-hidroxiacetanilida, p-hidroxiacetanilida, 4-hidroxifenilacetamida, N-(4-hidroxifenil) acetamida, N-p-hidroxifenilacetamida.

Nombre genérico: Acetaminofén, Acetofenum, Paracetamol.

Nombres comerciales: Abensanil, Acamol, Acetalgin, Amadil, Anaflon, Apamide, Calpol, Cetadol, Datriil, Dirox, Eneril, Febrilix, Finimal, Gelocatil, Naprinol.

Fórmula: $C_8H_9NO_2$

Peso Molecular: 151.16 g/mol

Composición: C 63.56%, H 6.00%, N 9.27%, O 21.17%

Apariencia: Polvo cristalino, blanco, inodoro y ligeramente amargo. El acetaminofén es un ácido débil.

Propiedades Físicas

Punto de fusión: 169- 170.5°C

$pK_{a\ 25^\circ C} = 9.5$

Densidad $_{21^\circ C} = 1.293\text{g/mL}$

Solubilidad

Un gramo se disuelve en 70 partes de agua y en 20 de agua caliente, en 7-10 partes de etanol, en 13 partes de acetona, soluble en metanol, dimetilformamida, dicloruro de etileno, acetato de etilo y en disoluciones de hidróxidos alcalinos, ligeramente soluble en cloroformo 1 parte en 50 y prácticamente insoluble en éter, éter de petróleo, pentano, benceno y diclorometano. Una disolución acuosa saturada presenta un pH entre 5,1 y 6,5, a 25° C (Florey)

1. Características Farmacocinéticas

Farmacocinética y Metabolismo

Después de ingerir algún medicamento que contenga acetaminofén, este se absorbe en forma rápida y casi completa en el tubo gastrointestinal. Su concentración plasmática llega a un máximo en 40 a 60min

y la vida media en plasma es de 1 a 2 horas, después del consumo de dosis terapéuticas. El acetaminofén se distribuye de manera relativamente uniforme en casi todos los líquidos corporales.

Es variable la unión de este fármaco a proteínas plasmáticas y sólo 20 a 50% puede ligarse en las concentraciones que se detectan durante la intoxicación aguda.

Después de dosis terapéutica, en orina es posible identificar 90 a 100% del fármaco, en las primeras 24 horas después de conjugación hepática con ácido glucurónico (60% en promedio), ácido sulfúrico (35% aproximadamente) o cisteína (en promedio 3%); también se han detectado cantidades pequeñas de metabolitos hidroxilados y desacetilados. Los niños muestran menor capacidad de glucuronidación del acetaminofén que los adultos. Una proporción pequeña del fármaco muestra N-hidroxilación mediada por citocromo P450 hasta formar N-acetilbenzoquinoneimina, un producto intermediario fuertemente reactivo que reacciona en circunstancias normales con los grupos sulfhídrico del glutatión. Sin embargo, después de la ingestión de grandes dosis de acetaminofén se forma el metabolito en cantidades que agotan el glutatión hepático, en dichas circunstancias, aumenta la reacción con grupos sulfhídricos en proteínas hepáticas y pueden presentarse necrosis de hepatocitos, tal vez en parte como consecuencia de la acumulación intracelular de calcio, activación de la endonucleasa que depende de dicho ion y fragmentación resultante del ácido desoxinucleico. (Rang H.)

Los parámetros farmacocinéticos característicos son:

- ❖ Biodisponibilidad: 75-90%
- ❖ T_{medio} de eliminación: 1,5-3 horas
- ❖ $T_{\text{máxima}}$: 30-90 minutos
- ❖ aclaramiento total: 4.5-5.5 mg/kg /minuto
- ❖ volumen distribución: 1L/kg

Metabolismo excretado en orina

1-4%	Paracetamol Inalterado
Menor al 1%	3- metiltio-4-OH-acetanilida
20-30%	Conjugado Sulfato
40-60%	Conjugado Glucuronato
5-10%	3-OH-3-sulfato 3-metoxiglucuronato 3-metoxisulfato
5-10%	Conjugado cisteína y ácido mercapturínico

2.Aplicaciones Terapéuticas

La dosis oral habitual de acetaminofén es de 325 a 1 000 mg la dosis diaria total no debe rebasar los 4g. En niños, la dosis única es de 40 a 480 mg, según la edad y el peso corporal y es mejor no administrar más de cinco dosis en 24 horas. El criterio de dosis es 10 mg/Kg de peso también puede utilizarse. (Goodman)

3.Reacciones adversas

Con dosis terapéuticas, se pueden presentar efectos secundarios como mareo, vómito, diarrea y desorientación y en algunas ocasiones pueden aparecer reacciones alérgicas cutáneas. Es posible que la ingestión regular de dosis elevadas durante un período prolongado aumente el riesgo de lesión renal. La ingestión de 15g de acetaminofén puede ser fatal ya que causa una severa hepatotoxicidad con necrosis lobular central. (Goodman)

1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN

Los métodos analíticos para la determinación de acetaminofén son:

- ❖ Espectroscopia de infrarrojo
- ❖ Espectroscópicos de ultravioleta y visible
- ❖ Espectrofluorometría
- ❖ Cromatográficos
- ❖ Electroquímicos
- ❖ Titulométricos

Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo, requiere de una previa separación del analito de la forma farmacéutica, mediante sonicación y posteriormente una filtración usando una membrana de nylon de un diámetro de 0.45 μ m. El pico principal se detecta a 1515 cm^{-1} . Los solventes que se emplean son cloroformo y cloruro de metilo y los límites de detección para esta técnica se encuentran entre 14 y 8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Al emplear esta técnica no debe existir ninguna otra interferencia con fármacos como: cafeína, ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico; también se sabe que los errores al hacer la determinación del acetaminofén por espectroscopia de luz infrarroja se encuentran alrededor del 3%. (Martínez Castillo)

Espectrofotométricos

Se basan principalmente en la detección de acetaminofén, previa formación de un derivado en el rango del visible, la mayoría de los métodos se enfocan en la formación de compuestos coloridos, a través de reacciones de óxido- reducción con acetaminofén, este tipo de reacciones ofrecen la ventaja de que la determinación se vuelve específica sólo para el acetaminofén.

Este tipo de métodos trabajan con cantidades de microgramos y sus resultados en general oscilan entre 0.5 a 1.4 de desviación estándar y 99.8 a 100.8 por ciento de recobro. (Ledesma)

Espectrofluorométrico.

Para este método se realiza una previa oxidación del analito utilizando como agente oxidante al hipoclorito de sodio, para formar el fluoróforo 2,2-dihidroxi-5,5-diacetildiaminobifenil, este método se ha aplicado satisfactoriamente, obteniendo una linealidad entre 0.1 y 100 µg/mL mientras que el límite de detección es de 0.01 µg/mL tanto para el analito dentro de la forma farmacéutica como en fluidos biológicos. (Martínez Castillo)

Cromatográficos

La cromatografía de líquidos (HPLC), es una técnica, empleada para la cuantificación en forma farmacéutica acetaminofén así como de sus principales metabolitos. Para el desarrollo de esta técnica se requiere que los metabolitos del acetaminofén sean diluidos en agua y posteriormente filtrados por una membrana de 0.45µm, la detección se realiza por espectrofotometría UV a 248nm.

La cromatografía en capa fina presenta utilidad para la cuantificación de acetaminofén. Para el desarrollo de este método se realiza una extracción con una solución acuosa al 20% de metanol y posteriormente porciones de 20 mL del extracto se aplican en placas cubiertas de silica gel 60F y posteriormente se revela la placa utilizando una lámpara U.V. a 254nm. (Martínez Castillo)

Electroquímico

Se lleva a cabo la determinación del acetaminofén y sus metabolitos, el intercambio de los electrones involucrados en la oxidación de acetaminofén que se encuentra en 2.1 ± 0.1 . Con ello se observa que el producto de la oxidación es el N-acetil-p-quinoneimina, en si esta conversión de acetaminofén a N-acetil-p-quinoneimina participan dos electrones y dos protones. (Arreguin)

Titulométricos

Otro procedimiento son las titulaciones con nitrito de sodio del p-amino fenol, producto de hidrólisis del acetaminofén, utilizando un indicador visual o un potenciómetro para visualizar el punto de titulación.

Otro método volumétrico utiliza solución valorada de sulfato cérico, como titulante o la utilización del metóxido de sodio en benceno-metanol en un medio de dimetil formamida. (Arreguin)

1.3 DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN

La validación de un método analítico, es el proceso que establece estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumple los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico que deben considerarse en la validación son: especificidad, exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y tolerancia.

En el caso que resulte necesario una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación de un método analítico diferente, la síntesis del fármaco, cambio en la composición de la forma farmacéutica o una materia prima. (USP 30)

1.4 REVISIÓN DE LA NORMA NOM-059-SSA1-2006

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SSA1-2006, BUENAS PRACTICAS DE FABRICACIÓN PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO FARMACÉUTICA DEDICADOS A LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS.

Validación, es la evidencia documentada que se demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto o un proceso, o un método analítico que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas.

Los procesos para productos deben ser validados en base a protocolos que tomen en cuenta los siguientes aspectos:

1. El personal responsable de la fabricación y control de los medicamentos, incluyendo personal temporal, debe estar calificado, con base en su experiencia, formación o capacitación, para la función que desempeña. La calificación debe estar documentada.
2. Debe existir un plan para definir los requerimientos de los productos, los procesos, los sistemas críticos y servicios y el alcance de la instalación.
3. La documentación de la validación debe estar completa, ordenada y disponible.
4. Debe existir un sistema de control de cambios que regule las modificaciones que puedan afectar la calidad del producto y/o la reproducibilidad del proceso, método o sistema.
5. Los procesos deben ser objeto de revalidación en base a políticas que establezca la empresa para garantizar que siguen siendo capaces de proporcionar los resultados previstos.
6. Los métodos analíticos deben ser validados.

