

25
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR SENOSIDOS A Y B EN LA FORMA FARMACEUTICA TABLETAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A .
FERNANDEZ GARCIA ROSA ELENA



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION	1
I FUNDAMENTACION	4
A. VALIDACION	6
1. Importancia	6
2. Parámetros analíticos	8
a. Linealidad	8
b. Precisión	8
c. Exactitud	10
d. Especificidad	13
e. Revalidación	14
B. METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS	14
1. Importancia	14
2. Proceso de absorción	14
3. Absorción de la luz por sustancia	17
4. Ley de Lambert-Beer	19
5. Limitaciones de la Ley de Beer	21
C. SENOSIDOS A Y B	22
1. Propiedades Químicas	22
a. Nombre Químico	22
b. Estructura	22
c. Solubilidad	24
2. Acción Terapéutica y Farmacológica	24

PAGINA

II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
III	OBJETIVO	29
IV	HIPOTESIS	31
V	MATERIAL Y EQUIPO	33
VI	DESARROLLO EXPERIMENTAL	36
	A. PREPARACION DEL PLACEBO	37
	B. TECNICA ANALITICA EMPLEADA	37
	1. Preparación del Reactivo	37
	2. Preparación del Estándar	38
	3. Preparación de la muestra	38
	4. Procedimiento	39
	C. VALIDACION	39
	1. Linealidad del sistema	39
	2. Linealidad del método	40
	3. Precisión	40
	a. Repetibilidad	40
	b. Reproducibilidad	40
	4. Exactitud del Método	41
	5. Especificidad del método	41
VII	RESULTADOS	42
	A. LINEALIDAD DEL SISTEMA	43
	B. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO	45
	C. PRECISIÓN DEL METODO ANALITICO	49

	PAGINA
1. Repetibilidad	49
2. Reproducibilidad	51
D. EXACTITUD DEL METODO	55
E. ESPECIFICIDAD	57
VIII ANALISIS DE RESULTADOS	58
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	
ANEXO	

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Durante la producción de toda forma farmacéutica, es necesario tener un estricto control de calidad sobre el producto terminado ya que todo medicamento está destinado para el bienestar del hombre, previniendo una posible, enfermedad o para tratarla cuando está presente.

Debido a que el método de análisis de un medicamento juega un papel muy importante para decidir si el medicamento cumple o no con las especificaciones de calidad establecidas, la Industria Farmacéutica se ha avocado a la mejoría de las técnicas de análisis para poder obtener así resultados más confiables, que reflejen el valor de la concentración de los compuestos a ser cuantificados.

Los senósidos A y B son fármacos que contribuyen a la acción laxante cuando son utilizados en concentración adecuada ya que una sobredosis produce alteraciones muy serias (24). Por lo que surgió la necesidad de validar un método analítico para cuantificarlos de tal forma que se posea una garantía de que las tabletas de senósidos A y B que se fabriquen, cumplan con las especificaciones de calidad establecidas por el Sector Salud.

El propósito de este trabajo consiste en validar un método analítico que permita cuantificar el contenido de senósidos A y B en tabletas. Para lo cual se propone, el método que describe la farmacopea U.S.P. XX, es el más económico, rápido, eficaz y seguro, pero estimando que las condiciones de los laboratorios en México (equipo, reactivos, medio ambiente, etc.) no son las mismas, se procedió a

adecuar el método ya que las propiedades de los excipientes empleados en la forma farmacéutica tabletas interferían en la cuantificación, ésto se eliminó por medio del proceso de filtrado.

El método espectrofotométrico citado se basa en la hidrólisis ácida de los senósidos A y B a los aglicones correspondientes y que a su vez se oxidan. La intensidad de la coloración roja obtenida, cuando se tratan con la base borato se puede medir por espectrofotometría.

Por otro lado la muestra preparada para su cuantificación es muy inestable puesto que conserva su integridad y la concentración de la sustancia de interés, solo durante los primeros quince minutos, por lo que es necesario hacer la lectura al espectrofotómetro durante este tiempo.

Se concluye que éste es específico, lineal, exacto, preciso y reproducible, ya que cumple con los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros evaluados, por lo que se determina que tiene capacidad para proporcionar resultados confiables para propósitos de control de calidad de rutina en las tabletas de senósidos A y B, como producto terminado.

I FUNDAMENTACION

I FUNDAMENTACION

El incremento en la producción de medicamento y la elaboración de productos nuevos ha llevado a la Industria Farmacéutica a adoptar el término "validación". Para así garantizar la confiabilidad de que el medicamento cubra con todas las especificaciones de calidad y diseño (4, 5, 6, 7).

Por lo mismo la Industria Farmacéutica Nacional se ha visto obligada a validar los métodos analíticos mediante un programa científico por medio del cual quede documentada la influencia de las variables físicas, químicas, cinéticas, instrumentales y aleatorias en su capacidad para proporcionar resultados analíticos confiables.

Los resultados que se obtienen por medio de un método analítico se encuentran influidos por diferentes factores tales como: el medio ambiente (temperatura y luz), el uso de diferentes reactivos, analistas, laboratorios, equipos, materiales, etc. La validación tiene por objetivo evaluar la influencia de todas estas variables en la capacidad del método para medir una propiedad física o química de la muestra en estudio y así poder emitir un juicio para decidir si el método puede ser aplicado a una situación particular (6).

Este proceso de decisión se realiza, después de evaluar las características químicas obtenidas con respecto a los requerimientos del problema analítico en una área específica.

El último uso de la metodología analítica, es producir información del análisis del contenido de muestras específicas, para resolver problemas particulares.

El proceso de validación verifica en particular una metodología y se basa sobre juicios de algunas técnicas conocidas que son optimizadas para propósitos de mediciones prácticas. (10)

Los métodos que son establecidos por la United States Pharmacopeia (U.S.P.), o de algunas otras fuentes reconocidas de estándares de referencia, deben ser adecuadamente validados porque en nuevas condiciones, reactivos, e instrumentos pueden alterar sus características. (7)

Se hacen análisis de muestras de referencia, que son similares a muestras problema comparando los resultados para dar valores certificados.

La evaluación se hace por medio del recobro experimental obtenido de un placebo cargado; mismo recobro que evalúa el error sistemático constante que es independiente de la cantidad de fármaco presente en la muestra.

A. VALIDACION

1. Importancia

En la validación de los métodos analíticos es necesario tomar como base un conocimiento científico de los mismos; así la relación entre los factores independientes o que son controlables; las variables de formulaciones o de proceso, y los factores dependientes o de respuesta que son características de calidad del producto, pueden ser establecidas matemáticamente por métodos apropiados de modelos estadísticos, que son por lo general un análisis inferencial y de regresión lineal computarizado. (5)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda, establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada (6).

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos, como son: la precisión, linealidad, exactitud y especificidad proporcionado una medida del comportamiento del sistema y del método.

Los parámetros que proporciona la información para decidir si un método es o no funcional son estudiados estadísticamente, un método que es válido para una situación, puede no serlo en otra.

Dependiendo de la categoría del método a validar se evalúan diferentes parámetros estadísticos, ver tabla No. 1.

TABLA No. 1
PARAMETROS MINIMOS PARA VALIDAR METODOS ANALITICOS *

Parámetro	I	II	III	IV	
				A	B
Linealidad y precisión	x	x	x	x	x
Exactitud	x	x	x	x	x
Límite de detección		x			
Límite de cuantificación		x	x		
Reproducibilidad	x	x	x	x	x
Especificidad (interferencia)	x	x	x	x	x
Especificidad (en estabilidad)			x		

Donde:

- I** = Métodos analíticos de la categoría I para pruebas de control de calidad.
- II** = Métodos analíticos en pruebas de biodisponibilidad, como por ejemplo disolución, fármacos de liberación controlada, etc.
- III** = Métodos analíticos indicativos de estabilidad.
- IV** = Revalidación del método
 - A** = Sin cambio en condiciones de operación
 - B** = Con cambio en condiciones de operación

* Referencia (6 y 7).

2. Parámetros Analíticos

a. Linealidad

La linealidad de un método analítico; es la capacidad para asegurar que los resultados analíticos son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. Los niveles de concentración son tres dependiendo de la cantidad elegida teniendo como central un 100%.

Criterio de aceptación para la linealidad de método en:

Coefficiente de correlación $R \geq 0,99$

Intercepto $B = 0 \pm 2\%$ El límite al 95% debe incluir el cero.

Pendiente $M = 1 \pm 2\%$ El límite al 95% debe incluir el 1.

Error Estándar de Regresión $S_{y/x} < 3\%$

Coefficiente de variación C.V. $\leq 1.5\%$

El método se considerará lineal si cumple satisfactoriamente con lo anterior.

Estadígrafo de contraste: t de estudent (4, 5).

b. Precisión:

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 mezcla homogénea del producto.

Las mediciones de la precisión deben calificarse en términos de sus dos fuentes de variación que son repetibilidad y reproducibilidad.

- 1) Repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones. (Analista, aparatos, laboratorio, tiempo, etc.).

Estadígrafo de contraste: χ^2 .

área de aceptación χ^2 cálculo < χ^2 tablas.

