



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ALBENDAZOL, EN UNA PRESENTACIÓN
FARMACÉUTICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SANDRA ROCÍO MEDINA MORALES



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Villanueva González Pedro
VOCAL	Prof. Alpizar Ramos María del Socorro
SECRETARIO	Prof. Fuentes Sixtos Honoria
1er. SUPLENTE	Prof. Rueda Espinosa Martín
2º. SUPLENTE	Prof. Rodríguez Fernández Thalina Alejandra

Lugar donde se realizó la tesis:

FACULTAD DE QUÍMICA
LABORATORIO 3-D DE QUÍMICA ANALÍTICA

Pedro Villanueva González

Sandra Rocío Medina Morales

DEDICATORIAS.

A mis padres: **COLUMBA MORALES ZANE Y FELIPE MEDINA REYES**, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindados en las derrotas y logros obtenidos, haciendo de éste, un triunfo más suyo que mío, por la forma en la que hemos compartido y sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.

Con amor, admiración y todo mi cariño

¡MIL GRACIAS!

A mis hermanos: **NANCY L. MEDINA MORALES Y JUAN J. MEDINA MORALES**, con los que he compartido alegrías, tristezas y peleas, los cuales nos han enseñado a valorar una familia y a estar siempre juntos, gracias por su apoyo, los quiero mucho.

A mis abuelitos: **JOSÉ MORALES, JUAN MEDINA Y HERMELINDA REYES**, donde quieran que estén, siempre están presentes en mis recuerdos y corazón.

A mi abuelita **ESPERANZA**, que aunque casi no puedo visitarla, siempre esta presente en mí.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**,

Por su azul y oro
Lucharemos sin cesar
Cubriendo así de gloria
Su nombre inmortal
¡¡México, Pumas, Universidad!!
¡MIL GRACIAS!

DEDICATORIAS.

En especial al profesor **PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ**, por la elaboración de esta tesis, por brindarme su tiempo y valiosa amistad. ¡Gracias por escucharme!

A las profesoras Alpizar Ramos María del Socorro y Fuentes Sixtos Honoria, por la revisión y realización de esta tesis.

A mis queridas profesoras Yolanda Caballero Arrollo y Rosa L. Cornejo Rojas, con las que trabaje muy feliz durante estancias, en el departamento de química orgánica.

A mi querida amiga Q.F.B. Claudia Körber, Olga y Q.F.B. Fernando Delgado por el apoyo brindado durante mi estancia en la procuraduría.

A mis amigos de la facultad, que aunque ya casi no los veo siempre los recuerdo, mi querido Jorge Morhi, Rocío Belmont, Teresa Sánchez, Sonia Reyes, Rafael Vilchis, Inés Martínez, Leopoldo Parada, Genaro Ruiz, Alberto Duran, Iván Dávalos, Esther Méndez y Alfonso, Nancy Vaquero, Azalia, Imelda, Rosa, Claudia M., Alejandro M., gracias por su amistad y sus consejos.

A los relagientos de Protein Apotex, Claudia Marín, Perla Magos, Rocío Guzmán, Blanca Arredondo, Miguel Palma, Mario Mendoza, Alejandro Navarro, Raúl Cruz, Miguel Bernal, Margarito Morales, Ignacio Gutiérrez y a mis queridos chiquitines Dalila Pacheco, Raúl Gaspar, gracias por aprender y divertirme con ustedes.

ÍNDICE.

	Página
1. Introducción	1
2. Definiciones	3
3. Símbolos y abreviaturas	6
4. Antecedentes	7
5. Parte experimental	27
6. Resultados	37
7. Análisis de resultados	59
8. Conclusiones	63
9. Bibliografía	65
10. Anexos	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

	Página
GRÁFICO 1. Absorbancia en función de la concentración	39
GRÁFICO 2. Absorbancia del analito y placebo adicionado	40
GRÁFICO 3. Cantidad recuperada para cada nivel	45
GRÁFICO 4. % de recobro obtenido de las diferentes condiciones de almacenaje	55

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
TABLA 1. Precisión del sistema	38
TABLA 2. Linealidad del sistema	38
TABLA 3. Promedios de absorbancia para cada nivel de concentración	39
TABLA 4. Especificidad	40
TABLA 5. Exactitud y Repetibilidad del método	41
TABLA 6. Linealidad del método	43
TABLA 7. Cantidad adicionada-cantidad recuperada, de linealidad del método	43
TABLA 8. Promedio de mg de cantidad adicionada-cantidad recuperada de linealidad del método	45
TABLA 9. % de recobro de linealidad del método	46
TABLA 10. Analista 1, día uno	47
TABLA 11. Analista 2, día uno	48
TABLA 12. Analista 1, día dos	49
TABLA 13. Analista 2, día dos	50
TABLA 14. Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista	51
TABLA 15. Estabilidad analítica de la muestra	52
TABLA 16. % de recobro de estabilidad analítica de la muestra	54
TABLA 17. % de recobro de las condiciones de almacenaje en los diferentes tiempos	55
TABLA 18. Análisis de tabletas del Producto I	56
TABLA 19. Análisis de tabletas del Producto II	56

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, para tener éxito, es necesario ser competitivos y brindar servicios de calidad, por lo cual se debe estar a la altura de cualquier reto y poder solucionarlo. Cuando se tienen interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición apropiada, por lo tanto la validación de métodos analíticos es parte fundamental en el desarrollo y análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que durante su análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado y reúne atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con especificaciones oficiales establecidas.

En el presente trabajo se realiza un estudio de muestras de albendazol el cual en un medio acuoso alcalino absorbe a una longitud de onda de 309 nm, entre los parámetros mínimos generales que se realizan para el proceso de validación del método analítico están: precisión, linealidad y especificidad del sistema; exactitud, linealidad, estabilidad analítica de la muestra, precisión intermedia o tolerancia intermedia / analista del método. Cada prueba debe cumplir con el criterio de aceptación establecido, y posteriormente se aplicara al análisis de productos farmacéuticos comerciales en presentación tabletas.

OBJETIVOS:

- Diseñar y desarrollar una metodología analítica basada en las propiedades físicas y químicas del principio activo, utilizando espectroscopia UV.
- Validar el método analítico diseñado, para ser utilizado como indicador de la calidad de un producto comercial.
- Analizar muestras farmacéuticas comerciales, en presentación tabletas.