Control del laboratorio analítico.

1. Contar con especificaciones escritas para evaluar cada lote de materia prima, producto a granel y producto terminado.
2. Se debe contar con procedimientos para el muestreo de insumos, producto a granel, producto en proceso y producto terminado.
3. Se debe contar con métodos de análisis validados de acuerdo a esta Norma Oficial Mexicana.
4. Se debe contar con un programa de calibración de instrumentos de medición.
5. Deben conservarse muestras de retención representativas de cada lote de producto, así como de cada uno de los materiales involucrados en la fabricación de éste. El tiempo de retención debe ser de cuando menos 1 año después de su fecha de caducidad.
6. Deben existir PNO's para la limpieza, mantenimiento y operación de cada uno de los instrumentos y equipos del laboratorio analítico que contemplen los registros correspondientes.
7. Los reactivos deben prepararse de acuerdo con la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y suplementos vigentes.
8. La etiqueta de los reactivos debe indicar como mínimo: nombre, fecha de preparación, nombre de quien lo preparó, referencia de su registro, concentración, factor de valoración, caducidad, condiciones de almacenamiento, fecha de revaloración y fecha de recepción cuando se compren preparados.
9. Las sustancias de referencias primarias y secundarias deben fecharse, almacenarse, manejarse y utilizarse de manera que no se afecte su calidad

La validación de un método analítico debe de cumplir con los parámetros establecidos con la guía de validación con las siguientes características: la linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y/o repetibilidad y especificidad.

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

La exactitud de un método analítico, es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

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

Reproducibilidad, es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes: diferentes analistas, en diferentes días, en los mismos y/o diferentes laboratorios utilizando los mismos y/o diferentes equipos.

Repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de analista, tiempo, aparato, laboratorio.

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

Estabilidad, es la propiedad de un medicamento contenido en un envase de determinado material para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas entre los límites especificados.

1.5 CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En función de su estado de regulación.

- ❖ Métodos Compéndiales Farmacopéicos: Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP)
- ❖ Métodos no Farmacopéicos: Aquellos métodos que no aparecen publicados en este tipo de compendios.

En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 y NOM-073-SSA1)

- ❖ Método para producto a granel
- ❖ Método para producto terminado
- ❖ Método para materia prima
- ❖ Método indicador de estabilidad

En función de su propósito analítico

- ❖ Método para cuantificar el analito (contenido y potencia)
- ❖ Método para establecer la presencia del analito a un límite
- ❖ Método para identificar el analito.

En función de la naturaleza de la respuesta analítica

- ❖ Método físico químico, cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz y voltaje) o químico (consumo de iones)
- ❖ Método biológico, cuando la respuesta es de carácter biológico (Crecimiento microbiano, inhibición, etc.)

1.6 PLANIFICACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

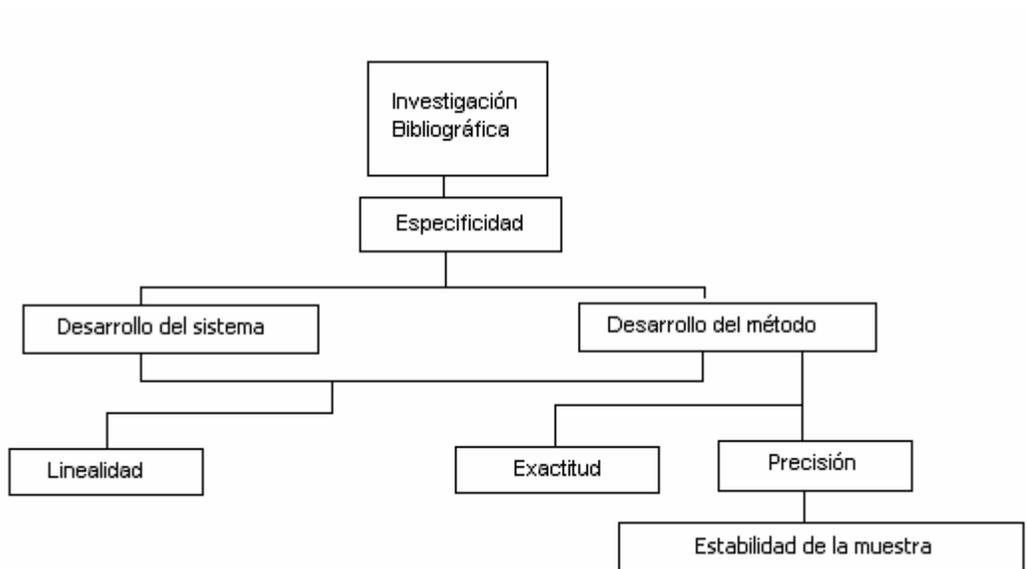


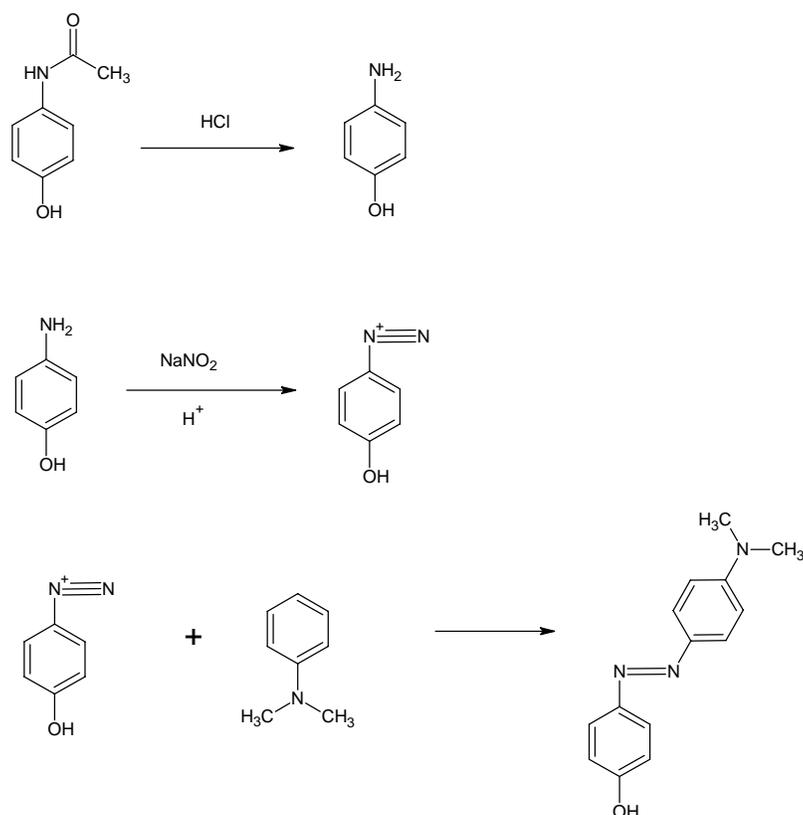
Diagrama de trabajo de validación de un método analítico para determinar acetaminofén en tabletas de 500mg

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO DESARROLLADO PARA CUANTIFICAR, ACETAMINOFÉN.

La metodología analítica para la determinación de acetaminofén en tabletas de 500mg, consta de los siguientes pasos: Hidrólisis del acetaminofén, obtención del azo-compuesto correspondiente, con ácido nitroso, obtenido en situ a partir de nitrito de sodio y ácido clorhídrico, y la copulación de éste compuesto, con la N,N-dimetilanilina



Se pesa con exactitud, 25 mg de acetaminofén y se diluye para obtener una concentración 1µg/mL para luego tomar una alícuota de 355 µL y colocarla en un vaso de precipitado de 100 mL, se adiciona 5 mL de agua destilada, 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, se homogeniza la disolución para luego llevar a un baño maría durante 40 min, en ebullición, manteniendo el volumen de la disolución con agua destilada.

Se coloca la disolución en baño de hielo y después de llegar a una temperatura de 3°C, se realiza la diazoación adicionando 80 µL de nitrito de sodio al 20%. La disolución tiene un pH ácido por lo cual se adiciona lentamente hidróxido de sodio al 10% hasta llegar a un pH de 10. Se añade 12.8 µL N-N-dimetilanilina, se transfiere a un matraz aforado de 10 mL. La copulación de la sal de diazonio con fenoles y aminas aromáticas genera azo-compuestos. La obtención de un colorante diazonico.

2.2 MATERIAL

Matraces volumétricos de 100 mL
Matraces volumétricos de 50 mL
Matraces volumétricos de 25 mL
Matraces volumétricos de 10 mL
Vasos de precipitado de 250 mL
Vasos de precipitado de 100 mL
Vasos de precipitado de 50 mL
Espátula de Níquel
Micropipeta 100-1000 µL Wigggen Hauser
Micropipeta 0-200 µL Pipetman- Gilson
Celdas de plástico
Embudos de filtración
Frascos de 45 mL
Mortero y pistilo de porcelana
Naves
Papel filtro Whatman No 40
Pipeta Pasteur
Pizeta
Anillo metálico
Soporte universal
Termómetro

EQUIPO:

Balanza analítica marca Sartorius modelo BP210S con una capacidad máxima de 210g, d = 0.1 mg, Espectrofotómetro HITACHI PERKIN-ELMER Coleman 139 UV-VIS con celdas de plástico, de 1 cm de paso óptico

Refrigerador con temperatura controlada

REACTIVOS:

Acido Clorhídrico concentrado

N-N- Dimetilanilina

Disolución de Hidróxido al sodio 10 %

Disolución de Nitrito de sodio al 20 %

Agua destilada

Referencia de acetaminofén pureza 90%

Excipientes:

Avicel PH 102

Kollidon VA 64

Kollidon CL

Estearato de Magnesio USP

Aerosyl 200

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Es necesario conocer la longitud de onda de máxima absorción de la sustancia de referencia del acetaminofén, obtenida de la condensación del azo-compuesto, para lo cual se realizó un barrido espectrofotométrico de una disolución estándar del derivado azoico del acetaminofén, preparada a una concentración equivalente a 32 µg/mL de acetaminofén.