- 2) Reproducibilidad es precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analistas, días, equipos, laboratorio, etc.).

La evaluación de basa en un modelo de la forma:

$$X_{ijk} = \bar{X} + A_i + D_j + E_k \quad (ij)$$

Donde cada variable representa una de las posibles fuentes de variación involucradas en la técnica. Se cuantifica además el error E_k (ij) implícito en cada determinación.

El análisis de varianza (ANAEVA) mide los efectos de los factores (para el presente caso; analistas-días y la interacción entre ambos de los resultados obtenidos).

Estadígrafo de contraste: "F" Fisher

Area de aceptación: $F_{\text{cálculo}} \leq F_{\text{tablas}}$

Criterio de aceptación de precisión del método. El análisis de varianza debe indicar que no hay diferencia significativa entre día y analistas en los resultados estadísticos.(7)

Desviación estándar $\leq 1.5\%$

c. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de una sustancia. Las condiciones en las que el experimento debe efectuarse deben ser controladas; esto es: misma muestra, mismo analista mismos instrumentos, etc.

- 1) Exactitud al 100% se determina de cuando menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de sustancia de interés para obtener la concentración 100%, utilizando el método propuesto haciendo el análisis bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio de aceptación de la exactitud del método.

Promedio de recobro 98.5-101-5%

Límite al 95% de confianza 97 a 102%

Desviación estándar relativa DER \leq 3%

Coefficiente de variación \leq 1.5%

Estadígrafo de contraste: "t" de student.

Area de aceptación:

$$t_{\frac{\alpha}{2}} < t \text{ cálculo} < t_{\frac{1-\alpha}{2}}$$

La estimación de la exactitud de un método está asociado con el error total que es la suma del error indeterminado y el error determinado.

El error determinado se debe a una falta de control de calidad de la técnica analítica (errores de operación, calibración, reactivos, etc.), es controlable y es independiente de la concentración del fármaco.

El error indeterminado permanece aún cuando se ha hecho todos los esfuerzos para eliminar el error determinado.

Los errores indeterminados, son originados por efectos acumulativos de fluctuaciones aleatorias en el proceso de medida, es incontrolable pero puede medirse con una validación adecuada.(6)

El coeficiente de variación y el porcentaje de recobro depende del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo presente en la muestra, como se observa en las tablas 2 y 3

TABLA No. 2
PORCENTAJES DE RECOBRO
DE LAS DIFERENTES FORMAS FARMACEUTICAS

FORMA FARMACEUTICA	% DE RECOBRO
TABLETAS	98-128
SUSPENSIONES	97-103
SOLUCIONES	98-102
SEMISOLIDOS	97-103

TABLA No. 3
VALORES DE C.V.
PARA EVALUAR LA PRECISION DEL METODO

METODO	C. V.
CROMATOGRAFICOS	< 2 %
QUIMICOS Y ESPECTROFOTOMETRICOS TITRIMETRICOS	≤ 3 %
MICROBIOLOGICOS	< 5 %

EL COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL DEBE CUMPLIR CON
LOS FINES PARA LOS CUALES EL METODO SERA UTILIZADO.(6,7)

d. Especificidad.

Verifica la capacidad del método para determinar que los excipientes no interfieran con la medida de la potencia del principio activo.

La especificidad mide el grado de interacción (o ausencia) del principio activo en el análisis de mezclas. En el método analítico específico, es la medida usada para la determinación de un compuesto y que no esté influenciada por la presencia de otros materiales. (6, 7)

<i>Criterio</i>	<i>Muestra</i>	<i>Respuesta</i>
	<i>Placebo</i>	<i>No da respuesta</i> <i>(menor del 2%)</i>
	<i>(todos los excipientes de la forma farmacéutica sin principio activo).</i>	
	<i>Estándar</i>	<i>Da respuesta</i> <i>(100 %)</i>
	<i>Placebo cargado</i>	<i>Da respuesta</i> <i>igual al estándar</i> <i>(100%)</i>
	<i>(excipientes + una cantidad del principio activo igual al estándar)</i>	

e. Revalidación.

Por revalidación se entiende la repetición de una validación y resulta necesaria cuando se han alterado las condiciones bajo las cuales se ha llevado a cabo la validación. (2)

Por ejemplo:

- Modificaciones en los procesos de fabricación o en los reactivos.
- Cambio de proveedor o de la calidad de los reactivos.
- Empleo de aparatos de medición nuevos.

B.- METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

1.- Importancia

La espectrofotometría se utiliza para determinar materiales desconocidos tanto puros como impuros. Estas medidas detectan la presencia o ausencia de diferentes elementos o grupos funcionales, o bien proporcionan información en relación a la estructura analizada.

2.- Proceso de Absorción.

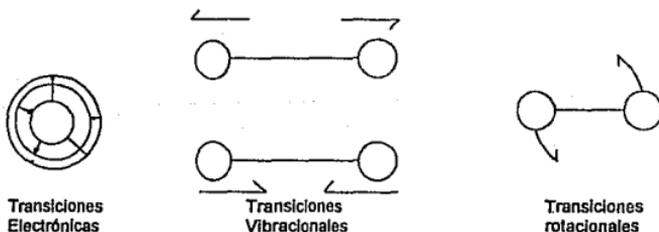
Cuando un átomo, ión o molécula absorbe un fotón, la energía añadida produce una alteración de estado; la especie se dice entonces que está excitada. La excitación puede aplicar uno de los procesos siguientes:

- *Transición de un electrón a un nivel de mayor energía.*
- *Un cambio en el modo de vibración de la molécula.*
- *Una alteración en el modo de rotación.*

La energía potencial de una molécula, excluyendo su energía nuclear, puede considerarse como la suma de sus energías electrónica, rotacional y vibracional. Las energías electrónicas se asocian con las transiciones de los electrones dentro del átomo o molécula .

Las energías rotacionales o vibracionales se asocian con las rotaciones y/o vibraciones de los átomos o grupos de átomos respecto a ellos mismos en la molécula (ver figura 1).

Fig. 1. Tipos de transiciones en los átomos



$$E_{\text{total}} = \text{Energía electrónica} + \text{Energía vibracional} + \text{Energía rotacional}$$

Las diferencias entre estados energéticos rotacionales de una molécula son relativamente pequeñas, mucho menores que las diferencias energéticas entre niveles electrónicos. Las diferencias energéticas entre estados vibracionales son intermedias. Consecuentemente, la absorción de la luz

asociada con energías rotacionales se halla situada por lo general en la región de baja energía o longitud de onda larga del espectro electromagnético, esto es, el infrarrojo lejano.(11)

Absorciones asociadas con diferencias electrónicas, se encontrarán en la región del espectro de alta energía o longitud de onda (ultravioleta y visible). Absorciones debidas a diferencias vibracionales se encontrarán entre las dos, principalmente en el infrarrojo cercano. (figura 2)

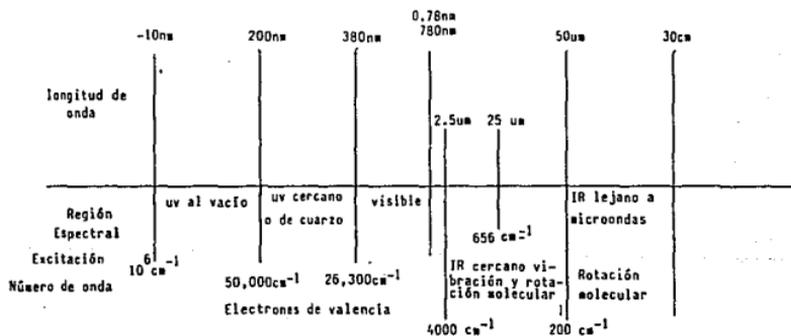


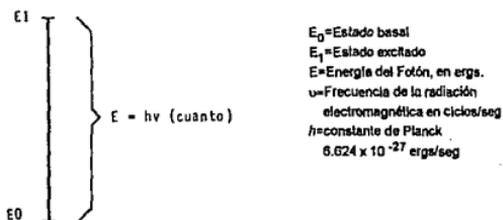
Figura 2 Espectro Electromagnético

La región ultravioleta se extiende desde aproximadamente 10 nm a 380 nm, pero la región que más se emplea para análisis es de 200 a 380 nm y se llama región del cercano ultravioleta. Por debajo de 200 nm el aire absorbe de manera apreciable y por lo tanto, los instrumentos funcionan al vacío. La región visible es una parte muy pequeña del espectro electromagnético. La región del visible se extiende desde el cercano ultravioleta 380 nm hasta aproximadamente

780 nm. La región del infrarrojo abarca aproximadamente 780 nm a 300 μm pero el ámbito de 2.5 a 25 μm es el que se emplea con mayor frecuencia en análisis.(10)

3. Absorción de la Luz por las Sustancias

Puesto que la luz es una forma de energía, la absorción de un fotón por una molécula de una sustancia causa un incremento en su contenido energético: este incremento es igual a la energía del fotón. Si la molécula se encuentra en su estado basal o fundamental (E_0) antes de la interacción, el proceso de absorción eleva su contenido energético a un estado superior o "excitado" (E_1). Los experimentos han demostrado que los cambios energéticos debidos a la absorción de la luz no son funciones continuas, sino que ocurren solamente en múltiplos enteros de la unidad de energía -llamada cuanto- característica de cada especie química. Para que un fotón sea absorbido por la molécula, la energía del mismo debe corresponder precisamente a la diferencia entre dos niveles energéticos de la molécula (fig. 3).