2. DEFINICIONES

Analito.- Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Especificaciones.- Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Especificidad.- Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Exactitud.- Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de la referencia.

Estabilidad analítica de la muestra.- Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Intervalo.- Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Linealidad.- Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Método analítico.- Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Muestra.- Porción del material a evaluar.

Muestra analítica.- Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

Muestra adicionada.- Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.

Parámetros de desempeño.- Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Placebo analítico.- Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Placebo adicionado.- Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.

Precisión.- Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Precisión intermedia.- Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Recobro.- Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

Repetibilidad.- Precisión de un método analítico, expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

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

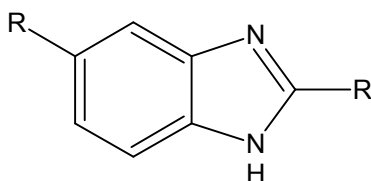
3. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

b_1	Pendiente
b_0	Ordenada al origen
BP	Farmacopea Británica
CV	Coefficiente de variación o desviación estándar relativa.
$CV_{y/x}$	Coefficiente de variación de regresión.
$ d_i $	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramos
$IC(\beta_1)$	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional.
$IC(\beta_0)$	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional.
$IC(\mu)$	Intervalo de confianza para la media poblacional.
mg	Miligramos.
n	Número de mediciones o recobros o blancos o muestras o determinaciones.
NOM	Norma Oficial Mexicana
r^2	Coefficiente de determinación
S	Desviación estándar.
S_{b0}	Desviación estándar de la ordenada al origen.
S_{b1}	Desviación estándar de la pendiente
$T_{0.975,gl}$	Valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 97.5% y a grados de libertad establecidos.
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica
\bar{y}	Media aritmética de Y
%	Por ciento o porcentaje.
gl	Grados de libertad.

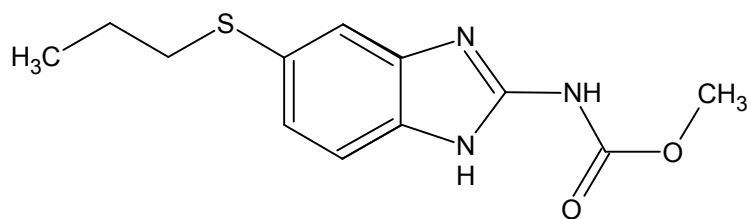
ANTECEDENTES

4. ANTECEDENTES.

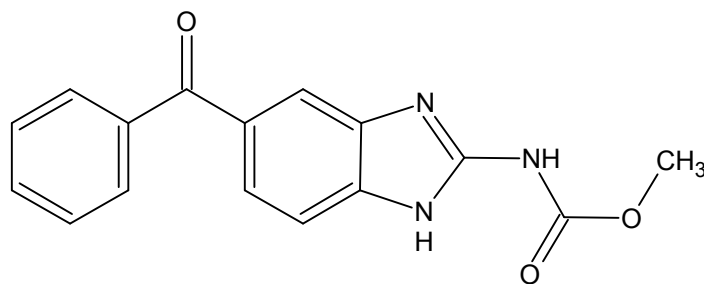
Historia. El descubrimiento, hecho por Brown y colaboradores en 1961, sobre la potente actividad que posee el Tiabendazol contra nematodos gastrointestinales fue el punto de partida para obtener benzimidazoles como antihelmínticos de amplio espectro contra parásitos de importancia en la medicina veterinaria y humana. Entre los cientos derivados probados, los de mayor utilidad terapéutica son aquellos que tienen modificaciones en las posiciones 2 y 5 o en ambas, del anillo de benzimidazol; algunos compuestos, tiabendazol, mebendazol y albendazol, han sido utilizados ampliamente en la erradicación de la helmintiasis humana. La estructura base de los benzimidazoles es:



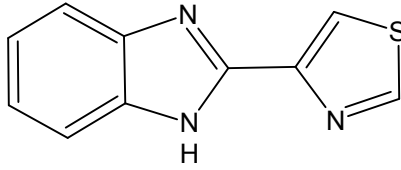
Los benzimidazoles más importantes son:



Albendazol



Mebendazol



Tiabendazol

El Albendazol es un carbamato de benzimidazol que se ha utilizado a nivel mundial para erradicar diversos helmintos. Este compuesto se ha vuelto el más indicado en la cisticercosis y también contra la hidatidosis quística.

Acción antihelmíntica. Los benzimidazoles, cuyos miembros más conocidos son el mebendazol y el albendazol, son antihelmínticos de múltiples usos, sobre todo contra nematodos gastrointestinales, si bien su acción medicamentosa no depende de la concentración que alcanza a nivel sistémico. Uno u otros productos son altamente eficaces en ascaridiasis, capilariasis intestinal, enterobiasis, tricuriasis y anquilostomiasis (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), ya sea en infecciones únicas o mixtas.

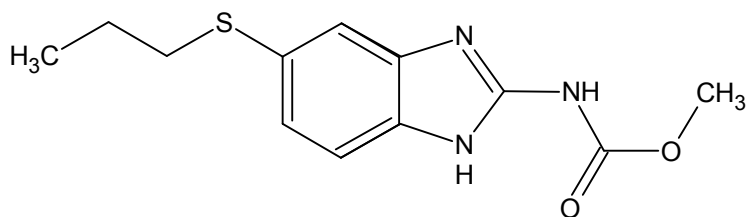
Los medicamentos en cuestión muestran actividad contra las fases larvarias y adultas de los nematodos que ocasionan dichas infecciones y destruyen los huevos de *Ascaris* y *Tricuris*.

Los benzimidazoles ocasionan muchos cambios bioquímicos en nematodos sensibles, por ejemplo, inhibición de la fumarato reductasa de mitocondrias, disminución del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. No obstante, existen pruebas de que la acción primaria de ellos entraña la inhibición de la polimerización de microtúbulos al unirse a β -tubulina. La toxicidad selectiva de dichos compuestos depende de que la unión específica y muy ávida con la β -tubulina del parásito se produce con concentraciones mucho menores de las que se necesitan para unirse a proteínas de mamíferos.