Después de la preparación del complejo colorido, se determinó la absorbancia de este derivado, utilizando un espectrofotómetro Uv-visible, HITACHI PERKIN-ELMER modelo Coleman 139 y celdas de plástico de un centímetro de paso óptico, el blanco a utilizar fue de agua destilada y el intervalo del visible.

La longitud de onda de máxima absorción del compuesto de copulación experimental, fue de 430 nm a temperatura ambiente* y utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico.

Para pesar las muestras se utilizó una balanza analítica marca Sartorius de máxima capacidad de 210 g d = 0.1 mg y para la toma de las alícuotas, se utilizaron micropipeta de 100-1000 µL Wiggan-Hauser y de 0-200 µL Pipetman-Wilson.

*Temperatura ambiente: A menos que se indique algo diferente, todas las temperaturas en el laboratorio son a temperatura ambiente por lo cual se realizaron a 25° C (USP 30)

METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

2.3 ESPECIFICIDAD

Se debe realizar un barrido espectrofotómetro en un intervalo de 350 a 500 nm de las disoluciones siguientes:

- ❖ Disolución de la referencia de acetaminofén a una concentración equivalente de 32µg/mL
- ❖ Disolución de la muestra de placebo cargado con acetaminofén a una concentración equivalente de 32µg/mL
- ❖ Disolución de la cantidad de placebo equivalente a 32µg/mL.

A todas estas disoluciones se les realizó el mismo procedimiento diazoación y copulación

Cálculo para la preparación de la disolución de la muestra de referencia de acetaminofén con una concentración 32 µg/mL, se pesan 25 mg de acetaminofén al 90% de pureza y se disuelve en 25 mL de agua destilada y se homogeniza la disolución para luego tomar una alícuota de 355 µL y se realizar la hidrólisis, para luego llevar a cabo la diazoación y por último la copulación del acetaminofén.

$$\frac{25 \text{ mg de estándar}}{25 \text{ mL}} * \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} * \frac{90\%}{100\%} * \frac{0.355 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} = 32 \mu\text{g/mL}$$

El placebo adicionado con acetaminofén contiene por cada 10 g:

Referencia de acetaminofén	7.14 g
Avicel PH 102	1.96 g
Kollidon VA 64	0.5 g
Kollidon CL	0.3 g
Estearato de magnesio	0.04 g
Aerosyl 200	0.06 g

Preparación de la disolución de la muestra de placebo adicionado con acetaminofén a una concentración de 32 µg/mL. Se pesa la cantidad de placebo equivalente a 25 mg de acetaminofén, se homogeniza con un poco de agua destilada, transfiere a un matraz volumétrico de 25 mL, se afora y homogeniza perfectamente, se filtra la disolución. Para luego tomar una alícuota de 355 µL y realizar la diazoación y copulación correspondiente.

Preparación de la disolución de la muestra del placebo, la cual contiene todos los excipientes excepto el acetaminofén. Pesar una cantidad de la formulación semejante a la anterior, se transfiere a un matraz volumétrico de 25 mL, aforar con agua destilada, homogenizar y filtrar. Se toma una alícuota de 355 µL, se realiza la diazoación y copulación.

Utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y cada una de las disoluciones anteriores y un blanco de referencia de agua destilada, se realizó el barrido espectroscópico en un ámbito de longitud de onda de 350 a 500nm.

2.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para la realización de la linealidad del sistema, se prepararon tres masas originales diferentes, cinco niveles de concentración: 44.8, 38.4, 32.0, 25.6, 19.2 µg/mL, equivalentes al 140, 120, 100, 80, 60 %.

Se pesó por triplicado y exactitud, 25 mg de muestra de referencia de acetaminofén, se disolvieron y se llevaron a un aforo de 25 mL. Se tomaron, alícuotas de 498, 427, 355, 285, 214 µL, correspondientes a las concentraciones ya mencionadas, se realizó la hidrólisis, la diazoación y por último la copulación de cada una de estas disoluciones en matraces aforados de 10 mL, se aforan con agua destilada y se homogenizaran perfectamente, se realizaron las lecturas de las absorbancias que presentan las muestras obtenidas, a una longitud de onda de

430 nm, utilizando una celda de plástico de paso óptico y utilizando como blanco, agua destilada.

Cálculo de la disolución de acetaminofén cuya concentración es de 19.2 µg/mL.

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} * \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} * \frac{0.214 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{90 \%}{100 \%} = 19.2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

Cálculo de la concentración porcentual, considerando a 32 µg/mL como el 100%

$$\frac{19.2 \mu\text{g/mL}}{32 \mu\text{g/mL}} * 100 \% = 60 \%$$

Matraz	Volumen de µL de la disolución de 1mg/mL de acetaminofén	Concentración en %
1	498	140
2	427	120
3	355	100
4	285	80
5	214	60

2.5 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Para la realización de este parámetro, se prepararon por sextuplicado y a partir de una disolución de concentración equivalente a 1mg/mL de acetaminofén, tomándose alícuotas de 355 µL que represente el 100 % equivalente a 32 µg/mL. Se realizó la diazoación y copulación de las muestras, se trasvasa a un matraz aforado de 10 mL, se afora con agua destilada y se homogeniza perfectamente. Se lee la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 430 nm, utilizando una celda de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco de referencia, agua destilada.

Cálculo de la concentración de la disolución equivalentes a de 32 µg/mL de acetaminofén.

$$\frac{25 \text{ mg del estándar}}{25 \text{ mL}} * \frac{1000 \mu\text{g}}{\text{mg}} * \frac{0.355 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{90 \%}{100 \%} = 32 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

2.6 LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Para realizar la linealidad del método, primero se tiene que formular, preparando al placebo con todos los componentes, después realizar la técnica por triplicado en cinco niveles.

La preparación del placebo analítico es con: Avicel PH 102 1.96 g, Kollidon VA 64 0.5 g, Kollidon CL 0.3 g, Estearato de Magnesio 0.04 g y aerosyl 200 0.06 g.

Ya preparada la muestra, se pesan cantidades equivalentes a los cinco niveles siguientes: 60, 80, 100, 120 y 140 % respectivamente, que corresponde a las siguientes concentraciones: 19.2, 25.6, 32.0, 38.5 y 45 µg/mL de acetaminofén. Se filtran las disoluciones con papel filtro Whatman No 40 para luego llevar a cabo la diazoación y copulación del compuesto y se llevan a un volumen de 10 mL con agua destilada y se homogenizaron perfectamente. Se leyó la absorbancia que presentaron utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco una disolución de placebo sin el principio activo, a una longitud de onda de 430 nm.

2.7 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Para realizar la exactitud y repetibilidad del método, se prepararon por sextuplicado, disoluciones de concentración de 32 µg/mL que corresponde al 100%. Estas disoluciones se prepararon al pesar el equivalente a 25 mg más 100 mg del placebo, los cuales se disolvieron y se llevaron a un aforo de 25 mL, se filtró las disoluciones para tomar una alícuota de 355 µL a la cual se practicó la diazoación y copulación respectivamente, se transfirió a un matraz aforado de 10 mL y se aforó a la marca con agua destilada y se homogeniza perfectamente. También se preparó una disolución del placebo para la cual se pesaron 100 mg del placebo sin estándar de acetaminofén y se realizó el mismo procedimiento anterior. Todas las disoluciones se leyeron la absorbancia que presentaron utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco una disolución de placebo sin el principio activo tratado en la misma forma, a una longitud de onda de 430 nm.

Cálculo:

$$\frac{25 \text{ mg del estándar}}{25 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ } \mu\text{g}}{\text{mg}} * \frac{0.355 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{90 \%}{100 \%} = 32 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

2.8 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se analizara por triplicado una muestra equivalente al 100 % que corresponde a una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ de acetaminofén, en dos días y por dos analistas diferentes con los mismos reactivos e instrumentos.

La preparación de la disolución se realizó, pesando 35 mg de la formulación, equivalente a 25 mg de acetaminofén, se homogenizó y se trasvasaron a un matraz aforado de 25 mL, se filtraron las disoluciones y se tomó una alícuota de 355 μL los cuales se colocaron en un vaso de precipitado de 50 mL, se agregaron 5 mL de agua destilada y 1 mL de ácido clorhídrico, se deja en un baño maría durante 40 min cuidando que el volumen de la disolución permanezca constante, agregando agua destilada, después se colocaron en un recipiente con hielo hasta alcanzar una temperatura de 3 °C y se adicionaron 80 μL de nitrito de sodio al 20 %. A esta disolución se le mide el pH y se agrega hidróxido de sodio hasta obtener un pH de 10, se agrega 12.8 μL de N-N- dimetilnilina, se transfirió a un matraz aforado de 10 mL y se afora a la marca con agua destiladas.

Todas las disoluciones se leyeron las absorbancia, utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco una disolución de placebo sin el principio activo tratado en la misma forma, a una longitud de onda de 430 nm.