E_0 = Estado basal
 E_1 = Estado excitado
 E = Energía del Fotón, en ergs.
 ν = Frecuencia de la radiación
electromagnética en ciclos/seg
 h = constante de Planck
 6.624×10^{-27} ergs/seg

Energía del fotón = diferencia de energía
Fig. 3 Diferencia entre dos niveles energéticos

En la práctica, cuando la luz entra en contacto con algún cuerpo colorido, algunas de sus longitudes de onda componentes, son absorbidas y las restantes son reflejadas o transmitidas según sus características fisicoquímicas. A este fenómeno se le denomina absorción diferencial.

En contraste, los cuerpos negros y blancos no siguen este comportamiento, ya que los primeros absorben todas las longitudes de onda, en tanto que los segundos sólo las reflejan pero no las absorben. Es de suponer que, desde el punto de vista de la espectrofotometría, el interés se centra en el tipo y cantidad de energía absorbida. La naturaleza y magnitud de las radiaciones absorbidas constituye una importante información concierne a las propiedades del material analizado.

En el caso de las sustancias semitransparentes, la alternativa consiste en graficar la intensidad de la luz transmitida como una función de la longitud de onda; con ello se obtiene lo que se conoce como la absorción de la sustancia estudiada. Un uso importante de los espectros de absorción es el de servir como guía para la selección de una longitud de onda adecuada para el análisis cuantitativo. Por lo general, la longitud de onda elegida es una región en la cual las sustancias a determinar absorben fuertemente, mientras que otras lo hacen en proporción insignificante. En este caso encontramos que la absorción diferencial es la base para la aplicación de la espectrofotometría de absorción en el análisis cuantitativo y cualitativo.

4. Ley de Lambert-Berr

Beer postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria.

$$abc = \log P_0/p$$

donde:

a = Absortividad molar

b = Longitud de la celda

c = Concentración

p = Potencia Radiante Emergente

*P*₀ = Potencia radiante incidente

Es de suponerse que la cantidad de la luz absorbida por una proporción fija de la especie absorbente dependerá del número de moléculas de la misma.

Consideramos el caso hipotético en el cual un haz de luz monocromática incide sobre una celda llena con una solución transparente que contiene una sustancia absorbente. Si 100 fotones de radiación penetran en la solución y sólo emergen 50, al otro lado decimos que la transmitancia de la solución es de 0.5. (ver figura 4)

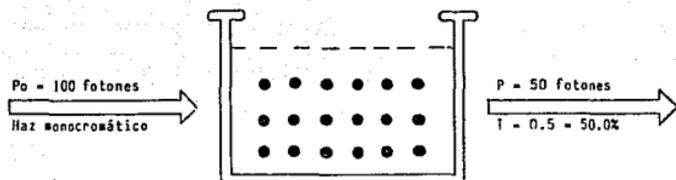


Fig. 4 Fundamento de la Ley de Lambert-Beer.

La potencia radiante, P_0 , que cruza la muestra, es reducida en intensidad. La potencia emergente, p , es medida con objeto de estimar la magnitud de la reducción debida a la absorción. Por lo tanto, la transmitancia, T , es el cociente de la potencia radiante emergente dependiente de la muestra y calor de la potencia radiante incidente que alcanza la muestra. El porcentaje de transmitancia es simplemente el producto de la transmitancia en la relación al factor 100.

$$T = (p/P_0) \times 100$$

La absorbancia, A , es el logaritmo base 10 del recíproco de la transmitancia.

$$A = \text{Log} (1/T) = \log (P_0/p)$$

Resulta obvio que cuando se desea determinar cuantitativamente la concentración en una solución midiendo la cantidad de radiación que transmite, es necesario contar con alguna relación de trabajo entre la concentración en la

solución y su capacidad de transmisión de radiación. La ley de Lambert-Beer constituye tal relación.

5. Limitaciones de la Ley de Beer

Fuentes químicas de desviación.

La ley de Beer es satisfactoria solamente para la descripción del comportamiento de disoluciones diluidas, en este sentido es una ley limitada.

A altas concentraciones la distancia media entre las moléculas del soluto (iones) es disimulada hasta el punto de que cada una afecta a la distribución de cargas de sus vecinos. Esta interacción a su vez puede alterar su aptitud de absorber a una radiación de longitud de onda dada.

Por otro lado en ciertos casos, el sistema muestra desviaciones aparentes de la Ley de Beer debido a reacciones químicas que se producen en solución, de tal forma que ocurrirán situaciones similares cuando la concentración de la especie absorbente se ve afectada por reacciones de formación de complejos o de hidratación (dependencia con respecto del pH) (11).

La Ley de Beer sólo puede aplicarse en forma estricta cuando se emplea radiación incidente monocromática, donde la longitud de onda involucrada normalmente es capaz de producir un cambio máximo en la absorbancia por unidad de concentración.

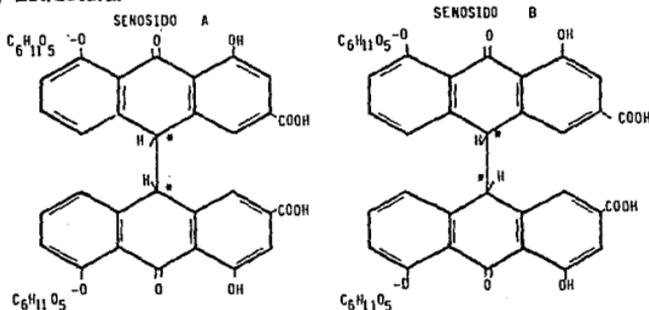
C. SENOSIDOS A y B

1. Propiedades Químicas.

a) Nombre químico:

senósido A, 5, 5' - Bis - (B-D - glucopirano síoxi), 9, 9', 10, 10' - tetrahidro - 4, 4' d = hidroxí 10, 10' díoxo (9, 9' biantraceno) 2, 2' - ácido dicarbóxico.

b) Estructura:

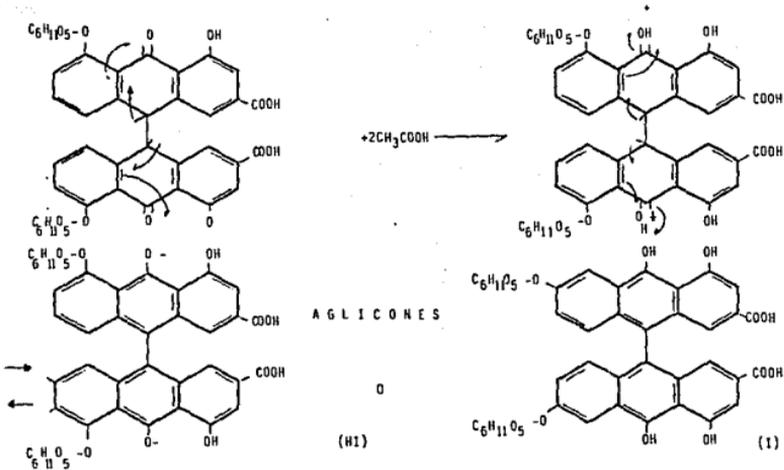


Las unidades C₆ H₁₁ O₅ se refieren a la D-Glucosa.

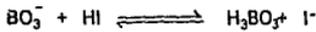
El senósido A es destrógiro, por la actividad óptica de los carbonos indicados con asteriscos.

El senósido B tiene la misma estructura pero existe en la forma "meso", respecto a los carbonos indicados con asterisco, y por esa razón no muestra actividad óptica.

La espectrofotometría de los senósidos A y B se basa en la hidrólisis ácida de los senósidos a los aglicones correspondientes que a su vez se oxidan. La intensidad de la coloración roja que se obtiene cuando estos se tratan con la base Borato se puede medir por espectrofotometría (23).



Los aglicones de los senósidos A y B (HI) reaccionan con la base borato según:



Por la adición de ácido acético se neutralizan sucesivamente las dos bases presentes en la disolución:



c) Solubilidad

Los senósidos A y B son un complejo natural de glucósidos de antroquinona que se encuentran en el sen, aislados de *Cassia Augustifolia*, como sales de calcio.

Los principios activos del sen son derivados de la antroquinona, dentro de los cuales se incluyen diantronas activas, senósidos, reósidos, antroquinonas y poliantronas.

La manufactura de medicamentos del sen se basa en la extracción de una fracción activa de las hojas o frutos por medio de disolventes acuosos orgánicos. Los disolventes más utilizados son metanol, etanol, acetona, isopropanol y etermonoalquiletilenglicol, al 70% en agua.

La maceración del producto natural con metanol al 90%, seguida por percolación, produce una fracción con 65% de la actividad original.