Absorción, distribución y eliminación. Los benzimidazoles poseen hidrosolubilidad limitada y, por consecuencia, pequeñas diferencias en la solubilidad tienden a ocasionar un efecto mayor en la absorción. La absorción del albendazol es variable e irregular después de ingerido, aunque su absorción puede mejorar si se consume con alimentos grasos. Después de administrar una dosis de 400 mg de albendazol, no se detecta el compuesto en el plasma por que es metabolizado con rapidez en hígado, hasta la forma de sulfóxido de albendazol dicho metabolito genera potente actividad antihelmíntica alcanzando concentraciones plasmáticas máximas de unos 300 ng / mL, pero con amplias variaciones entre una persona y otra. El sulfóxido de albendazol se liga aproximadamente en una proporción de 70% a proteínas plasmáticas y su vida media en plasma es de ocho a nueve horas. Se distribuye adecuadamente en diferentes tejidos, incluido los quistes hidatídicos, donde alcanza una concentración de 20%, aproximadamente de la que existe en plasma. La formación del sulfóxido de albendazol es catalizada más bien por la flavina monooxigenasa microsómica y, en menor magnitud, por algunas formas del citocromo P450. Parte del sulfóxido es oxidado todavía más hasta generar el metabolito sulfota que es farmacológicamente inactivo. Los metabolitos se excretan principalmente por la orina.

A semejanza del mebendazol, el albendazol ocasiona pocos efectos adversos si se utiliza por corto tiempo contra la helmintiasis gastrointestinal, incluso en personas con enorme cantidad de vermes. En ocasiones, hay dolor abdominal, diarrea, náusea, mareos y cefalea transitorios; el medicamento suele ser tolerado de manera adecuada por casi todos los enfermos, aun usándolo durante largo tiempo.⁽²⁾

Albendazol



$C_{12}H_{15}N_3O_2S$ Masa molecular = 265.34 g/mol

N- [5 -(Propiltio)-1*H* – benzimidazol-2- il] carbamato de metilo

Descripción: Polvo de color blanco a amarillo claro.

Solubilidad: Soluble en ácidos y bases fuertes; soluble en ácido acético glacial; insoluble en agua.

Punto de fusión: 208⁰ C a 210⁰ C

Absorción en la zona del ultravioleta:

- Disoluciones acuosas ácidas 292 nm
- Disoluciones acuosas alcalinas 309 nm

Estearato de magnesio

Sinónimos. Magnesio octadecanoato; sal de ácido esteárico de magnesio.

Formula. $C_{36}H_{70}MgO_4$

Masa molecular. 591.27 g/mol

Función: En tabletas y cápsulas lubricante

El estearato de magnesio es ampliamente usado en cosméticos, alimentos y formulaciones farmacéuticas. Es principalmente usado como un lubricante en la manufactura de cápsulas y tabletas en concentraciones de 0.25-5.0 %.⁽⁸⁾

Dióxido de silicio coloidal

Sinónimos. Aerosil

Formula. SiO_2

Masa molecular. 60.08 g/mol

Función: Adsorbente, desintegrante en tabletas; agente que aumenta viscosidad.

El tamaño de partícula pequeño le da características de flujo deseables que se explotan para mejorar las propiedades de flujo de polvos secos en varios procesos.⁽⁸⁾

Ludipress

Sinónimos. Lactosa y polivinilpirrolidona

Función: En tabletas lubricante

Función: Compuesto en 96.5 % lactosa y 3.5 % polivinilpirrolidona, es un nuevo excipiente utilizado en compresión directa, presenta propiedades de compresión y flujo excelente.⁽⁹⁾

INSTRUMENTACIÓN.

La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A, de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como se representa en la ecuación siguiente:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b c$$

Todas las variables de esta ecuación se definen en la siguiente tabla 1. Esta ecuación es una representación matemática de la ley de Lambert-Beer.

Término y símbolo	Definición
Potencia radiante P, P ₀	Energía (en ergios) de la radiación que incide y que emerge en el detector, por cm ² y por segundo.
Absorbancia A	$\log = \frac{P_0}{P}$
Transmitancia T	$\frac{P}{P_0}$

Término y símbolo ¹	Definición
Camino óptico de la radiación ² b	— —
Absortividad ² a	A bc
Absortividad molar ³ ϵ	A bc

1 Terminología recomendada por la American Chemical Society (Anal. Chem., 1990, 62, 91).

2 c puede expresarse en g/L o en otras unidades de concentración; b puede expresarse en cm o en otras unidades de longitud.

3 c se expresa en mol/L; b se expresa en cm.

El científico interesado en medidas de absorción en las regiones ultravioleta, visible e infrarrojo cercano no dispone de algunos modelos de instrumentos para elegir. Algunos son sencillos y económicos (unos cientos de dólares); otros son equipos complejos, informatizados cuyo precio asciende y supera los 30.000 dólares. Para muchas aplicaciones, los instrumentos más sencillos proporcionan información tan rápida y satisfactoria como la obtenida por los equipos más sofisticados. Por otra parte, los instrumentos más complejos se han desarrollado para realizar tareas difíciles, que requieren mucho tiempo, o imposibles de realizar con los más sencillos.⁽⁴⁾

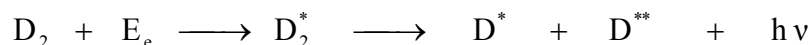
COMPONENTES DE LOS INSTRUMENTOS

Los instrumentos para medir la absorción de radiación ultravioleta, visible y en el infrarrojo cercano están compuestos por uno o más de los siguientes componentes: fuentes de radiación, selectores de longitud de onda, recipientes para la muestra, detectores de radiación y procesadores de señal y dispositivos de lectura.⁽⁴⁾

FUENTES

Cuando se trata de medidas de absorción molecular es necesario disponer de una fuente continua cuya potencia no cambie bruscamente en un intervalo considerable de longitudes de onda.

Lámparas de deuterio e hidrógeno. La excitación eléctrica del deuterio o hidrogeno a baja presión produce un espectro continuo requiere la formación inicial de una especie molecular excitada seguida de la disociación de la molécula excitada para dar dos especies atómicas más un fotón ultravioleta. Las reacciones para el deuterio son



Donde E_e es la energía eléctrica absorbida por la molécula de deuterio excitada.

Las lámparas más modernas de este tipo contienen deuterio y son de bajo voltaje, en ellas se forma un arco entre un filamento caliente recubierto de óxido y un electrodo metálico. El filamento caliente suministra electrones para mantener una corriente continua cuando se aplica un potencial de aproximadamente 40 V; para intensidades constantes es necesario una fuente de alimentación estabilizada.