2.9 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Se preparó por triplicado una disolución equivalente a una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$, se pesaron el equivalente a 35 mg del placebo adicionado con acetaminofén, se homogenizó y se transvasaron a un matraz aforado de 25 mL, se filtró la disolución y se tomaron alícuotas de 887. μL para luego realizar la diazoación y copulación. Después se trasvasaron a un matraz aforado de 25 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Esta disolución se fraccionó en 9 frascos para someterlos a la prueba de estabilidad: las primeras tres fracciones se

almacenan en el refrigerador, las siguientes tres se almacenan a temperatura ambiente sin exponerlos a la luz y las últimos tres, se exponen a la luz blanca y a temperatura ambiente.

Después de haber obtenido el azo-compuesto, el almacenamiento al que fue sometido las frascos fue a: 0, 24, 48 y 72 horas, se midieron las absorbancias que presentan cada una de las disoluciones, utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco se utiliza una disolución de placebo sin el principio activo, tratado en la misma forma, a una longitud de onda de 430 nm.

Frasco	Temperatura	Exposición a la luz	Tiempo de almacenamiento
1	4°C	En la oscuridad	24h
2	4°C	En la oscuridad	48h
3	4°C	En la oscuridad	72h
4	Ambiente	En la oscuridad	24h
5	Ambiente	En la oscuridad	48h
6	Ambiente	En la oscuridad	72h
7	Ambiente	Con Luz	24h
8	Ambiente	Con Luz	48h
9	Ambiente	Con Luz	72h

2.10 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR ACETAMINOFÉN EN TABLETAS.

Preparación de la disolución de referencia. Se disuelven 25 mg de Acetaminofén en agua destilada y se lleva a un aforo de 25 mL, de esta disolución se tomó una alícuota de 355 μ L, para colocarla en un recipiente adecuado para realizar la diazoación y copulación. Después de obtener el azo-compuesto, la disolución se coloca en un matraz aforado de 10 mL y se afora a la marca de aforo con agua destilada y se homogenizó perfectamente. La concentración de esta disolución es equivalente a 32 μ g/mL de acetaminofén.

Preparación de la disolución de la muestra.

Pesar con exactitud, no menos de 20 tabletas y calcular su peso promedio, colocarlas en un mortero de porcelana y triturar hasta obtener un polvo fino transferirlo a un recipiente perfectamente etiquetado y colocarlo dentro de un desecador. Se pesa con exactitud, la muestra equivalente a 25 mg de acetaminofén, utilizando un vaso de precipitados, se disuelve perfectamente y se coloca la disolución en un matraz aforado de 25 mL, aforando a la marca con agua destilada, se homogeniza perfectamente, y se filtra a través de papel Whatman No. 40, desechando los primeros 2 mL del filtrado, se toma una alícuota de 355 µL, los cuales se colocan en un matraz aforado de 10 mL y se les realizó la diazoación y copulación, se afora a la marca con agua destilada y se homogeniza perfectamente. La concentración de esta disolución es de 32 µg/mL.

Se lee la absorbancia de las muestras, en un espectrofotómetro HITACHI PERKIN-ELMER COLEMAN 139 a una longitud de onda de 430 nm, utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico y como blanco una disolución de placebo sin el principio activo tratado en la misma forma.

Cálculos para obtener el contenido de acetaminofén por tableta:

$$\frac{A_m * P_r * \text{Pureza}}{A_r * 25 \text{ mL} * 100\%} * \frac{0.355 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{10 \text{ mL}}{0.355 \text{ mL}} * \frac{25 \text{ mL}}{P_m} * P_p = C \frac{\text{mg}}{\text{Tabletas}}$$

Donde:

A_m : Absorbancia de la disolución de la muestra.

A_r : Absorbancia de la disolución de referencia.

Pureza: Pureza de la referencia.

P_r : Peso en miligramos de la referencia de acetaminofén.

P_m : Peso de la muestra en miligramos.

P_p : Peso promedio de la muestra en miligramos por tableta.

C: Cantidad de acetaminofén por tableta reportado en el marbete en miligramos.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN

El barrido espectrofotómetro de una disolución de referencia del derivado azoico del acetaminofén a una concentración de $32\mu\text{g/mL}$, Nos ayuda a determinar una longitud de onda a la cual se trabajara durante toda la determinación, para así obtener un buen método de cuantificación.

En la figura siguiente, se muestra el espectro de absorción obtenido y a partir de él, se seleccionó la longitud de onda a la que se trabajo que fue de 430 nm.

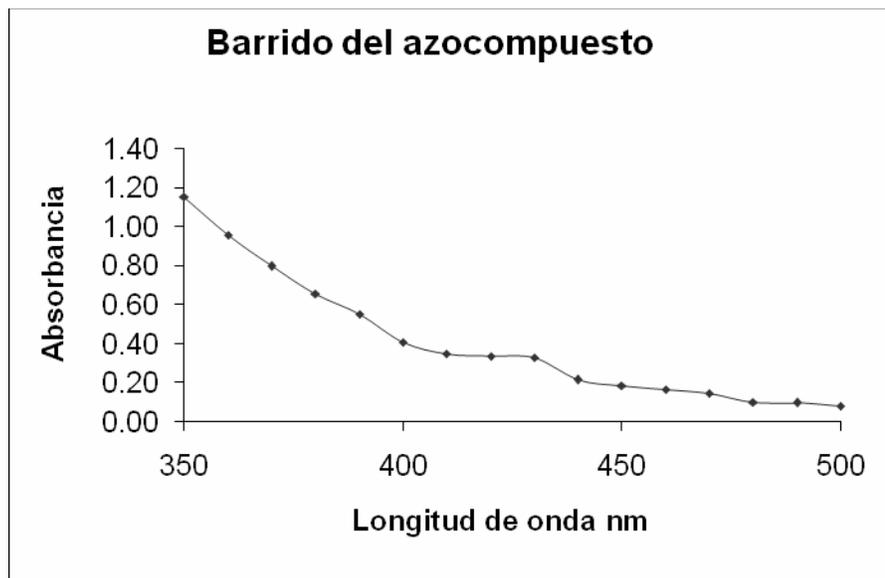


Figura No.1 Espectro de absorción del derivado azoico del acetaminofén. La longitud de onda de máxima absorción experimental seleccionada es de 430nm a una temperatura ambiente.

PARÁMETROS DEL SISTEMA

3.1 ESPECIFICIDAD

En la tabla No 1 se observa la absorbancia de las sustancias de placebo sin acetaminofén, referencia de acetaminofén y placebo con acetaminofén a las longitudes de onda de 350 a 500nm utilizando celdas de plástico de 1 cm de paso óptico.

Longitud de onda	Absorbancia		
	Placebo sin acetaminofén	Referencia de acetaminofén	Placebo con acetaminofén
350	0.2596	1.1549	1.2218
360	0.2441	0.9586	1.0000
370	0.2366	0.7959	0.8861
380	0.2218	0.6576	0.7447
390	0.1612	0.5528	0.6198
400	0.1549	0.4089	0.4685
410	0.1249	0.3468	0.3980
420	0.1135	0.3372	0.4202
430	0.1023	0.3279	0.4559
440	0.0969	0.2147	0.3010
450	0.0915	0.1871	0.2596
460	0.0915	0.1675	0.2365
470	0.0862	0.1487	0.1549
480	0.0706	0.1024	0.1135
490	0.0605	0.0969	0.1023
500	0.0605	0.0809	0.1023

Tabla No. 1 Datos obtenidos del barrido en la zona de 350 a 500 nm para disoluciones de placebo sin acetaminofén, referencia del acetaminofén y placebo cargado con acetaminofén

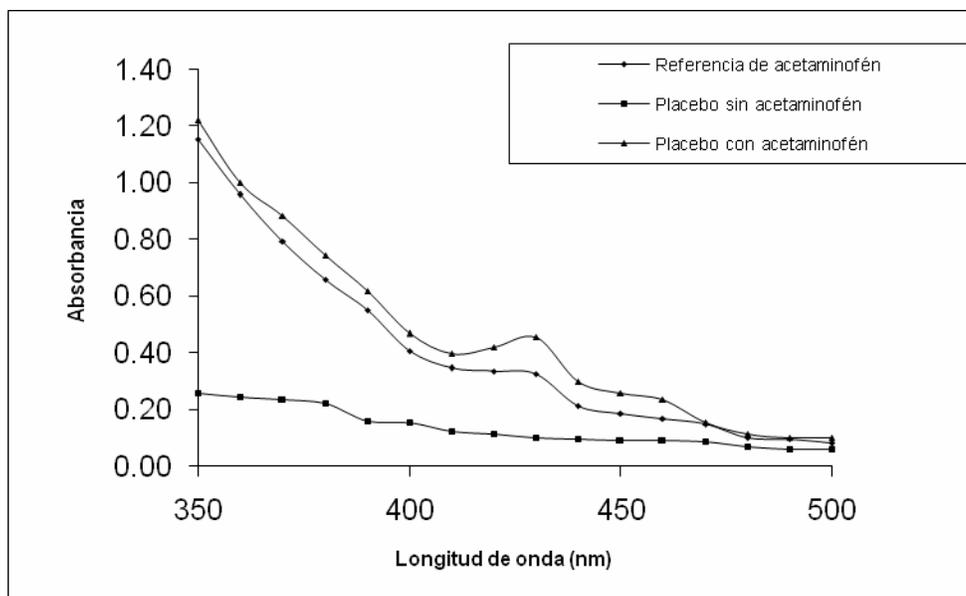


Figura No 2 Gráfico de absorción del placebo sin acetaminofén, referencia de acetaminofén y placebo con acetaminofén.