Después de la extracción inicial, la mezcla resultante se concentra al vacío, luego, los principios activos se precipitan con alcohol, éter o la mezcla de los solventes.(12)

2. Acción Terapéutica y Farmacológica

El sena o sen pertenece al grupo antroquinona de purgantes y debe la mayor parte de su actividad a dos glucósidos conteniendo antranol que han sido

nombrados A y B. Además, se encuentran presentes otros principios incluyendo un tercer glucósido que refuerza la acción de los senósidos (25). La farmacología del sena es examinada cuidadosamente por Abraham (26). Después de la ingestión los senósidos son absorbidos y pasan a la corriente sanguínea. Después de ocurrir los cambios químicos, los principios activos, las emodinas, llegan al intestino grueso. Aquí, los movimientos propulsores son altamente estimulados, causando así un paso rápido de contenidos fecales.

La acción farmacológica se ejerce directamente sobre los músculos lisos del colón, produciendo la peristalsis de esa región del lumen hacia el intestino. La inhibición del transporte de sodio del lumen hacia las células, con la correspondiente retención de agua en el lumen, ha sido propuesta como mecanismo de acción secundario (25).

Se ha reportado que los senósidos A y B no tienen efecto sobre el colón aislado de conejillos, proponiéndose que los senósidos se hidrolizan "in vitro" a los glucosidos y ésta sea la sustancia activa que produce la peristalsis. *

El sen se ha utilizado con un 90% de éxito en supositorios y tabletas para casos de estreñimiento de pacientes, el estreñimiento habitual, es así, no una "enfermedad" como se entiende generalmente el término, y no hay pruebas de que la movilidad de las colonias es anormal en personas que sufren de estreñimiento, lo cual es el resultado de una falla crónica para mover los intestinos cuando el recto se encuentra cargado (24).

* PERISTALSIS: Son los movimientos del intestino

- a) Efectos colaterales no deseables del extracto del sen: como son anorexia, náusea, cólicos (movimientos intestinales sueltos), consistencia de evacuación suelta, vómito; están atribuidos a una sobredosis debida a la presencia de glucósidos primarios y productos de destrucción de los senósidos, a menos que el cólico sea el primer síntoma de sobredosis en aparecer conforme la dosis es aumentada progresivamente, la aparición de cólicos sin otra prueba de sobredosis contradice el punto de vista de "que la gran ventaja de prescribir una preparación uniforme de acción laxante constante es que, una vez que se decide la dosis para cada paciente, no debe haber cólicos, puesto que esto parece ser un síntoma de sobredosis" (25).

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la técnica de Cromatografía de líquidos de alta resolución (16) aplicada a el análisis de senósidos A y B requiere equipo sofisticado y reactivos de alta pureza, resulta ser un procedimiento costoso dado que ambos resultan de un alto valor en el mercado de insumos para la industria farmacéutica.

Los métodos espectrofotométricos son utilizados ampliamente para analizar senósidos A y B entre ellos se encuentran el de la Farmacopea Británica (21) o el que señalan los autores Bernard y Christensen (23) pero son excesivamente largos y poco prácticos ya que se requiere hacer reflujos y varias extracciones durante su desarrollo.

Por lo cual se requiere de un método versátil que ofrezca confiabilidad, rapidez de análisis y costos más accesibles.

Este trabajo pretende adecuar a las condiciones de laboratorio, el método analítico establecido en la U.S.P. XX ya que los excipientes empleados en la forma farmacéutica tabletas interfieren en la cuantificación, además el principio activo es un compuesto fotosensible que reacciona con muchos compuestos organicos, lo que lo hace inestable, por lo que se tiene la necesidad de validar el método analítico. De tal manera que se posea una garantía de que las tabletas de senósidos A y B que se fabriquen cumplan con las especificaciones y normas de calidad establecidas por el sector salud.

III OBJETIVO

III. OBJETIVO

Adeuar y validar un método analítico para cuantificar senosidos A y B en la forma farmacéutica (tabletas) por medio de un método espectrofotométrico en la región del visible determinando los siguientes parámetros:

Linealidad del sistema

Linealidad del método

Precisión del método

Reproducibilidad del método

Exactitud del método

Especificidad del método

Para que finalmente éste pueda ser utilizado como método de control de calidad de rutina en producto terminado.

IV HIPOTESIS

IV. HIPOTESIS

Sí los excipientes empleados en la forma farmacéutica (tabletas) no interfieren en la cuantificación y el principio activo no presenta reacciones fotométricas; al determinar los cambios de absorbancia con respecto al tiempo por el método espectrofotométrico de los senósidos A y B, se espera que el método sea válido bajo las condiciones del laboratorio y pueda ser utilizado como un método de control de calidad de rutina.

V MATERIAL Y EQUIPO

V. MATERIAL Y EQUIPO

A. MATERIALES	DESCRIPCION
Matraces volumétricos	50, 100 y 200 ml.
Pipetas volumétricas	1, 2, 3, 4, 5, y 10 ml.
Vasos de precipitado	100 y 250 ml.
Probetas	100 ml.
Matraces de Iodo (ámbar con tapón esmerilado).	50 ml.
Embudo de talle corto	Mediano
Pipetas graduadas	3 y 5 ml.

(Todo el material de vidrio marca PYREX)

B. EQUIPO	MARCA	MODELOS
Espectrofotómetro	Beuch & Lomb	Mod. 18
Balanza Analítica	Unimatic	Mod. 30100
Balanza Granataria	Ohaus	1550 SD
Malla		No. 16
Agitador Magnético		PC-353

C. PRINCIPIO ACTIVO Y EXCIPIENTES

INSUMOS

Senósidos A y B

Senósidos A y B (Estándar Secundario)

Avicel pH 101 (Grado U.S.P.)

Lauril Sulfato de Sodio (Grado U.S.P.)

Cabo-sil (Grado U.S.P.)

Almidón de Maíz (Grado U.S.P.)

Polivinil Pírolidina (Grado U.S.P.)

DESCRIPCION

(Representaciones
Mex América, S.A.)
(Representaciones
Mex América, S.A.)
Analizado por CODEBISA.
No. de Análisis 0312
Potencia 4.07%

Astroquím, S.A. de C.V.

Astroquím, S.A. de C.V.

Chemical's

Probain

Químicos, S.A. de C.V.

D. REACTIVOS

Acido Acético, R.A.

Anhídrido Acético, R.A.

J.T. Baker

J.T. Baker

VI DESARROLLO EXPERIMENTAL

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. PREPARACION DE PLACEBO

Se fabricaron "lotes placebo" (excipientes sin principio activo) de acuerdo a la fórmula y procedimiento para tabletas de senósidos A y B establecido en los laboratorios farmacéuticos.

El peso obtenido para cada tableta fué de 374 mg. \pm 5 mg. con una friabilidad de no más del 0,2%.

B. TECNICA ANALITICA EMPLEADA

1.- Preparación del Reactivo

Antes de usarse, calentar cuidadosamente sobre un baño María una mezcla de 15 g. de ácido bórico y 75 ml. de anhídrido acético, y agitar constantemente hasta obtener una solución saturada, manteniendo la temperatura entre los 50°C y 70°C.

Dejar reposar y utilizar el líquido sobrenadante mientras esté entre los 50°C y 70°C.

2. Preparación del Estándar

Pesar aproximadamente 360 mg. del estándar de referencia de los senósidos A y B (equivalentes a 16 mg. de senósidos como sales de calcio), transferir a un vaso de precipitado de 250 ml. y adicionar poco a poco 75 ml. de ácido acético glacial y mantener con calentamiento de 50°C - 70°C y agitación constante durante 15 minutos.

Enfriar y transferir a un matríz volumétrico de 200 ml. aforar con ácido acético glacial, mezclar y dejar reposar para que las partículas no solubles sedimenten.

3. Preparación de la Muestra

Triturar 20 tabletas (placebo) hasta lograr un polvo fino, pesar el equivalente a 16 mg. de senósidos A y B (alrededor de 360 mg. de polvo fino) transferir esto a un vaso de precipitado de 250 ml. Adicionar poco a poco 75 ml. de ácido acético glacial y mantener con calentamiento (50°C - 70°C) y agitación constante durante un período de 15 minutos, enfriar y transferir a un matríz volumétrico de 200 ml. aforar con ácido acético glacial, dejar reposar para que sedimenten las partículas no solubles, filtrar y eliminar los primeros 20 ml. del filtrado.

4. Procedimiento

Transferir por separado 3 ml. de cada una de las soluciones (estándar y muestra) y 3 ml. de ácido acético glacial como blanco a matraces de Iodo (ámbar), adicionar a cada matríz 7 ml. de ácido acético glacial y 10 ml. de reactivo y mezclar, tapar los matraces y calentar a $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 25 minutos, enfriar y determinar la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 574 nm.

NOTA: Ya que es demasiado inestable el compuesto formado, es necesario protegerlo de la luz durante la determinación de la absorbancia y hacerlo antes de 15 minutos.

C. VALIDACION

Los parámetros analíticos para la validación del método fueron evaluados de la siguiente manera:

1.- Linealidad del sistema

Se determinó construyendo una curva de calibración; concentración vs. respuesta medida (absorbancia) de una misma solución estándar de senósido A y B utilizando cinco diluciones preparadas a partir de ésta solución patrón y se hizo el análisis por duplicado para cada dilución.