Una característica importante de las lámparas de deuterio e hidrógeno es la forma de la apertura entre los dos electrodos, que reduce la descarga a una trayectoria estrecha. Como consecuencia, se produce una esfera de radiación intensa de aproximadamente 1 a 1,5 mm de diámetro. El deuterio da una esfera algo más grande e intensa que el hidrógeno, lo que justifica el extendido uso de aquél.

Ambas lámparas de deuterio e hidrógeno producen un espectro continuo útil para la región comprendida entre 160 y 375 nm. A longitudes de onda más largas (>400 nm), las lámparas producen líneas de emisión que se superponen sobre el espectro continuo.

Las lámparas de deuterio e hidrogeno deben presentar celdas de cuarzo ya que el vidrio absorbe fuertemente a longitudes de onda menores de aproximadamente 350 nm. ⁽⁴⁾

RECIPIENTES PARA LA MUESTRA

Al igual que los demás elementos ópticos de un instrumento de absorción, las celdas o cubetas, que contienen a la muestra y al disolvente deben construirse de un material que deje pasar la radiación de la región espectral de interés. Para trabajar en la región ultravioleta (por debajo de los 350 nm) se requiere de cuarzo o sílice fundida; cualquiera de estas dos sustancias son transparentes en la región UV y en la región del infrarrojo, hasta aproximadamente 3 μ m. Los vidrios silicatados pueden emplearse en la región entre 350 y 2.000 nm. En la región visible también se pueden utilizar los recipientes de plástico.

Las mejores cubetas tienen ventanas perfectamente perpendiculares a la dirección del haz para minimizar las pérdidas por reflexión. La longitud de la cubeta más común para los estudios en las regiones ultravioleta y visible es de 1 cm; varias casas comerciales suministran cubetas de este tamaño, contrastadas y calibradas. También se pueden adquirir cubetas de otros espesores, desde 0,1 cm (o más estrechas) hasta de 10 cm. Y también es posible disponer de espaciadores transparentes para acortar el camino óptico de las cubetas de 1 cm y convertirlo en 0,1 cm.

La calidad de las medidas de absorbancia depende de forma crítica del uso y mantenimiento que se haga de las cubetas contrastadas. Las huellas dactilares, la grasa u otras señales sobre las paredes de las cubetas alteran notablemente las características de transmisión. Por ello, es indispensable una limpieza completa antes y después de su uso; la superficie de las ventanas no debe tocarse durante su manipulación. Las cubetas contrastadas nunca deben secarse mediante la acción del calor, en un horno o sobre una llama este tratamiento puede causar daños físicos o cambios en el camino óptico. Las cubetas deberían calibrarse regularmente entre sí con una disolución absorbente. ⁽⁴⁾

DISOLVENTES

La elección del disolvente usado en espectroscopia ultravioleta es muy importante. El primer criterio para un buen disolvente es que no debe absorber radiación ultravioleta en la misma región de la sustancia cuyo espectro esta siendo determinado. Normalmente disolventes que no contienen sistemas conjugados son muy convenientes para este propósito, aunque ellos varían acerca de la longitud de onda más corta a la que ellos permanecen transparentes a la radiación ultravioleta. Algunos disolventes comunes en espectroscopia ultravioleta se encuentran en la siguiente tabla:

Disolvente	λ nm
Acetonitrilo	190
Cloroformo	240
Ciclohexano	195
1,4- Dioxano	215
95% Etanol	205
n-Hexano	201
Metanol	205
Isooctano	195
Agua	190
Trimetil fosfato	210

Cada uno de ellos es transparente en las regiones del espectro ultravioleta donde es probable que las crestas de absorción interesantes de las moléculas del soluto ocurran. ⁽³⁾

CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.

Esta actividad puede ser justificada por los siguientes aspectos:

- Moral y ética.
- Aseguramiento de calidad.
- Económica.
- Regulatoria.
- Seguridad.

Los métodos se clasifican bajo los siguientes criterios:

1). En función de su estado regulatorio:

- Métodos farmacopeicos. Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, Europea, etc.).
- Métodos no farmacopeicos. Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea.

2). En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 NOM-073-SSA1):

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

3). En función de la respuesta analítica en:

- Métodos fisicoquímicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH , consumo de un acomplexante, etc.).
- Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

4). En función de su propósito analítico en:

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

Esta última es la que se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico. ⁽¹⁾

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar.

Parámetros de desempeño	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN
Precisión / adecuabilidad del sistema	SI
Linealidad del sistema	SI
Especificidad ²	SI ⁴
Exactitud y repetibilidad	SI
Linealidad del método	SI
Precisión del método o precisión intermedia ³	SI
Estabilidad analítica de la muestra ³	1
Límite de detección	NO
Límite de cuantificación	NO
Robustez	1
Tolerancia	1

1. Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método
2. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
3. También es definido como un estudio de tolerancia.
4. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

- PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Metodología.- preparar por lo menos un sextuplicado de disoluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la disolución de referencia utilizada, o en ciertos casos, la concentración que representa el 100 % de la muestra procesada para su medición, preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Calcular S y CV de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación:

$CV \leq 1.5\%$ para métodos físicos - químicos

Valores superiores deben ser justificados.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado. ⁽¹⁾

- LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Metodología.- Preparar por lo menos por triplicado, 5 niveles de concentración de la disolución de referencia ya sea por dilución, a partir de una misma disolución concentrada, o por pesadas independientes, cuando no sea posible prepararlas por dilución. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la disolución de referencia en el método o en ciertos casos, la concentración que representa el 100% en la muestra procesada para su medición. El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido / potencia / valoración. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs respuesta analítica. Calcular el valor de la pendiente b_1 , la ordenada al origen b_0 , el coeficiente de determinación r^2 y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.

El intervalo esta en función del propósito del método y por lo general se expresa en % de la concentración de la disolución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.

Para contenido / potencia / valoración se sugiere un mínimo de $\pm 20\%$.

Criterios de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir cero.

Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado. ⁽¹⁾

- **ESPECIFICIDAD.**

Metodología.- Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas, a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

Para métodos de contenido / potencia / valoración. Se debe analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras de producto, y cuando proceda: sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Criterios de aceptación:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. ⁽¹⁾

- **EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO**

Metodología.- Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito, puede ser una

sustancia de referencia secundaria, correspondiente al 100% de éste en la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Criterio de Aceptación:

El IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 97 – 103 % si el método es químico o espectrofotométrico.