Discusión de la especificidad

En este parámetro es necesario establecer que no exista ninguna posibilidad, de que alguno de los componentes del excipiente diferente al acetaminofén, interfiera durante la determinación cualitativa y cuantitativa propuesta en este trabajo experimental y que sólo se obtenga respuesta, cuando el analito se encuentre bajo las mismas condiciones de análisis de reacción, en este caso como azo-compuesto.

En la figura número 2 se puede observar que cuando se hace reaccionar el placebo en ausencia de acetaminofén con nitrito de sodio en presencia del ácido clorhídrico y con la N,N-dimetilanilina, no se forma el azo-compuesto, por lo cual, el placebo no interfiere con la determinación del acetaminofén, debido a que no absorbe en el ámbito de longitudes de onda de trabajo.

En esta figura No 2, también se observa que los espectros de absorción de los azo derivados obtenidos a partir del la mezcla del placebo con acetaminofén y la referencia de acetaminofén se tiene el mismo comportamiento, por lo tanto ambos espectros son semejantes.

Con base a estos espectros se volvió a seleccionar la longitud de onda de trabajo a 430nm para llevar a cabo la validación del método propuesto y se demuestra que no se tendrá ningún problema con los excipientes de la formulación los cuales son: avicel PH 102, Kollidon VA 64, Kollidon CL, estearato de magnesio USP o aerosil 200.

3.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

En la tabla No 2 se muestran los resultados de las pruebas realizadas para la determinación de la linealidad del sistema de las disoluciones del compuesto ya terminada la diazoación y copulado con N,N-dimetilanilina, leída la absorbancia del producto de copulación a una longitud de onda de 430 nm utilizando celdas de plástico, correspondientes a las concentraciones de acetaminofén de 60, 80, 100, 120 y 140 %:

Muestra	X Concentración %	Y absorbancia	XY
1	60	0.1487	8.92
2	60	0.1487	8.92
3	60	0.1487	8.92
1	80	0.2366	18.93
2	80	0.2291	18.33
3	80	0.2291	18.33
1	100	0.3279	32.79
2	100	0.3279	32.79
3	100	0.3279	32.79
1	120	0.4559	54.71
2	120	0.4559	54.71
3	120	0.4685	56.22
1	140	0.5850	81.90
2	140	0.5850	81.90
3	140	0.5686	79.60

Tabla No 2 Datos obtenidos para la linealidad del sistema.

En la tabla No. 3 se presentan los valores calculados de la pendiente, ordenada al origen coeficiente de determinación e intervalo de confianza para la pendiente en la gráfica No. 3.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor Calculado
Pendiente (b_1)		0.00553
Ordenad a al origen (b_0)		-0.1955
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9954
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)	$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	0.0051,0.0060

Tabla No 3 Criterios de aceptación para la Linealidad del sistema

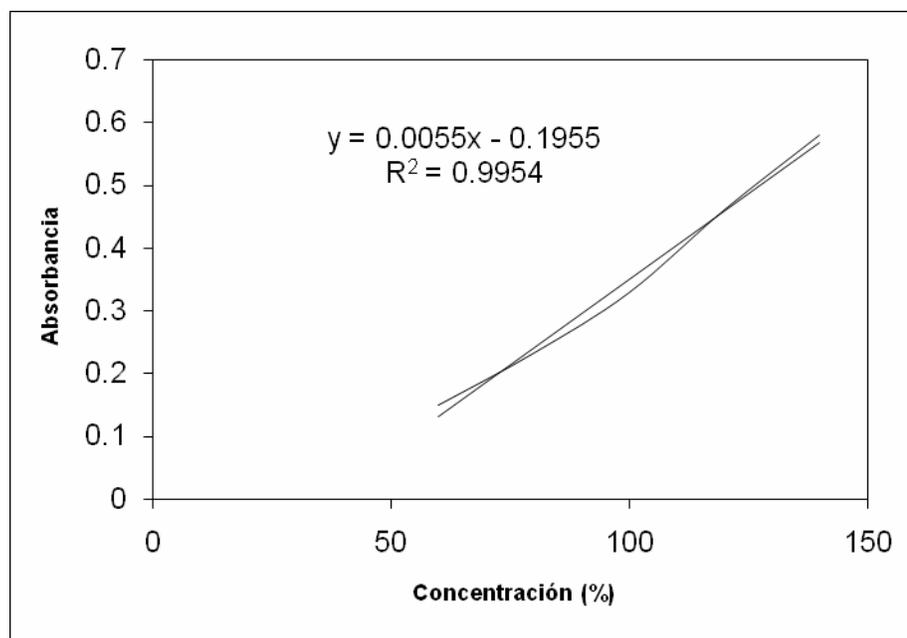


Figura No 3 Gráfica obtenida para la linealidad del sistema: absorbancia en función de la concentración.

La finalidad de realizar este parámetro, es observar la existencia de la relación lineal entre la concentración del analito, es este caso el azo-compuesto y su respuesta analítica o absorbancia, lo anterior se evaluó estadísticamente.

En la figura No. 3 se observa la existencia de la relación directamente proporcional entre las dos variables, absorbancia, concentración, comprobando que el método cumple con la ley de Lambert y Beer ya que los valores obtenidos de la regresión muestran, que el intervalo del coeficiente de determinación se encuentra dentro de las especificaciones requeridas $r^2 \geq 0.98$. Por lo tanto se dice que el método analítico estudiado cumple con la linealidad del sistema.

3.3 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Después de llevar a cabo la diazoación y copulación de las muestras se leyó la absorbancia que presentaban a una longitud de onda de 430 nm, utilizando una celda de plástico de paso óptico y como blanco, agua destilada

La tabla No 4 muestra los resultados obtenidos durante el estudio de la precisión del sistema, a partir de la disolución del producto obtenido durante la diazoación y copulación del acetaminofén, que representa una concentración del 100%, equivalente a 32 µg/mL.

Muestra	Concentración en %	Absorbancia
1	100	0.3279
2	100	0.3279
3	100	0.3188
4	100	0.3279
5	100	0.3279
6	100	0.3279

Tabla No 4 Resultados obtenidos para el estudio de la precisión del sistema.

Parámetros	Criterios de aceptación	Valor calculado
N = 6		
\bar{y}		0.3264
S		0.0037
CV	$CV \leq 1.5$	1.13%

Tabla No 5 Criterios de aceptación para determinar la precisión del sistema

La precisión del sistema se determinó por sextuplicado y de los resultados obtenidos, se calcula la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación obteniéndose una precisión del sistema dentro del criterio de aceptación. Se considera un sistema con precisión ya que el intervalo máximo de variabilidad es de 1.5% para métodos físicos – químicos lo cual cumple con este parámetro ya que el valor obtenido es de 1.13%

Por lo que se puede observar, los parámetros discutidos de, especificidad, linealidad y precisión del sistema, cumplen los criterios de aceptación que se fijaron, por lo cual se procede a evaluar los parámetros del método, siguiendo las reacciones para obtener el azo-compuesto a partir del acetaminofén.

3.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En la tabla No 6 se presenta los resultados obtenidos experimentalmente con cinco concentraciones que van de 60 a 140% y se leyó a una longitud de onda de 430nm

Muestra	Concentración %	absorbancia	X (mg)	Y (mg)	% de recobro (y)
1	60	0.2757	15.1	14.7	97.4
2	60	0.2757	15.1	14.7	97.4
3	60	0.2757	15.1	14.7	97.4
1	80	0.3767	20.9	20.1	96.2
2	80	0.3767	20.9	20.1	96.2
3	80	0.3767	20.8	20.1	96.2
1	100	0.4559	25.0	24.3	97.2
2	100	0.4559	25.0	24.3	97.2
3	100	0.4559	25.0	24.3	97.2
1	120	0.5528	30.0	29.5	98.3
2	120	0.5528	30.0	29.5	98.3
3	120	0.5528	30.0	29.5	98.3
1	140	0.6575	35.3	35.1	99.4
2	140	0.6575	35.3	35.1	99.4
3	140	0.6575	35.3	35.1	99.4

Tabla No 6 Resultados de la linealidad del método.

Resultados de linealidad del método (parámetros calculados) y el criterio de aceptación:

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor experimental
Pendiente (b_1)		1.0131
Ordenada al origen (b_0)		-0.8437
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9993
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)	$IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad	0.9973, 1.0289
Intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$)	Debe de incluir el cero	-6.8179, 5.1304
Coefficiente de variación $CV_{y/x}$	No debe ser mayor de 3%	0.80%

Tabla No 7 Criterios de aceptación de la linealidad del método.

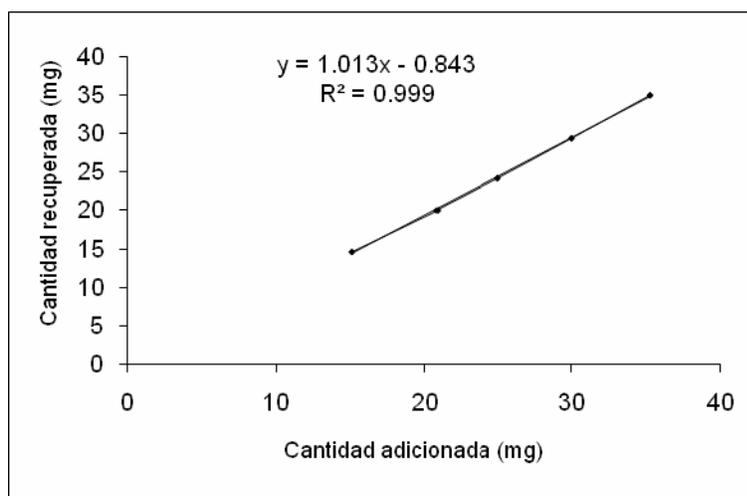


Figura No16 de la linealidad del método.