En estas diluciones se incluyó la concentración seleccionada como 100%, probando una serie de concentraciones entre el rango de 2 a 12 mcg/ml.

2. Linealidad del Método

Se determinó con placebos cargados del principio activo, cada uno de manera independiente a tres diferentes porcentajes de concentración (60%, 100% y 120%) de senósidos A y B tomando como 100% a 16 mg. que es el valor estipulado en el marbete.

3. Precisión.

a) **Repetibilidad.** Se determinó con los mismos datos establecidos para linealidad del método.

b) **Reproducibilidad.** Se llevó acabo con dos analistas, en dos días diferentes realizando 3 determinaciones por analista.

Se trabajó de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto con una concentración al 100% (16 mg.) de senósidos A y B correspondiente a la concentración estipulada en el marbete.

4. Exactitud del Método

Se determinó analizando 6 placebos cargados con la concentración al 100% (16 mg.) de senósidos A y B correspondiente al valor del 100% estipulado en el marbele. ;

5. Especificidad ante Excipientes.

Se determinó valorando mediante el método propuesto; por duplicado tres tipos de muestra: 1) placebo (excipientes), 2) placebo adicionado (excipientes más estándar) y 3) patrón de referencia.

VII RESULTADOS

VII. RESULTADOS

a. Linealidad del Sistema.

TABLA No. 4
ABSORBANCIA DE CINCO DILUCIONES DE UNA
SOLUCION PATRON DE SENOSIDOS A y B ESTANDAR

Diluir en 100 ml Volumenes	Concentración mcg/ml	Absorbancias Obtenidas	Promedio de Absorbancias
15	12.5	0.8 0.81	0.8
12	10.0	0.65 0.66	0.65
9	7.5	0.5 0.51	0.5
6	5.0	0.25 0.26	0.25
3	2.5	0.15 0.16	0.15

De la tabla No. 4 se obtuvieron los siguientes resultados bajo un tratamiento estadístico utilizándose las fórmulas descritas en el apéndice.

PARAMETROS ESTADISTICOS

ORDENADA AL ORIGEN (b)	0.04507
PENDIENTE (m)	0.0680
COEFICIENTE DE CORRELACION (r)	0.9932

B. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

TABLA No. 5
RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR
LA LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO ESPECTROFOTOMETRICO
PARA CUANTIFICAR SENOSIDOS A y B.

POR CIENTO ADICIONADO	POR CIENTO RECUPERADO
120	120.74
120	120.74
120	118.60
100	98.64
100	100.69
100	100.69
60	59.36
60	59.36
60	61.27

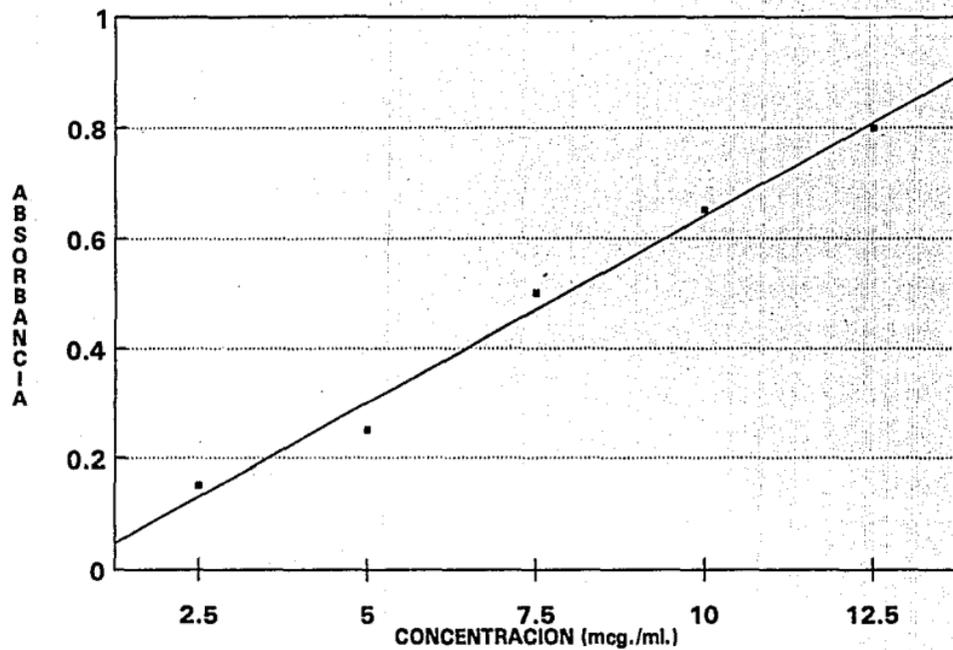
De la tabla No. 5 se obtuvieron los siguientes resultados, bajo un tratamiento estadístico utilizándose las fórmulas descritas en el Apéndice.

PARAMETROS ESTADISTICOS

ORDENADA AL ORIGEN (b)	0.0075
PENDIENTE (m)	0.9999
COEFICIENTE DE CORRELACION (r)	0.9999

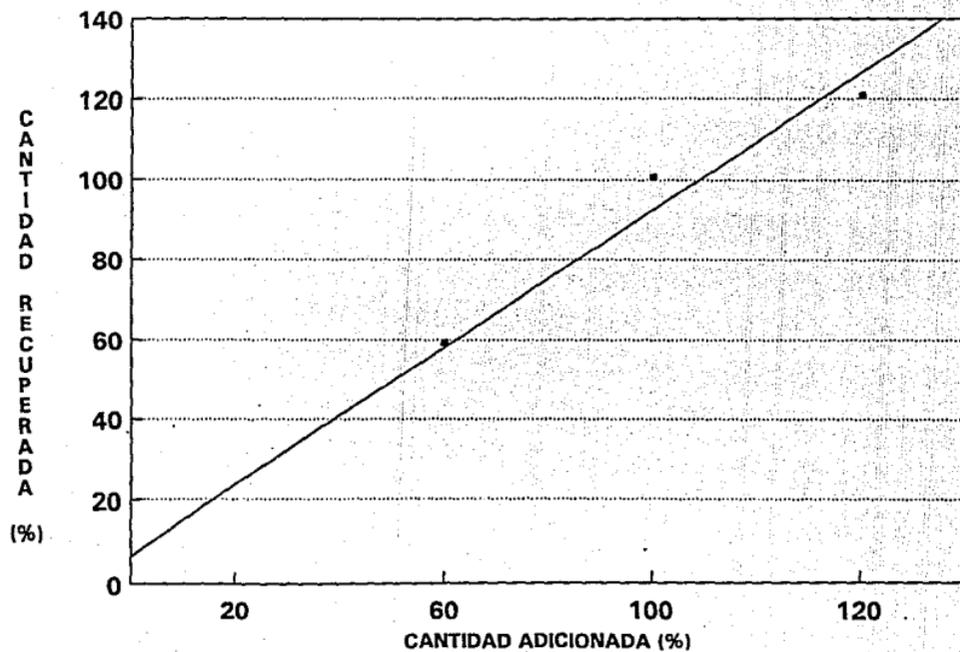
GRAFICA 1

LINEALIDAD DEL SISTEMA



FUENTE: Datos obtenidos de la tabla 4

GRAFICA 2
LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO



FUENTE: Datos obtenidos de la tabla 5

a. Intervalos de Confianza para la pendiente y la ordenada al origen

Intervalo de confianza para (m)

$$0.9664 < 0.999 < 1.04955$$

Intervalo de confianza para (b)

$$-5.7227 < 0.0075 < 5.6999$$

b. Prueba estadística de contraste de hipótesis para la pendiente t-estudent.

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

$$\alpha = 0.05$$

$$t_{tab} = 2.3$$

$$t_{calc} = 0.004$$

Area de aceptación de H_0 : $(t_{\alpha/2} = -2.3 - t_{1-\alpha/2} = 2.3)$

c. Prueba estadística de contraste de hipótesis para la ordenada al origen t-estudent.

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

$$\alpha = 0.05$$

$$t_{tab} = 2.3$$

$$t_{calc} = 2.7719 \times 10^{-4}$$

Area de aceptación de $H_0 = (t_{\alpha/2} = -2.3 \text{ } -t_{1-\alpha/2} = 2.3)$

El método se considera lineal, puesto que el análisis estadístico demostró que la pendiente puede considerarse como 1 (uno) y la ordenada al origen puede considerarse como cero. Además los parámetros del punto a. cumplen con los criterios estadísticos de aceptación.

C. PRECISION DEL METODO ANALITICO

1. REPETIBILIDAD

TABLA No. 6
PORCENTAJE DE RECUPERACION DE PLACEBOS CARGADOS
A DIFERENTES NIVELES DE SENOSIDOS A y B

PORCENTAJE ADICIONADO	PORCENTAJE RECUPERADO	PORCENTAJE DE RECOBRO
120	120.74	100.61
120	120.74	100.61
120	118.6	98.71
100	98.64	98.64
100	100.69	100.69
100	100.69	100.69
60	59.36	98.93
60	59.36	98.93
60	61.27	102.11

a. Evaluación estadística de la precisión del método.