El CV del porcentaje de recobro, no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado. ⁽¹⁾

- LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Metodología.- Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito que puede ser una sustancia de referencia secundaria, correspondiente al 100% de este en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito, intervalo y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Propósito	Especificación	Intervalo mínimo
Contenido / potencia / valoración	Límite inferior (L_i) Límite superior (L_s)	$L_i - 10\%$ a $L_s + 10\%$

Ejemplo

Valoración	90 %- 110%	80 % a 120 % Por lo tanto los niveles podrían ser 80%, 100 % y 120 %
------------	------------	---

Reportar la cantidad adicionada en función de la cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, calcular el valor de la pendiente b_1 , la ordenada en el origen b_0 , el coeficiente de determinación r^2 , el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, el intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$ y el coeficiente de variación de regresión $CV_{y/x}$.

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético \bar{y} , la desviación estándar S , el coeficiente de variación CV y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.

Criterios de Aceptación:

Cantidad adicionada en función de la cantidad recuperada:

$$r^2 \geq 0.98$$

El $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.

El $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero.

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro, no mayor de 3 % para métodos espectrofotométricos

Porcentaje de recobro:

El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103 %, si el método es espectrofotométrico.

El CV del porcentaje de recobro, no mayor de 3 % para métodos espectrofotométricos.

- PRECISIÓN DEL MÉTODO, PRECISIÓN INTERDÍA O TOLERANCIA INTERDÍA / ANALISTA.

Metodología.- analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % en el caso de contenido/ potencia/ valoración o una muestra homogénea cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método, para el caso de impurezas, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y / o equipos. Reportar el contenido / potencia / valoración del analito de todas las muestras.

Calcular la media aritmética \bar{y} , desviación estándar S y coeficiente de variación CV del contenido / potencia / valoración, empleando todos los resultados obtenidos.

Criterios de Aceptación:

$CV \leq 3 \%$ para métodos químicos o espectrofotométricos. ⁽¹⁾

- ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

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

Para determinar la estabilidad analítica para muestras dependientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés. Terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparación, contenido / potencia / valoración inicial. Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una disolución de referencia recientemente preparada, si el método contempla una disolución de referencia. Reportar el contenido / potencia / valoración, de cada fracción.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras independientes, a partir de una muestra homogénea, el analista debe analizar por triplicado el contenido / potencia / valoración inicial. Simultáneamente y de la misma muestra, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida al menos por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una disolución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de una disolución de referencia. Reportar el contenido / potencia / valoración de cada preparación.

Calcular la media aritmética del análisis inicial \bar{y}_0 , y de cada condición de almacenaje \bar{y}_i . Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial $|d_i|$

Criterios de Aceptación:

$|d_i| \leq 3\%$ para métodos espectrofotométricos.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado. ⁽¹⁾

PARTE EXPERIMENTAL

5. DETERMINACIONES, METODOLOGIA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Material

- Matraces volumétricos de 10 mL
- Matraces volumétricos de 100 mL
- Micro pipeta 1000 μ L
- Bureta
- Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- Puntas para micro pipeta
- Espátula
- Naves de vidrio para pesar
- Piseta
- Baño maría
- Refrigerador 4° C
- Marco de pesas
- Termómetro