(Cantidad adicionada mg vs Cantidad recuperada mg)

Se miden la absorbancia de las muestras finales frente a un blanco de medio de disolución (agua destilada) y los datos (concentración y absorbancia). Se realizan un análisis estadístico el cual se aplicó la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Se considera que el método es lineal si el coeficiente de determinación entre las dos variables es mayor o igual a 0.98 y este punto se

cumplió, en tanto la pendiente y el intervalo de confianza para la pendiente no incluyen el cero ya que en caso de incluir el cero quiere decir que no habría recta.

Resultados del porcentaje de recobro:

Parámetros	Criterios de aceptación	Valor calculado
Media \bar{y}		97.7
Desviación estándar S		1.0846
Coefficiente de variación CV	No mayor al 3%	1.1%
Intervalo de confianza para media poblacional (IC(μ))	Debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103%	97.13, 98.33

Tabla No 8 de los resultados del porcentaje de recobro.

De acuerdo con los resultados obtenidos se verifica que todos los criterios son aceptables ya que el coeficiente de variación es menor al 3% y un aspecto importante también es el intervalo de confianza para media poblacional ya que el promedio del recobro se encuentra dentro de este parámetro.

Por consecuencia se determina que el método es lineal ya que la relación entre las cantidades adicionadas del analito y las cantidades recuperadas de éste corresponde a una función lineal, por otra parte el porcentaje de recobro también cumple los criterios de aceptación.

3.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Tabla No 9 Son los resultados del parámetro:

Muestra	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de recobro (y)
1	25	24.74	98.96
2	25	24.74	98.96
3	25	24.60	98.40
4	25	24.74	98.96
5	25	24.74	98.96
6	25	24.80	99.20

La siguiente tabla No 10 contiene los criterios de aceptación para este parámetro.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
Media (\bar{y})		98.91
Desviación estándar (S)		0.2661
Coefficiente de variación (CV)	No mayor de 3%	0.3%
Intervalo de confianza para media poblacional (IC(μ))	Debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103%	98.63, 99.19

Para determinar este parámetro, se trabajo la muestra por sextuplicado adicionada de una concentración conocida del estándar de acetaminofén, la concentración total que corresponde al 100%. En este punto se calculó el porcentaje de recobro, los datos figuran en la tabla 10. La media aritmética se encuentra en 98.91 es decir se encuentra dentro del criterio de aceptación (98.63-99.19) así como también el coeficiente de variación cumple con lo establecido, ya que es menor al 3%.

3.6 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Los datos obtenidos son resultado de dos días diferentes y por dos analistas diferentes a una concentración al 100%.

Día	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	
	Analista 1	Analista 2
1	32.50	32.00
	32.50	32.00
	31.90	32.50
2	32.00	32.00
	32.50	32.00
	32.00	32.50

Tabla No 11 Precisión del método.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
\bar{y}		32.2
S		0.2663
CV	$CV \leq 3\%$	0.8%

Tabla No 12 Criterios de aceptación de precisión del método

El fin de este parámetro es determinar, si el método tiene alguna variabilidad entre analistas y variabilidad entre días ya que se analizó 6 veces por dos analistas y bajo las mismas condiciones de trabajo, para luego realizar otro día de nuevo el mismo trabajo. Utilizando la misma sustancia de referencia y el mismo equipo.

Los resultados correspondientes se encuentran en la tabla No 12, la desviación estándar y el coeficiente de variación es menor al 3%, por lo cual se cumple con el criterio de aceptación establecido para este parámetro en la validación del método analítico espectrofotométrico.

3.7 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

En las siguientes tablas No13-15 se muestran los resultados del parámetro de estabilidad por lo cual se realizó una disolución de referencia recién preparada, cada vez que se requería leer las muestras a las cero horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas a esto se les calculó el porcentaje de recobro de cada muestra.

Muestra	Tiempo inicial(y_0)	% recobro		
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)	72 horas (y_3)
1	98.33	96.93	96.93	95.83
2	98.33	96.93	96.93	95.83
3	98.33	96.93	96.93	95.83
4	98.33	101.42	103.15	106.35
5	98.33	101.42	103.15	106.35
6	98.33	101.42	103.15	106.35

Tabla No 13 Resultados del parámetro de estabilidad, en condiciones de almacenamiento en oscuridad.

Muestra	% recobro			
	Tiempo inicial(y_0)	24 horas (y_1)	48 horas (y_2)	72 horas (y_3)
1	98.33	96.93	96.93	95.83
2	98.33	96.93	96.93	95.83
3	98.33	96.93	96.93	95.83

Tabla No 14 Resultados del parámetro de estabilidad, realizado en condiciones de almacenamiento a refrigeración a 3°C)

Muestra	% recobro inicial (y_0)	Tiempo de almacenamiento		
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)	72 horas (y_3)
1	98.33	103.15	106.35	109.48
2	98.33	103.15	106.35	109.48
3	98.33	103.15	106.35	109.48

Tabla No15 Resultados del parámetro de estabilidad, realizado en condiciones de almacenamiento expuesto a la luz a temperatura ambiente

En la tabla No16 se encuentra los criterios de aceptación y los valores calculados de los resultados experimentales.

Condición de almacenamiento	Criterio de aceptación $ d_i $	Valor calculado de $ d_1 $	Valor calculado de $ d_2 $	Valor calculado de $ d_3 $
Oscuridad	$ d_i \leq 3\%$	3.0%	4.8%	8.0%
Refrigeración 3°C	$ d_i \leq 3\%$	1.4%	1.4%	2.5%
Exposición a la luz	$ d_i \leq 3\%$	4.8%	8.0%	11.15%

Tabla No16 Son los criterios de aceptación del parámetro de estabilidad junto con los valores calculados.

En la tabla No 16 se muestran el parámetro de estabilidad obtenidos de la disolución de acetaminofén en refrigeración, lo que demuestra, que es factible almacenar la muestra en estas condiciones, ya que se encuentra dentro del criterio de aceptación el cual es menor al 3%, para los tres diferentes lapsos de tiempo, 24, 48 y 72 horas.

Con respecto al almacenar con exposición a la luz y a temperatura ambiente al igual que la condición de oscuridad, el aumento en el porcentaje de recobro desde las 24 horas indica que hay descomposición del azo-compuesto por lo cual son condiciones no favorables para el principio activo. La manera idónea para el almacenamiento es a refrigeración a 3°C, no más de 72 horas.

3.8 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Tabla No27 Resultados de la validación del método adecuado para determinar Acetaminofén en tabletas.

Parámetro	Criterio de aceptación	Valor calculado		
Especificidad	Cumple	Cumple		
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	0.997		
	IC (β_1 no debe incluir el cero)	0.0051, 0.0060		
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5\%$	1.13 %		
Linealidad del método	Cantidad adicionada - cantidad recuperada			
	$r^2 \geq 0.98$	0.9993		
	IC (β_1 debe incluir la unidad)	0.9973, 1.0289		
	IC (β_0 debe incluir el cero)	-6.8179, 5.1304		
	$CV_{y/x}$ no debe ser mayor de 3%	0.8 %		
	Porcentaje de Recobro			
	CV no mayor de 3%	1.11 %		
Exactitud y repetibilidad del método	IC (μ) Debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103%	97.13, 98.33		
	$CV \leq 3\%$	0.3 %		
Precisión del método	IC (μ) Debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97-103%	98.63, 99.19		
	$CV \leq 3\%$	1.63%		
Estabilidad analítica de la muestra	$ld_{1l} \leq 3\%$	ld _{1l}	ld _{2l}	ld _{3l}
		3	4.8	8.0
		1.4	1.4	2.5
		4.8	8.0	11.1

En la tabla anterior se observa los resultados obtenidos de los parámetros aplicados a la determinación de acetaminofén, lo que nos indica que es un método analítico adecuado para dicha determinación.

3.9 DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN EN PRODUCTOS COMERCIALES.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN EN TABLETAS (PRODUCTOS COMERCIALES)

En la siguiente tabla se muestra los resultados de la determinación de acetaminofén utilizando el mismo método propuesto en productos farmacéuticos en presentación de 500mg con tres diferentes marcas comerciales. (A: comercial, B: Sector salud y C: GI)

Muestra	A	B	C
Tabletas	500mg	500mg	500mg
Lote	2EEX	116H3027	210084
Caducidad	Jun07	Ago08	Oct07
Peso promedio (mg)	617.0	569.4	598.7mg

Tabla No28 Productos farmacéuticos

Marca del producto	Muestra	Peso de la muestra (mg)	Absorbancia ($\lambda=430\text{nm}$)	Contenido en (mg/tableta)	% de Recobro
Producto A	1	30.9	0.3479	481.1	96.2
	2	30.9	0.3372	466.3	93.3
	3	30.9	0.3479	481.1	96.2
Producto B	1	28.5	0.3665	507.1	101.4
	2	28.5	0.3665	507.1	101.4
	3	28.5	0.3665	507.1	101.4
Producto C	1	29.9	0.3188	442.1	88.4
	2	29.9	0.3188	442.1	88.4
	3	29.9	0.3098	429.6	85.9

Tabla No 29 Resultados de la determinación de acetaminofén en preparaciones farmacéuticas, en tabletas, utilizando un método validado.