PARAMETROS ESTADISTICOS

MEDIA \bar{X}	99.991
DESVIACION ESTANDAR D.E.	1.152
COEFICIENTE DE VARIACION C.V.	1.474
VARIANZA POBLACIONAL σ^2	1.222

Cálculos de precisión.

Tenemos una:

$$\bar{X} = 99.99$$

$$S = 1.15235$$

Como $H_0 \leq 1.5$

$$H_a > 1.5$$

Con $\alpha = 0.05\%$

y grados de libertad $n - 1 = 9$

Así tenemos una:

$$\chi^2_{\text{cálculo}} = 7.5427$$

$$\chi^2_{\text{tablas}} = 17.535$$

Area de aceptación

$$\chi^2_{\text{cálculo}} \leq \chi^2_{\text{tablas}}$$

$$7.5427 < 17.535$$

Por lo tanto se acepta H_0 y se concluye que el método es preciso teniendo una variación menor del 1.5% por ciento.

2. PRECISION DEL METODO

TABLA No. 7
PORCENTAJE DE RECOBRO DE MUESTRAS HOMOGENEAS
DEL PRODUCTO CON UNA CONCENTRACION AL 100%.

ANALISTA/DIA	1	2
1	98.9	98.5
	100.5	101.1
	100.3	96.9
2	101.8	97.9
	100.7	100.0
	101.5	99.

1. Evaluación estadística de la reproducibilidad

$$\text{MEDIA } \bar{X} = 99.77$$

$$\text{D.E.} = 1.444$$

$$\text{CV} = 1.4473$$

a. Prueba de contraste de hipótesis F (Fisher)

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a : \mu_1 \neq \mu_2$$

Evaluación del efecto entre analistas

H_0 = No hay diferencia en el por ciento de recobro obtenido entre analistas.

H_a = Existe diferencia en el por ciento de recobro obtenido entre analistas.

TABLA No. 8
ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	"F" de Cálculo	"F" de Tablas $\alpha = 0.05$
Analista	1	8.4983	8.4983	1.6768	5.32
Día	1	1.9983	1.9983	0.3942	5.32
Analista-Día	1	1.14	1.14	0.2249	5.32
Error	8	40.55	5.068	---	---

Regla de decisión:

Si F calculada $<$ F de tablas no se rechaza H_0 y por lo tanto no existe diferencia en los porcentajes de recobro obtenidos por cada analista. Sin embargo si F calculada $>$ F de tablas, se rechaza H_0 y entonces existe diferencia en los porcentajes de recobro obtenidos por los analistas.

Debido a que $1.6768 < 5.32$, no se rechaza H_0 y se considera que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos por los analistas.

b. Evaluación del efecto entre los días en que se realizó la determinación.

H_0 = No hay diferencia en el porcentaje de recobro obtenido en los diferentes días.

H_a = Si hay diferencia en el porcentaje de recobro obtenido en los diferentes días.

Regla de decisión:

Si, F calculada $< F$ de tablas, no existe diferencia en los porcentajes de recobro obtenidos entre el primero y segundo día en que se realizarán las determinaciones; pero sí, F calculada $> F$ de tablas, existe efecto en los porcentajes de recobro obtenidos entre el primero y segundo día en que se realizaron las determinaciones.

Como se obtuvo, $0.3942 < 5.32$, No se rechaza H_0 , por lo que se considera que no existe efecto por parte del día en el que se realizaron los análisis.

c. Evaluación del efecto entre Analistas y Días en que fue realizado el análisis.

H_0 : No hay diferencia en los porcentajes de recobro obtenidos por los analistas en días diferentes.

H_a : Existe diferencia en los porcentajes de recobro obtenidos por los analistas en diferentes días.

Reglas de decisión:

Si F calculada $< F$ de tablas no existe diferencia significativa por los porcentajes de recobro obtenidos por los analistas en diferentes; por lo contrario si F calculada $> F$ de tablas existe diferencia significativa en los porcentajes de recobro obtenidos.

Dado que se obtuvo $0.2249 < 5.32$ no se rechaza H_0 por lo que se considera que no existe efecto ni por parte del día ni de los analistas que realizaron el análisis.

D. EXACTITUD DEL METODO

TABLA No. 9
PORCENTAJE DE RECOBRO DE PLACEBOS
DE SENOSIDOS A y B AL 100.00%.

PORCENTAJE ADICIONADO	PORCENTAJE DE RECOBRO
100	99.19
100	99.19
100	99.19
100	101.21
100	101.21
100	101.21

1. EVALUACION ESTADISTICA DE LA EXACTITUD DEL METODO.

Media \bar{X} = 100.2 %

Desviación
Estandar DE = 1.1063

Coficiente
de variación CV = 1.1

Intervalo IC
de confianza = (99.20 -101.24)

a. Prueba de contraste de hipótesis t - estudent

$$H_0 = \mu = 100.00 \%$$

$$H_a = \mu = 100.00 \%$$

$$t \text{ calculada} = 0.4428$$

$$t \text{ de tablas} = 2.3$$

Area de aceptación de H_0 :

$$(t_{\alpha/2} = -2.3 \text{ --- } t_{1-\alpha/2} = 2.3)$$

$$\alpha = 0.05\%$$

El método se considera exacto al 100%, puesto que cumple con los criterios de aceptación correspondientes.

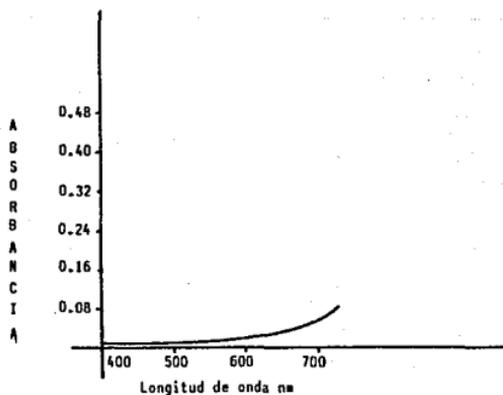
E. ESPECIFICIDAD

TABLA No. 10

RESULTADOS DE LA ESPECIFICIDAD PARA SENOSIDOS A y B

MUESTRA	ABSORBANCIA
Patrón de referencia	0.462
	0.461
Placebo cargado	0.428
	0.425
Placebo	0.007
	0.006

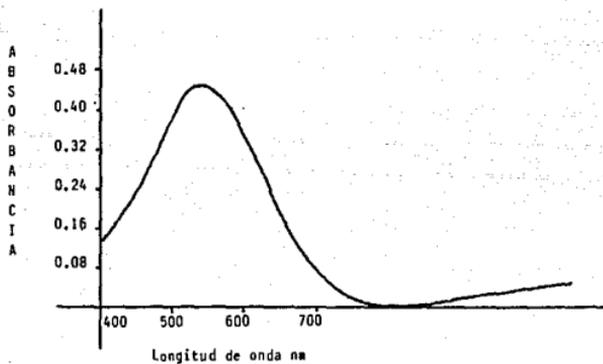
De los resultados de la tabla anterior se obtiene una interferencia de los excipientes equivalentes al 1.5%.



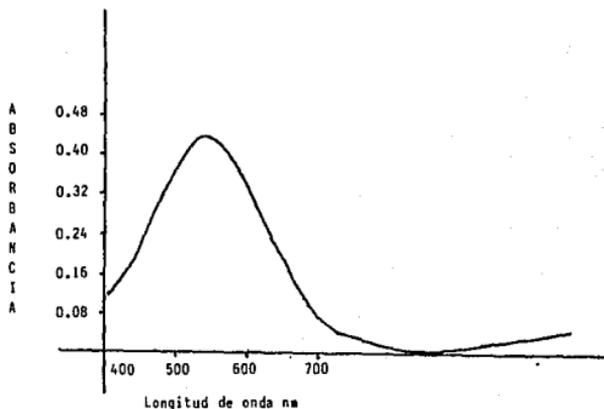
GRAFICA 3

Espectro de absorción del placebo para determinar la especificidad del método

GRAFICA 4
Espectros de absorción de senósidos A y B (muestra de referencia)
concentración 16 mg/ml para determinar la especificidad del Método



GRAFICA 5
Espectro de absorción del placebo cargado (utilizando el procedimiento
de filtrado con el método propuesto), para determinar especificidad del método



VIII ANALISIS DE RESULTADOS

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

El método espectrofotométrico establecido en la U.S.P. XX para cuantificar Senósidos A y B, en la forma farmacéutica de tabletas se adecuó a las condiciones de laboratorio, debido a que los excipientes de la formulación interferían en la cuantificación, esto fue resuelto eliminándolos durante la fase de filtrado.

Además durante la determinación, el tiempo de reacción fue de 15 minutos antes de la lectura al espectrofotómetro; porque se detectaron reacciones fotométricas al determinar los cambios en la absorbancia con respecto al tiempo, por lo que fue necesario proteger a él compuesto de la luz.