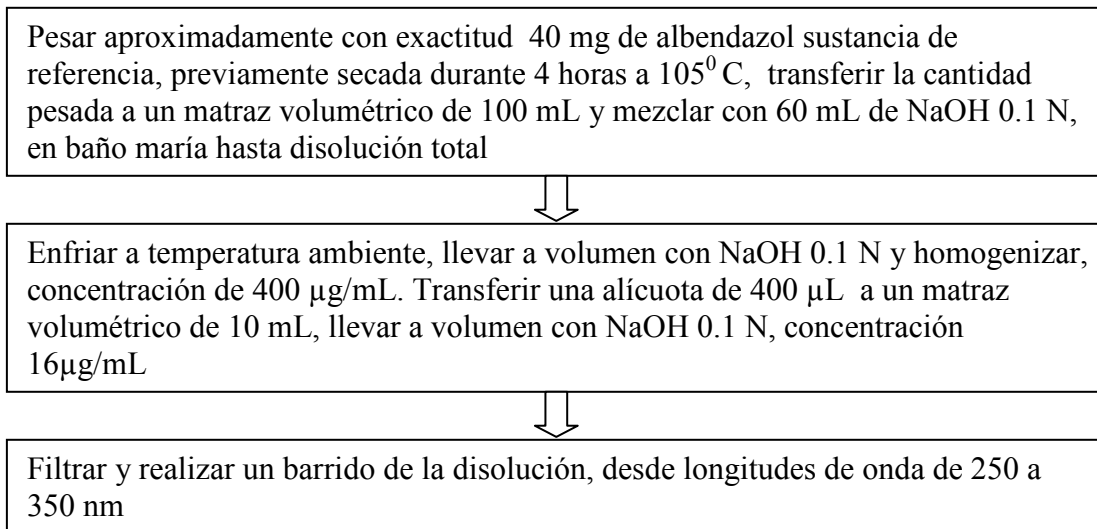
Equipo

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV/ Visible

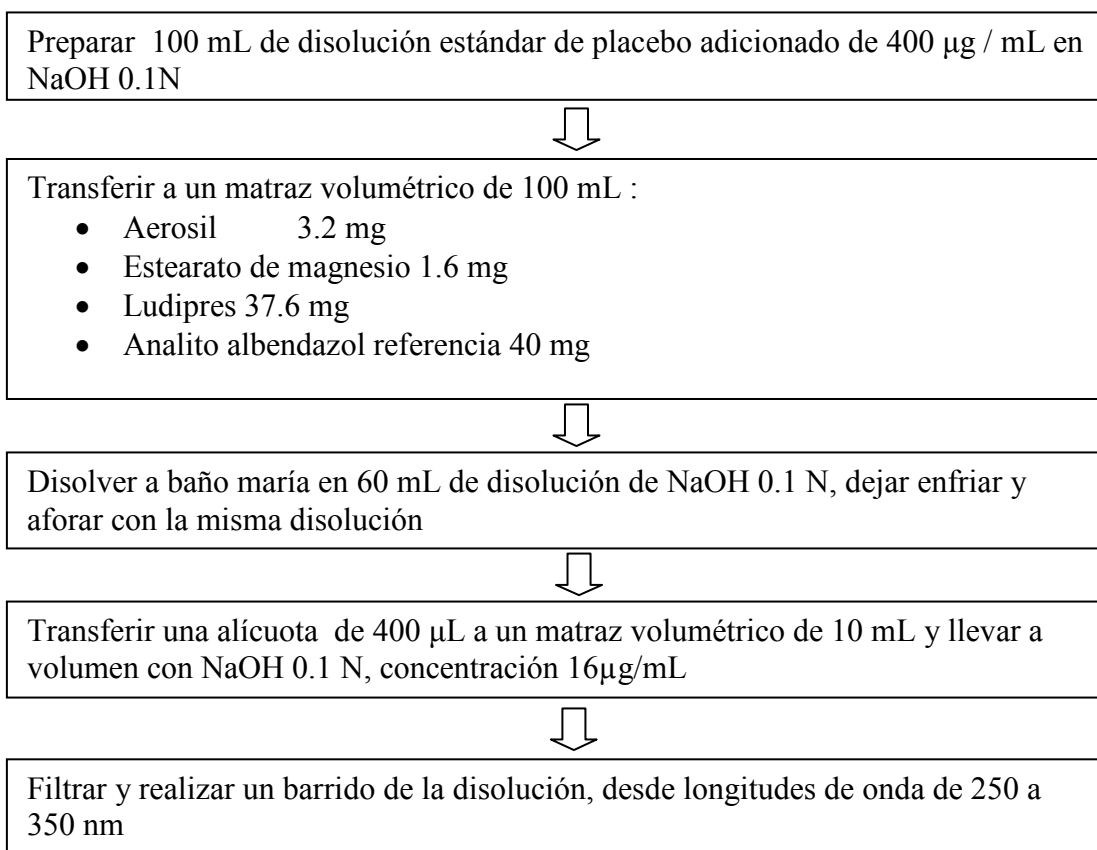
Reactivos

- Albendazol 99.8%
- NaOH 0.1 N

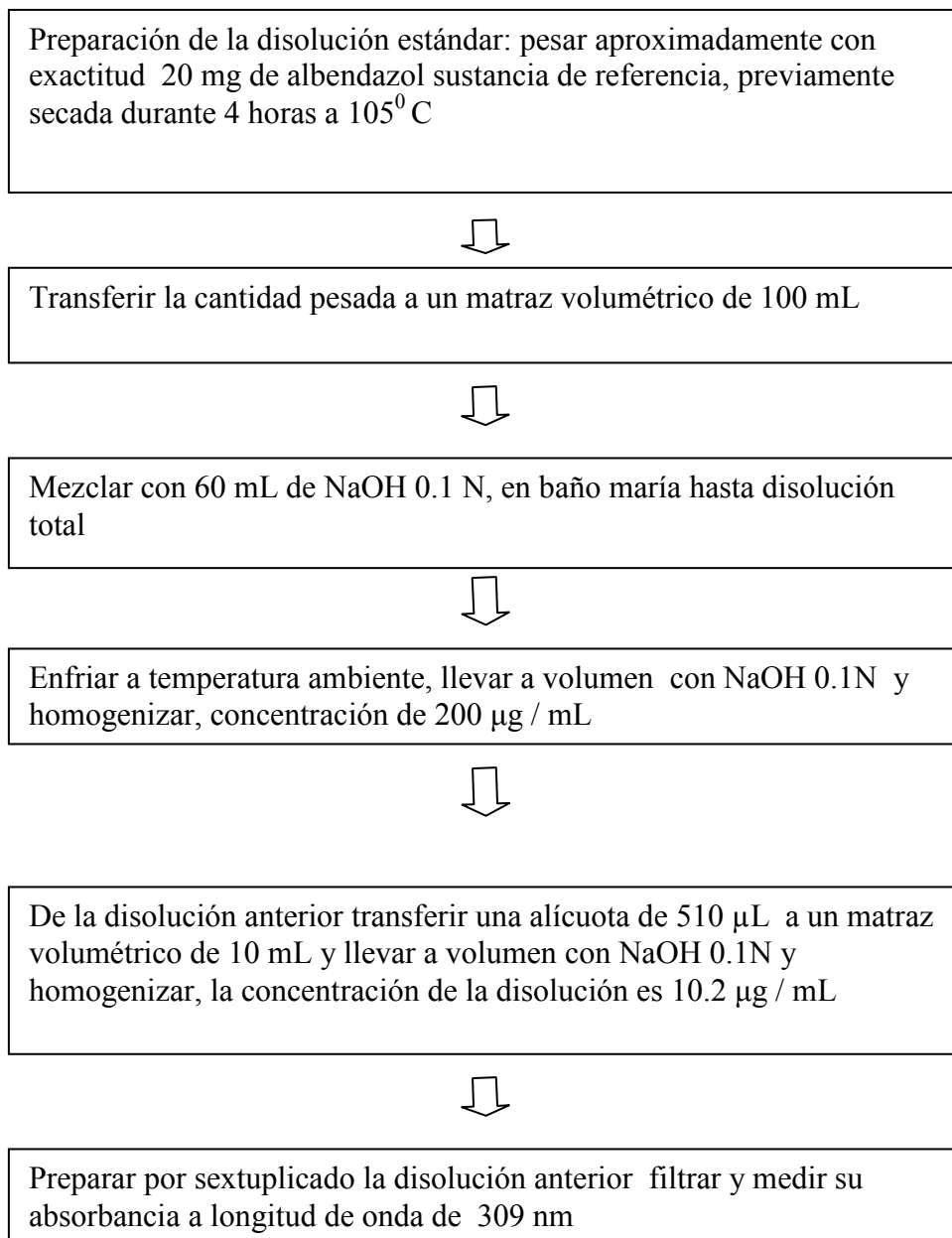
• DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANALITO:



• DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ESPECIFICIDAD DE PLACEBO ADICIONADO



- DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA



- DIAGRAMA DE FLUJO DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparación de disolución estándar de 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ como se realizó en precisión del sistema



Preparar 5 niveles de concentración tomando alícuotas de la disolución estándar y transferir a matraces volumétricos de 10 mL y llevarlos a volumen de NaOH 0.1 N, filtrar.