Marca	\bar{x} del % de recobro	Desviación estándar	% CV
A	95.2	1.6743	1.8
B	101.4	0	0
C	87.6	1.4434	1.6

Tabla No30 Resultados estadísticos de la determinación de acetaminofén en tabletas de 500mg con un método ya validación.

De acuerdo con los datos de la tabla No 30 los resultados son confiables ya que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no excede al 3% para ninguna de las marcas con que se trabajó.

Las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, octava edición y la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 30), donde indican que las tabletas de acetaminofén no deben de contener menos del 90.0 por ciento y no más de 110.0 por ciento de la cantidad etiquetada y de acuerdo con los datos obtenidos los productos A y B cumplen con la especificación.

Las muestras se trabajaron en el mismo día por lo cual se pesó, se trituraron y se realizó la determinación simultáneamente, al igual que la referencia. Un aspecto esencial al realizar esta determinación es tener buenas prácticas de laboratorio, ya que es un estándar internacional, ético y de calidad científica para poder iniciar el diseño, el registrar y el reportar los resultados.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Análisis de resultados

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los métodos analíticos habituales para el análisis cualitativo y cuantitativo de acetaminofén en presentaciones farmacéuticas.

Basados en el análisis bibliográfico, se diseñó el presente método espectrofotométrico Visible para la determinación y cuantificación del acetaminofén en preparaciones farmacéuticas y se procedió a su validación, para luego poder determinar el acetaminofén en la presentación farmacéutica en tabletas de 500 mg.

En el método que se desarrolló para la realización de este trabajo, se llevaron a cabo una serie de reacciones las cuales fueron: Hidrólisis del Acetaminofén, obtención del azo-compuesto con ácido nitroso, obtenido en situ a partir de nitrito de sodio y ácido clorhídrico, y la copulación de este compuesto con la N,N-dimetilanilina

Los parámetros que se realizaron para la validación de este método, incluyen la determinación de la: especificidad, precisión, linealidad, exactitud, repetibilidad, estabilidad. Por lo cual el método analítico desarrollado para la determinación de acetaminofén, tiene un alto grado de seguridad y los resultados que se generaron se comportan de manera consistente.

4.1 CONCLUSIONES

Conforme a los criterios de aceptación de las normas de validación para métodos espectrofotométricos, los parámetros evaluados en el presente trabajo, se encuentran dentro de ellos. Por lo que el método se considera validado para la determinación acetaminofén en preparaciones farmacéuticas de tabletas de 500mg.

La ventaja de esta metodología, es que el Espectrofotómetro UV-VIS, es un equipo de fácil manipulación, el material que se ocupa es de fácil adquisición. Teniendo como resultado de este trabajo buena sensibilidad, el porcentaje de recobro mayores al 98%, además de que un espectrofotómetro es un equipo de uso en cualquier laboratorio de química analítica, por lo que los costos de este tipo de análisis, son menores que con otro instrumental analítico como un cromatógrafo de gases o de líquidos.

Las desventajas de este método, es que se necesita realizar una serie de reacciones para obtener la formación del compuesto colorido, a partir del acetaminofén, lo cual aumenta el tiempo de cuantificación.

La pureza de la referencia del acetaminofén a la cual se trabajó es del 90%, ya que es con la que se contaba disponible en el laboratorio 3D.

El método de cuantificación farmacopeico, es por valoración mediante un sistema de cromatografía de líquidos, el cual necesita de una mezcla desgasificada de agua y metanol, por lo que es un método laborioso, para obtener el medio de disolución. Además que aumentaría el costo de la determinación del acetaminofén y el tiempo de análisis aumenta.

Por lo cual recomiendo el método mencionado en esta tesis, ya que es confiable, simple y rápido comparado con los ya mencionados. Una ventaja es que la determinación se vuelve específica solo para acetaminofén.

El método analítico desarrollado es muy fácil de aplicar en la industria como en los laboratorios de enseñanza y proporciona gran confiabilidad en los resultados.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Arreguín Rosas José Emilio; Métodos analíticos para la determinación de acetaminofén en medicamentos tesis UNAM Facultad de Química 2002
2. Martínez Castillo Paula; Validación de un método analítico específico para la cuantificación de paracetamol en tabletas en presencia de cafeína tesis; 1998
3. Ledesma Peña Verónica; Validación de un método espectrofotométrico para la determinación de acetaminofén en un producto farmacéutico tesis UNAM Facultad de Química 2004
4. Atay O, Dincol F.; Quantitative determination of aspirin and paracetamol in tablets, Farm Bilimler Derg, 1995, 20, pp. 13-19
5. Colegio Nacional de químicos farmacéuticos Biólogos A. C., Métodos analíticos guía de validación, Edición 2002, pp. 4-40, 57-89
6. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006 Buenas prácticas de fabricación para establecimiento de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998).
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM, octava edición, tomo 2, Secretaria de Salud, México, 2004, pp.1956-1958, 2134-2135.
8. Farmacopea de los Estados Unidos de América; USP 30 NF 25, The United States pharmacopeial convention, Estados Unidos de América, 2007 pp. 11,1385-1388
9. Cuantificación de acrilamida en papas fritas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Lizbeth Sarai Fuentes Rangel, 2006
10. Goodman, Gilman., Las bases farmacológicas de la terapéutica, Tomo 1, novena edición, McGraw-Hill interamérica, México, 2006, pp. 71-72, 677

11. Rang H. P., Farmacología, quinta edición, Editorial Elsevier, España, 2004, pp. 665-669
12. Florey Klaus, Analytical profiles of Drugs substances, Academic press, San Diego California, 1995, pp 551-596
13. McMurry J., Química Orgánica, quinta edición, Editorial Thomson, México, 2001, pp. 1006-1007
14. Wingrove Alan S. Caret Robert; Química Orgánica; primera edición; Editorial Harper Row latinoamericana; México; 1999; pp. 1318
15. K. Petere C. Vollhardt; Química Orgánica; cuarta edición; Editorial Omega; Barcelona; 2002; pp. 1006
16. Remington Alfonso Genaro; Farmacia, vigésima edición, Tomo 1, Editorial Medica panamericana, Argentina, 2003, pp. 1730
17. Skoog Douglas A; Fundamentos de Química Analítica, edición, Editorial Reverté, México, 2005, pp. 753.
18. Volker Bühler; Formulac Generic Drug Formulations, 1st edition, fine Chemicals BASF, 1997
19. Benjamin W. Gung, Journal of chemical education, Parallel combinatorial synthesis of Azo Dyes, Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, vol. 81, No 11, November, 2004, pp. 1630-1632.
20. [Http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm](http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm)
21. [Http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p21.pdf](http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p21.pdf)
22. [Http://www.tagoror.com/enciclopedia/es/wikipedia/a/az/azoderivado](http://www.tagoror.com/enciclopedia/es/wikipedia/a/az/azoderivado)
23. [Http://www.healthfinder.gov/news/printnewsstory.asp?docID=533637](http://www.healthfinder.gov/news/printnewsstory.asp?docID=533637)

ANEXOS

ANEXO 1

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULOS CON EJEMPLO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = \beta_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$t_{0.975, n-2}$ = Referirse al anexo 2, para determinar el valor de la t de Student.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados:

Muestra	X Concentración %	Y absorbancia	XY
1	60	0.1487	8.92
2	60	0.1487	8.92
3	60	0.1487	8.92
4	80	0.2366	18.93
5	80	0.2291	18.33
6	80	0.2291	18.33
7	100	0.3279	32.79
8	100	0.3279	32.79
9	100	0.3279	32.79
10	120	0.4559	54.71
11	120	0.4559	54.71
12	120	0.4685	56.22
13	140	0.5850	81.90
14	140	0.5850	81.90
15	140	0.5686	79.60

2) Calcular $\sum X, \sum Y, \sum X^2, \sum Y^2, \sum XY$ y determinar n:

$$\sum X = 60 + \dots + 140 = 1500$$

$$\Sigma y = 0.1487 + \dots + 0.5686 = 5.2344$$

$$\Sigma x^2 = 60^2 + \dots + 140^2 = 162\,000$$

$$\Sigma y^2 = 0.1487^2 + \dots + 0.5686^2 = 2.18689634$$

$$\Sigma xy = 60 * 0.1487 + \dots + 140 * 0.5686 = 589.77$$

$$n = 15$$

3) Calcular b_1 , b_0 y r^2

$$b_1 = \frac{(15 * 589.77) - (1500 * 5.2344)}{(15 * 162000) - (1500)^2} = 0.00553$$

$$b_0 = \frac{5.2344 - (0.00553 * 1500)}{15} = -0.1955$$

$$r^2 = \frac{((15 * 589.77) - (1500 * 5.2344))^2}{((15 * 162000) - (1500)^2)((15 * 2.186896) - (5.2344)^2)} = 0.9954$$

El valor es mayor a 0.98 por lo tanto se aprueba el parámetro.

4) Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{2.186896 - (0.00553 * 589.77) - (-0.1955 * 2.186896)}{15 - 2}} = 0.022369$$

$$S_{b1} = 0.022369 \sqrt{\frac{1}{162000 - \frac{(1500)^2}{15}}} = 0.0002042$$

5) Obtener del anexo 2 $t_{0.975, n-2}$ y determinar IC (β_1)

$$t_{0.975, 15-2} = 2.160$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, 15-2} S_{b1}$$

$$IC(\beta_1) = 0.00553 \pm 2.160 * 0.0002042 = 0.0050889, 0.005971$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PRECISIÓN DEL SISTEMA

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

n = número de mediciones.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO.