Para determinar la confiabilidad del método de análisis propuesto se validó el mismo primeramente a través de la estimación de la linealidad del sistema, el cual, en nuestro caso lo representaban las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro; se hizo una curva estándar con un rango de concentración de 2-16 mcg/ml, que demostró ser directamente proporcional a la relación de mcg adicionados y absorbancia obtenida, esto se evaluó con respecto al estándar obteniendo una pendiente diferente a 0 de 0.068 ya que las variables manejadas fueron distintas, la correlación obtenida fue aproximadamente igual a 1 de 0.9932

Se dice que un método de análisis es lineal si su representación gráfica se aproxima a una línea recta, su coeficiente de correlación se aproxima a uno, la pendiente a uno y su coeficiente de variación es menor al 1.5%.

En la medición de la linealidad del método, como se puede observar en la tabla No. 5 se obtuvo una pendiente con valor muy cercano a 1 de 0.999, una ordenada al origen con un valor próximo a 0 de 0.0075 y un coeficiente de correlación casi igual a 1 de 0.9982, estos nos indica que la respuesta entre los mg agregados y los mg encontrados es lineal a las concentraciones trabajadas.

En cuanto a la repetibilidad se utilizaron los resultados de la tabla No. 6 la evaluación estadística y el estadígrafo de contraste nos indica que el método es preciso debido a que χ_i^2 calculada, es menor que χ_i^2 de tablas. Se observa que la desviación estándar de 1.2%, es menor al 2 % por lo que el método analítico posee una variación en sus recobros menor al 2%.

La reproducibilidad, se evaluó probando a través de un diseño completamente al azar para los factores analista (A_i) y día (D_{ij}). Cada uno de los tratamientos fué evaluado mediante el análisis de lotes independientes con tres replicaciones por tratamiento y trabajando a la concentración estipulada en el marbete al 100%. El análisis de varianza correspondiente mostró no presentar efecto significativo para el analista ni para el día y no existió tampoco efecto por la interacción día-analista por lo que se puede considerar el método propuesto como reproducible.

Para la prueba de exactitud del método analítico se llevo a cabo la preparación de placebos cargados con el equivalente al 100% de principio activo en la tabla No. 7 se evaluó con el porcentaje recuperado, por medio de la evaluación estadística y comparando con el estadígrafo de contraste t de student, el método es exacto por ser menor $t_{calc.}$ que $t_{tab.}$ se demostró que la media de recuperación es equivalente al 100%, empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Para la especificidad frente a excipientes se hicieron placebos y placebos cargados, y se trataron junto a un patrón de referencia como lo indica la técnica analítica. Los resultados indican una interferencia de los excipientes de el 1.5%, por lo que el valor no se considera significativo por ser un método para control de calidad. En pruebas de rutina, como producto terminado.

CONCLUSIONES

El método analítico espectrofotométrico para cuantificar Senósidos A y B en la forma farmacéutica de tabletas de la U.S.P. XX que se adaptó a las condiciones de trabajo existentes en el laboratorio, fue **valido**, a través de la evaluación de los siguientes parámetros:

- 1) linealidad del sistema
- 2) linealidad del método
- 3) exactitud
- 4) precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
- 5) especificidad.

Este último parámetro se realizó frente a excipientes, por lo que se puede utilizar sólo como método de control de calidad en producto terminado, bajo las mismas condiciones de trabajo empleadas en la validación del método.

De el procesamiento y evaluación estadística de los resultados obtenidos se concluye que el método es en los rangos de concentraciones trabajadas. Lineal, Preciso, exacto y específico. Obteniéndose la comprobación de la hipótesis planteada y base para la realización de la investigación realizada y cuyos resultados se presentan en el interior del presente trabajo cumpliendo así el doble objetivo de contribuir al buen desarrollo y desempeño de las actividades empresariales en el campo de la Industria Farmacéutica Nacional, a la vez de realizar el trabajo de titulación.

BIBLIOGRAFIA

- 1) The United States Pharmacopeia, 20 th. Ed. Mack Publishing Co., Easton, P. 722-723 (1985).
- 2) Vanderwielen, A. J. and Hardwidas, A.E. "Guidelines for Assay Validation". Pharmaceutical Technology; (7), 21-24 (1982).
- 3) Cavenoghi, et. al; "Statistical evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of medicines; "Drug Developmente and Industrial J. Pharmacy"; 13 (14) 2571-2595 (1987).
- 4) Taylor John K. "Validation of analytical Methods" Anal. Chem. 55 (6) 600-608 (1983).
- 5) "Validation concepts proceding of management" Conference for Pharmaceutical Industry, Purve University West. Lafayette Indiana, USA. (1978).
- 6) Fontani, F.; "Criteri di convalida del metodi d' analisis" Boll. Chim. Pharm. 126 (2) (1987) 66-74.
- 7) Guerra. J.; "Validation of analytical methods by FDA "laboratories". "Pharmaceutical Techonology; 10 (3) 76-82 (1986).

- 8) Resumen de congresos "Validación de métodos analíticos". México, por AFM (1985).
- 9) Higuchi T; Brochman Hansen. "Pharmaceutical Analysis", Interscience publishers New York 321-329. (1961)
- 10) Kilthff. Et al. Treatise on Analytical Chemistry. 1 Atomic and Molecular structure 2nd edition. Elsevier publishing Co. Amsterdam (1962).
- 11) Poor, T.J. "Double-Wavelength spectroscopy" Analytical Chemistry 55 (6) (1985).
- 12) R.E. Kirk y D. F. Othmer Enciclopedia de Tecnología Química Tomo I I I, catarticos Uteha México (1961) 879-881.
- 13) The United States Pharmacopeia, 19th ed; Mark Publishing Co; Easton. 1975. pa. 959.
- 14) Loftus B.T., and Nash T.A. "Pharmaceutical procesa validation". Ed. Marcel Dekker Inc. N.Y. (1984). p. 251-255.
- 15) Lachman L. and Liberman, HA (Edits). The Teory and Practice of Industrial Pharmacy, 2a. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. 1976.
- 16) Olu según Oluwole. J. Pharm. Sci. 70, 727, (1981).

- 17) Benrych C., Chem abstr, 104 863 (1986)
- 18) Bernard V. Christensen, J. American Pharm. Assoc. 38, 652, (1949).
- 19) Remington, B.D. ETal "Estadística Biométrica y Sanitaria". 1er. edición, Prentice/Hall Internacional; España, 1974 pp. 113, 117, 145, 151, 575; (1988).
- 20) Goodman y Gilman; "Las bases de la Terapéutica"; 7a. Edición; Editorial Médica Panamericana; México, pág. 1050. (1986)
- 21) Brithish Pharmacopoeia (B.P.) pág. 419. (1988)
- 22) "Métodos Análiticos Validación" Ed. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud. México, 1991.
- 23) Bernard V. Christensen. "A New Spectrophotometric. Method of Assay for Alexandria Senna Leaves" J. American Pharm. Assoc., 38, 589, (1949)
- 24) Martti Marvola, et, al, "The effect of raw material purity on the acute toxicity and laxative effect of sennosides" J. Pharm Pharmacol. 33, 108-109, 1981.
- 25) Fairbairn and Saleh J. Pharm Pharmacol. 3, 918, 1951.
- 26) Clark, "Applied Pharmacology", 8ª Edition. Churchill, London, p. 455, 1972.

ANEXO

1. Significado de los términos estadísticos empleados

a. Contraste de hipótesis.

H_0	<i>Hipótesis nula</i>
H_a	<i>Hipótesis alterna</i>
χ^2	<i>Prueba estadística de contraste "Chi" cuadrada</i>
F	<i>Prueba estadística de contraste "F" Fisher</i>
<i>t-student</i>	<i>Prueba estadística de contraste "E" student</i>
gl	<i>Grados de libertad</i>
α	<i>Nivel de significancia</i>

b. Regresión lineal

b	<i>Ordenada al origen</i>
m	<i>Pendiente</i>
r	<i>Coefficiente de correlación</i>
r^2	<i>Coefficiente de determinación</i>
X_n	<i>Variable independiente enésima</i>
Y_n	<i>Variable dependiente enésima</i>

c. Términos estadísticos

CV	Coefficiente de variación
\bar{X} %	Media aritmética del porcentaje de recobro
IC	Intervalo de confianza
DE	Desviación estándar
n	Número de datos

2. Cálculos requeridos para obtener los datos de los parámetros de validación y sus criterios estadísticos de aceptación.

a. Linealidad del sistema

Cálculos requeridos ΣX , ΣY , ΣY^2 , ΣX^2 , ΣXY , DE.