Concentración $\mu\text{g} / \text{mL}$	Alícuota de la concentración de 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$	Aforo a
3.4	170 μL	10 mL
6.8	340 μL	10 mL
10.2	510 μL	10 mL
13.6	680 μL	10 mL
17.0	850 μL	10 mL



Preparar por triplicado cada nivel de concentración y leer a una longitud de onda de 309 nm

- DIAGRAMA DE FLUJO PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Preparar 100 mL de disolución estándar de placebo adicionado de 200 μg / mL en NaOH 0.1N



Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL

- Aerosil 1.6 mg
- Estearato de magnesio 1.0 mg
- Ludieres 18.8 mg
- Analito (albendazol referencia) 20 mg



Disolver a baño maría, en 60 mL de disolución de NaOH 0.1 N, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar con la misma disolución, homogenizar



Transferir una alícuota de 510 μL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con NaOH 0.1N y homogenizar perfectamente, la concentración es de 10.2 μg / mL



Preparar por sextuplicado la disolución anterior, filtrar y medir su absorbancia a una longitud de onda de 309 nm

NOTA: Preparar estándar para determinar % de recobro

- **DIAGRAMA DE FLUJO DE LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Preparar 100 mL de disolución de placebo adicionado de cada nivel en NaOH 0.1N



Transferir analito equivalente a cada nivel y excipientes, los cuales permanecen constantes, a un matraz volumétrico de 100 mL:

- Aerosil 1.6 mg
- Estearato de magnesio 1.0 mg
- Ludieres 18.8 mg
- Analito (albendazol referencia) la requerida para cada nivel



Disolver a baño maría, en 60 mL de disolución de NaOH 0.1 N, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar con la misma disolución, homogenizar



Preparar 5 niveles de concentración, tomar alícuotas de la disolución estándar y transferir a matraces volumétricos de 10 mL, llevarlos a volumen con NaOH 0.1 N, homogenizar



NIVEL %	Analito Adicionado	Aforo mL	Alícuota μ L	Aforo mL
60	12 mg	100	306	10
80	16 mg	100	408	10
100	20 mg	100	510	10
120	24 mg	100	612	10
140	28 mg	100	663	10



Preparar por triplicado cada nivel de concentración por pesadas independientes, filtrar y leer a una longitud de onda de 309 nm

NOTA: Preparar estándar para determinar % de recobro

- DIAGRAMA DE FLUJO DE PRECISIÓN DEL MÉTODO, PRECISIÓN INTERDÍA O TOLERANCIA INTERDÍA / ANALISTA

Preparar 100 mL de disolución estándar de placebo adicionado de 200 μg / mL en NaOH 0.1N



Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL :

- Aerosil 1.6 mg
- Estearato de magnesio 1.0 mg
- Ludipres 18.8 mg
- Analito (albendazol referencia) 20 mg



Disolver a baño maría, en 60 mL de disolución de NaOH 0.1 N, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar con la misma disolución, homogenizar



Transferir una alícuota de 510 μL a un matraz volumétrico de 10 mL y aforar a con NaOH 0.1N, homogenizar, concentración obtenida de 10.2 μg / mL



Preparar por triplicado la disolución anterior, partiendo de la misma disolución estándar, filtrar y medir su absorbancia a la longitud de onda de 309 nm



Analizar por dos analistas diferentes y en dos días diferentes

NOTA: Cada analista debe realizar pesadas independientes por día tanto para la muestra como para el estándar.

PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN ESTÁNDAR

Preparación de disolución estándar: pesar aproximadamente con exactitud, 20 mg de albendazol sustancia de referencia, previamente secada durante 4 horas a 105⁰ C



Transferir la cantidad pesada a un matraz volumétrico de 100 mL



Disolver a baño maría, en 60 mL de disolución de NaOH 0.1 N, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar en la misma disolución, homogenizar, concentración 200 µg /mL



Transferir una alícuota de 510 µL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con NaOH 0.1N, homogenizar, la concentración es de 10.2 µg /mL



Filtrar y medir su absorbancia a una longitud de onda de 309 nm

NOTA: De esta forma se debe preparar el estándar en cualquier parámetro que lo requiera, antes de realizar lecturas se debe ajustar a cero de absorbancia con blanco de NaOH 0.1 M

DIAGRAMA DE FLUJO ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Preparar 100 mL de disolución estándar de placebo adicionado cuya concentración sea de 200 µg / mL en NaOH 0.1N



Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL :

- Aerosil 1.6 mg
- Estearato de magnesio 1.0 mg
- Ludipres 18.8 mg
- Analito (albendazol referencia) 20 mg



Disolver a baño maría, en 60 mL de disolución de NaOH 0.1 N, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar con la misma disolución, homogenizar



Transferir una alícuota de 12.8 mL a un matraz volumétrico de 250 mL y llevar al aforo con disolución de NaOH 0.1N y homogenizar, la concentración obtenida es de 10.2 µg / mL



Fraccionar la disolución anterior de acuerdo a las condiciones de interés:

- Luz blanca y temperatura ambiente
- Oscuridad y temperatura ambiente
- Temperatura 40° C
- Temperatura 4° C



Preparar por triplicado la disolución anterior, partiendo de otra disolución estándar, filtrar y medir su absorbancia a una longitud de onda de 309 nm, por cada día de la muestra

NOTA: Preparar disoluciones estándar por cada día del análisis para determinar % de recobro

RESULTADOS

6. RESULTADOS

TABLA 1. Precisión del sistema.