Son las lecturas obtenidas

Muestra	Absorbancia
1	0.3279
2	0.3279
3	0.3188
4	0.3279
5	0.3279
6	0.3279

1. Calcular $\sum y$, $\sum y^2$, determinar n

$$\sum y = 0.3279 + \dots + 0.3279 = 1.9583$$

$$\sum y^2 = 0.3279^2 + \dots + 0.3279^2 = 0.639226$$

$$n = 6$$

2. Calcular \bar{y} , S y CV

$$\bar{y} = \frac{1.9583}{6} = 0.3264$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 0.639226) - (1.9583)^2}{6 * (6 - 1)}} = 0.0037$$

$$CV = \frac{0.0037}{0.3264} * 100 = 1.13$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULOS CON EJEMPLO PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$t_{0.975, n-2}$ = Referirse al anexo 2, para determinar el valor de la t de Student.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{(\sum x)}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO

1. Tabular los resultados:

X (mg)	Y (mg)
15.1	14.7
15.1	14.7
15.1	14.7
20.9	20.1
20.9	20.1
20.8	20.1
25.0	24.3
25.0	24.3
25.0	24.3
30.0	29.5
30.0	29.5
30.0	29.5
35.3	35.1
35.3	35.1
35.3	35.1

2. Calcular $\Sigma x, \Sigma y, \Sigma x^2, \Sigma y^2, \Sigma xy$ y determinar n:

$$\Sigma x = 15.1 + \dots + 35.3 = 378.8$$

$$\Sigma y = 14.7 + \dots + 35.1 = 371.1$$

$$\Sigma x^2 = 15.1^2 + \dots + 35.3^2 = 10303.56$$

$$\Sigma y^2 = 14.7^2 + \dots + 35.1^2 = 9938.55$$

$$\Sigma xy = 15.1 \cdot 14.7 + \dots + 35.3 \cdot 35.1 = 10118.76$$

$$n = 15$$

3. Calcular b_1 , b_0 y r^2

$$b_1 = \frac{(15 * 10118.76) - (378.8 * 371.1)}{(15 * 10303.56) - (378.8)^2} = 1.013084$$

$$b_0 = \frac{371.1 - (1.013084 * 378.8)}{15} = -0.843748$$

$$r^2 = \frac{((15 * 10118.76) - (378.8 * 371.1))^2}{((15 * 10303.56) - (378.8)^2)((15 * 9938.55) - (371.1)^2)} = 0.9993$$

El valor es mayor a 0.98

4. Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{9938.55 - (1.013084 * 10118.76) - (-0.843748 * 371.1)}{15 - 2}} = 0.198266$$

$$S_{b1} = 0.198266 \sqrt{\frac{1}{10303.56 - \frac{(378.8)^2}{15}}} = 0.0073003$$

5. Determinar en el anexo 2 $t_{0.975, n-2}$ y calcular IC (β_1)

$$t_{0.975, n-2} = 2.160$$

$$IC(\beta_1) = 1.013084 \pm 2.160 * 0.0073003 = 0.997315, 1.028853$$

No incluye al cero.

6. Evaluar \bar{x} , S_{b0}

$$\bar{X} = \frac{378.8}{15} = 25.2533$$

$$S_{b0} = \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{(378.8)^2}{10303.56 - \frac{(378.8)^2}{15}}} = 2.765814$$

7. Calcular IC (β_0)

$$IC(\beta_0) = -0.843748 \pm 2.160 * 2.765814 = -6.817906, 5.130410$$

8. Determinar el $CV_{y/x}$

$$CV = \frac{0.198266}{24.74} * 100 = 0.8\%$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PORCENTAJE DE RECOBRO

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional.

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$ Referirse al Anexo 2, para determinar el valor de la *t de Student*.

N = número de recobros

1. Tabular los resultados:

% de recobro (y)
97.4
97.4
97.4
96.2
96.2
96.2
97.2
97.2
97.2
98.3
98.3
98.3
99.4
99.4
99.4

Datos de la referencia

Referencia	Absorbancia	Peso (mg)
	0.4685	25
	0.4685	25
	0.4685	25
	$\bar{x} = 0.4685$	$\bar{x} = 25$

$$\text{mg Recuperados} = \frac{\text{Abs muestra} \times \text{mg referencia}}{\text{Abs referencia promedio}}$$

$$\text{mg Recuperados} = \frac{0.2757 \times 25}{0.4685}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Recuperada Y} \times 100}{\text{Adicionada X}}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{14.7 \times 100}{15.1} = 97.4 \%$$

2. Calcular Σy , Σy^2 y determinar n.

$$\Sigma y = 97.4 + 97.4 + \dots + 99.4 + 99.4 = 1465.9$$

$$\Sigma y^2 = 97.4^2 + 97.4^2 + \dots + 99.4^2 + 99.4^2 = 143273.99$$

$$n = 15$$

3. Calcular \bar{y} y S

$$\bar{y} = \frac{1465.9}{15} = 97.7$$

$$S = \sqrt{\frac{(15 \times 143273.99) - (1465.9)^2}{15 \times (15 - 1)}} = 1.08461$$

4. Calcular el CV

$$CV = \frac{1.08461}{97.7} \times 100 = 1.11$$

El valor no excede del 2%

5. Determinar en el Anexo 2 $t_{0.975, n-1}$ y calcular IC (μ)

$$t_{0.975, n-1} = 2.145$$

$$IC(\mu) = 97.7 \pm 2.145 \frac{1.08461}{\sqrt{15}} = 97.1293, 98.3307$$

El intervalo no incluye el valor de 100.

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional.

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$ Referirse al Anexo 2, para determinar el valor de la *t de Studen*.

N = número de recobros

1. Tabular los datos:

Muestra	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de recobro (y)
1	25	24.74	98.96
2	25	24.74	98.96
3	25	24.60	98.40
4	25	24.74	98.96
5	25	24.74	98.96
6	25	24.80	99.20

2. Calcular Σy , Σy^2 y determinar n.

$$\Sigma y = 98.96 + \dots + 99.20 = 593.44$$

$$\Sigma y^2 = 98.96^2 + \dots + 99.20^2 = 58695.5264$$

$$n = 6$$

3. Calcular \bar{y} , S y CV

$$\bar{y} = \frac{593.44}{6} = 98.91$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 58695.5264) - (593.44)^2}{6 * (6 - 1)}} = 0.266133$$

$$CV = \frac{0.266133}{98.91} * 100 = 0.3\%$$

4. Determinar en el Anexo 2 y calcular IC (μ)

$$T_{0.975, 6-1} = 2.571$$

$$IC(\mu) = 98.91 \pm 2.571 * \left(\frac{0.266133}{\sqrt{6}} \right)$$

$$IC(\mu) = 98.6307, 99.1893$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PRECISIÓN DEL MÉTODO.

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

n = número de muestras de contenido/potencia/valoración.

1) Tabular los datos obtenidos:

Día	Concentración (µg/mL)	
	Analista	Analista
1	32.50	32.00
	32.50	32.00
	31.90	32.50
2	32.00	32.00
	32.50	32.00
	32.00	32.50

2) Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.

$$\Sigma y = 32.5 + \dots + 32.5 = 386.4$$

$$\Sigma y^2 = 32.5^2 + \dots + 32.5^2 = 9673.1118$$

$$n = 12$$

3) Calcular \bar{y} , S y CV

$$\bar{y} = \frac{386.4}{6} = 32.2$$

$$S = \sqrt{\frac{(12 * 12442.86) - (386.4)^2}{12 * (12 - 1)}} = 0.26629$$

$$CV = \frac{0.26629}{32.2} * 100 = 0.8\%$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Media aritmética del análisis inicial.

$$\bar{y}_0 = \frac{\Sigma y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras del análisis inicial

Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje.

$$\bar{y}_i = \frac{\Sigma y_i}{n_i}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de almacenaje.

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

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

1. Tabular los datos obtenidos:

Muestra	Tiempo inicial(y_0)	% recobro		
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)	72 horas (y_3)
1	98.33	101.42	103.15	106.35
2	98.33	101.42	103.15	106.35
3	98.33	101.42	103.15	106.35

2) Calcular $\Sigma y_0, \Sigma y_1, \Sigma y_2, \Sigma y_3$ y determinar n_0, n_1, n_2 y n_3 .

$$\Sigma y_0 = 98.33 + 98.33 + 98.33 = 294.99$$

$$\Sigma y_1 = 101.42 + 101.42 + 101.42 = 304.26$$

$$\Sigma y_2 = 103.15 + 103.15 + 103.15 = 309.45$$

$$\Sigma y_3 = 106.35 + 106.35 + 106.35 = 319.05$$

$$n_0 = 3$$

$$n_1 = 3$$

$$n_2 = 3$$

$$n_3 = 3$$

b) Calcular temperatura ambiente en oscuridad $\bar{y}_0, \bar{y}_1, \bar{y}_2$ y \bar{y}_3

$$\bar{y}_0 = \frac{294.99}{3} = 98.33$$

$$\bar{y}_1 = \frac{304.26}{3} = 101.42$$

$$\bar{y}_2 = \frac{309.45}{3} = 103.15$$

$$\bar{y}_3 = \frac{319.05}{3} = 106.35$$

4) Calcular $|d_i|$

$$|d_1| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0| = |101.42 - 98.33| = 3\%$$

$$|d_2| = |\bar{y}_2 - \bar{y}_0| = |103.15 - 98.33| = 4.8\%$$

$$|d_3| = |\bar{y}_3 - \bar{y}_0| = |106.35 - 98.33| = 8.0\%$$

El valor no excede del 3%.

ANEXO 2

Tabla estadística de la distribución t de Student.

Grados de Libertad	t _{0.975}	Grados de Libertad	t _{0.975}	Grados de Libertad	t _{0.975}
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992