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

$$b = \frac{\Sigma Y - m(\Sigma X)}{n}$$

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

$$CV = \frac{DE \cdot 100}{\bar{x} \%}$$

$$DE = \frac{(\sum X_n - \bar{X} \%)^2}{n}$$

Criterio si el sistema cumple con las siguientes condiciones será lineal:

$$CV \leq 1.50\%$$

$$R \geq 0.99$$

$$R^2 \geq 1.00$$

$$m = 1.00$$

$$b = 0.00$$

b. Precisión del sistema. criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5 \%$$

c. Exactitud al 100%.

$$PR = \frac{\text{Cantidad recuperada} * 100}{\text{Cantidad adicionada}}$$

$$PR = \text{Porcentaje recuperado}$$

$$\bar{X} \% = \frac{\sum PR \cdot n}{n}$$

$$PR \cdot n = \text{Porcentaje recuperado enésimo}$$

$$DE = \frac{(\sum(X_i - \bar{X}\%)^2)^{1/2}}{n}$$

a) Intervalo de confianza

$$IC = \bar{X}\% \pm t_{\alpha/2} DE n^{1/2}$$

Donde:

$\bar{X}\%$ = Media del porcentaje recuperado

$t_{\alpha/2}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste con una probabilidad acumulada de 0.975

n = Número de datos

b) Coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE \cdot 100}{\bar{X}\%}$$

c) Por medio de la prueba de contraste de hipótesis t-estudent

$H_0 \mu = 100.00\%$. La media del porcentaje recuperado es igual al 100%

$H_a \mu = 100.00\%$. La media del porcentaje de recobro es diferente del 100%

Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ calc} = \frac{\bar{X} \% - \mu}{DE / (n)^{-1/2}}$$

Donde:

t calc = valor calculado del estadígrafo de contraste

$\bar{X} \%$ = Media poblacional del porcentaje de recobro

DE = Desviación estándar

μ = Media poblacional

n = Número de datos

t tab = Valor teórico del estadígrafo de contraste a un nivel de significancia de 0.975 con *n* - 1 grados de libertad.

Criterios de aceptación: Si el método cumple con lo siguiente se llamará lineal.

+ El intervalo de confianza para la media debe incluir al 100.00%

+ El coeficiente de variación $\leq 3.0\%$

+ El promedio de recobro debe estar en el intervalo de 97.0% - 103.0%

+ En la prueba de contraste de hipótesis para la media $t \text{ calc} \leq t \text{ tab}$.

d. Precisión del método (repetibilidad)

1) Por medio del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE * 100}{\bar{X} \%}$$

Donde:

DE = Desviación estándar del porcentaje recuperado

$\bar{X}\%$ = Media aritmética del porcentaje recuperado

2) Por medio de la prueba de contraste de hipótesis χ^2 .

Ho $\sigma^2 < 3.0\%$. La varianza es menor o igual al 3.9%

Ha $\sigma^2 > 3.0\%$. La varianza es mayor del 3.0%

Estadígrafo de contraste.

$$\chi^2 \text{ calc} = \frac{(n-1) DE^2}{\sigma^2}$$

Donde:

$\chi^2 \text{ calc}$ = Valor calculado del estadígrafo de contraste

n = Número total de datos

DE² = Varianza del porcentaje de recobro

σ^2 = Varianza poblacional

$\chi^2 \text{ tab}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste con una probabilidad

acumulada de 0.975 y $n - 1$ grados de libertad.

Criterio: Si el método cumple con lo siguiente se llamará repetible.

- + El coeficiente de variación $\leq 3.0\%$
- + El promedio de recobro debe encontrarse en un intervalo de 97.0% - 103.0%
- + El valor del estadígrafo de contraste calculado debe encontrarse en el intervalo:
 $\chi^2_{\alpha/2} < \chi^2_{\text{calc}} \leq \chi^2_{1-\alpha/2}$ tablas

e. Precisión del método (reproducibilidad)

1) Por medio del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE * 100}{\bar{X} \%}$$

2) Por medio de la prueba estadística de contraste de hipótesis F.

Esta prueba se emplea para establecer la fuente de variación del método, pero constituye un requisito mínimo dentro de la validación.

La prueba se aplica para el caso particular del análisis de dos analistas en dos días diferentes y con tres replicaciones cada uno.

El modelo hipotético es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + E_k(ij)$$

Donde:

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la k-ésima muestra analizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

A_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$)

D_j = Efecto del día analizado en el analista (donde $j = 1 \dots d$)

$E_k(ij)$ = Error del método analítico (donde $j = 1 \dots d$)

a = Número de analistas (donde $a = 2$)

d = Número de días (donde $d = 2$)

r = Número de replicaciones ($r = 3$)

Procedimiento

1) Tabular los resultados de acuerdo al siguiente formato:

	Analista 1	Analista 2
Día 1	Y111	Y221
	Y112	Y212
	Y113	Y213
Día 2	Y121	Y221
	Y122	Y222
	Y123	Y223

Cálculos preliminares.

1. Calcular la suma de las combinaciones analista-día (Y_{ij})

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{13} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{14} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

2. Calcular la suma para cada analista (Y_i)

$$Y_1 = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_2 = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

3. Calcular la suma total ($Y_{...}$)

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

4. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$\sum \sum Y_{2ij}^2 = (Y_{11.})^2 + (Y_{12.})^2 + (Y_{21.})^2 + (Y_{22.})^2$$

5. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$(\sum Y_{.})^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2$$

6. Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado.

$$\sum \sum \sum Y_{2ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + \dots + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

7. Calcular la suma de los cuadrados del analista (SC_a), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SC_a = \frac{\sum Y_{2i.}^2}{dr} - \frac{Y_{2..}^2}{adr}$$

8. Calcular la suma de los cuadrados del día analizado con el analista (SC_d).

$$SC_d = \frac{\sum \sum (Y_{ij})^2}{r} - \frac{\sum (Y_{i.})^2}{dr}$$

9. Calcular la suma de los cuadrados del error (SC e) con la siguiente fórmula:

$$SC_e = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{.j.}^2}{f}$$

El modelo para el análisis de varianza es:

$$Y_{kij} = \mu + A_k + D_j + (AD)_{kj} + E_{j(ki)}$$

El criterio de aceptación se muestra enseguida:

f.v.	g-1	SC	M.C	Fcal	F teórica
Analista A _i	a-1	SCA	SCA/gIA	MCA/MCE	F de tablas para $\alpha = 0.05$
Día d _i	b-1	SCD	SCD/gID	MCD/MCE	g.1 = 1,8
Interacción AD _(ki)	ab-a-b+1	SCAD	SCAD/gIAD	MCAD/MCE	
Error Experimental E _{j(ki)}	abr-ab	SCE	SCE/gIE		

TABLA V. Tabla de análisis de varianza

Este es el modelo para un análisis de varianza con dos variables (analista y día), empleando un sistema completamente al azar con factores independientes o cruzados.

Criterios. Si el método cumple con lo siguiente se llamará reproducible.

- + El coeficiente de variación $\leq 3.0\%$
- + En la prueba estadística de contraste de hipótesis (ANAEVA) se debe cumplir:

$F_a < F_{gla, gld, 0.05}$	El método es reproducible por los analistas.
$F_a < F_{gld, gle, 0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.
$F_d < F_{gld, gle, 0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

f. Linealidad del método.

- 1) Pruebas estadísticas para cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.

Calcular m , b , r , r^2 , CV , R . como en la linealidad del sistema.

- 2). Prueba de contraste de hipótesis para la pendiente.

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc.}} = \frac{(m-M) (DE_{y/x}) (n-1)^{-1/2}}{DE_{y/x}}$$

t calc = valor calculado del estadígrafo de contraste

m = Pendiente de la recta

M = Valor teórico de la pendiente

n = Número de datos

DE_{y/x} = Desviación estándar

a) Intervalo de confianza al 95%.

$$m = t_{\alpha/2} \frac{DE_{y/x}}{DE_x (n-1)^{-1/2}}$$

Donde:

m = Pendiente de la recta

t_{α/2} = Valor teórico del estadígrafo de contraste con n - 2 grados de libertad y una probabilidad acumulada de α/2.

DE_x = Desviación estándar

n = Número de datos

3) Contraste de hipótesis para la ordenada al origen

Ho : a = 0 El valor de la ordenada al origen es cero

Ha : a ≠ 0 El valor de la ordenada al origen es diferente de cero.

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc}} = \frac{b - B}{DE_{y/x} (\sum X^2)^{-1/2} / n \sum (X_i - \bar{X})^2}$$

Donde:

b = Pendiente de la recta

B = Valor teórico de la pendiente de la recta igual a cero.

a) Intervalo de confianza al 95.0%.

$$b = t_{\alpha/2} DE_{y/x} (\sum X^2)^{-1/2} / n \sum (X_i - \bar{X})^2$$

Donde:

b = Ordenada al origen calculada

$t_{\alpha/2}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste con $n - 2$ grados de libertad y probabilidad acumulada de $\alpha/2$

n = Número de datos

Criterios de aceptación:

Curva de linealidad; cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$r = 0.99$$

$$r^2 = 0.98$$

$$CV = 3.0\%$$

$$R = 95.0\% - 103.0\%$$

2) Prueba de contraste de hipótesis para la pendiente

La pendiente de la recta se considera con valor 1 si:

$$t \text{ calc } t (0.975, n-2 \text{ gl})$$

$$t \text{ calc } t (0.995, n-2 \text{ gl})$$

Para intervalo de confianza al 95%

El intervalo de confianza debe incluir al valor 1

3) Prueba de contraste de hipótesis para la ordenada al origen.

La ordenada al origen de la recta de regresión se considera con valor de cero si:

$$t \text{ calc } t (0.975, n-2 \text{ gl})$$

$$t \text{ calc } t (0.995, n-2 \text{ gl})$$

Para el intervalo de confianza al 95%

El intervalo de confianza debe incluir el valor cero.