Concentración de analito que representa el 100% equivalente a 10.2 $\mu\text{g/mL}$

Disolución	Absorbancia a λ 309 nm y
1	0.5157
2	0.5229
3	0.5157
4	0.5229
5	0.5229
6	0.5229
n	6
\bar{y}	0.5205
S	0.003707
% CV	0.7

El CV no excede el 1.5%

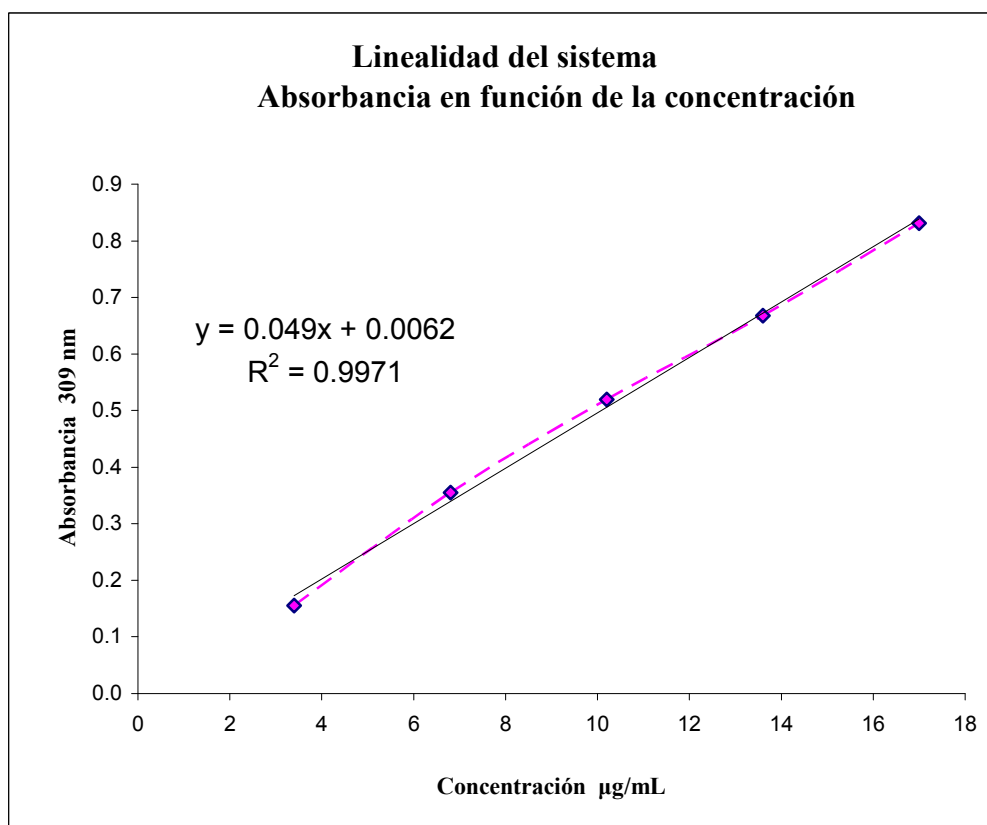
TABLA 2. Linealidad del sistema.

Disolución	X Concentración $\mu\text{g/mL}$	Y Absorbancia a λ 309 nm
1	3.4	0.1561
2	3.4	0.1549
3	3.4	0.1549
4	6.8	0.3546
5	6.8	0.3468
6	6.8	0.3635
7	10.2	0.5200
8	10.2	0.5129
9	10.2	0.5258
10	13.6	0.6778
11	13.6	0.6576
12	13.6	0.6676
13	17	0.8386
14	17	0.8239
15	17	0.8327

TABLA 3. Promedios de absorbancia para cada nivel de concentración, en base a los datos de la tabla 2.

X $\mu\text{g/mL}$	Y Promedio
3.4	0.1553
6.8	0.3550
10.2	0.5195
13.6	0.6676
17.0	0.8317

Grafico 1. Absorbancia obtenida en los cinco niveles de concentración, para evaluar linealidad del sistema.



Pendiente	$b_1 = 0.049$
Ordenada al origen	$b_0 = 0.0062$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0.9971$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = 0.049 \pm (2.160 * 0.0100) = 0.0706, 0.0274$$

$$S_{y/x} = 3.4740$$

$$S_{b1} = 0.0100$$

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

$$t_{0.975, 13} = 2.160$$

TABLA 4. Especificidad

λ nm	Absorbancia	
	Analito	Placebo adicionado
250	0.7959	0.7696
260	0.4685	0.4815
270	0.3979	0.4437
280	0.3098	0.3279
290	0.4318	0.4949
300	0.7212	0.7447
310	0.7959	0.7696
320	0.3979	0.3768
330	0.1192	0.1135
340	0.0000	0.0506
350	0.0000	0.0410

Grafico 2. Absorbancia del analito y placebo adicionado, disuelto en NaOH 0.1 N

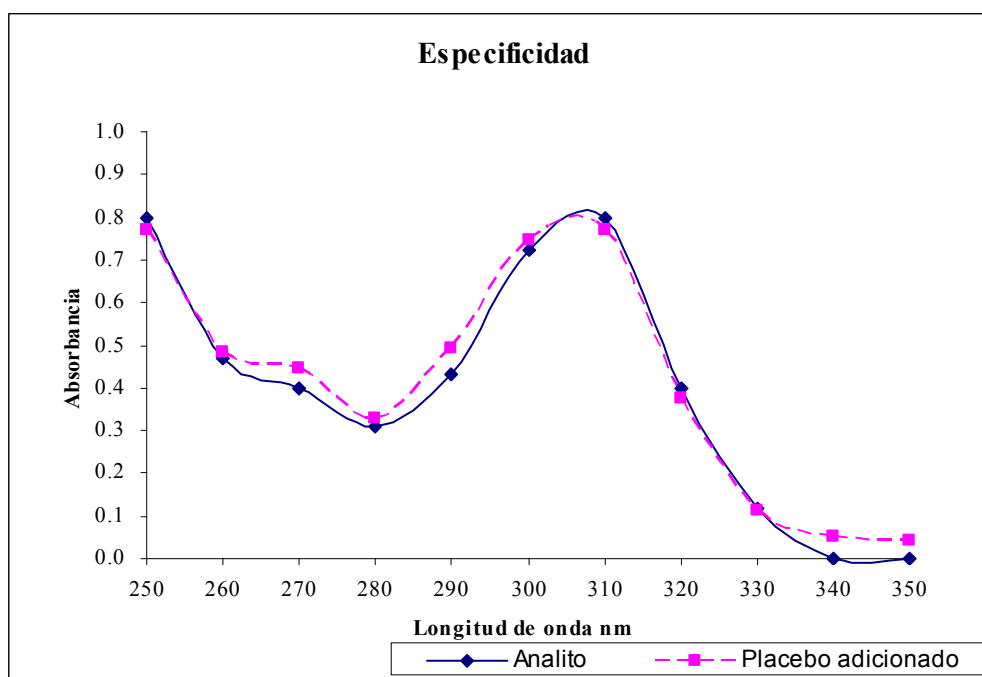


TABLA 5. Exactitud y repetibilidad del método.

Placebo analítico adicionado	Absorbancia 309 nm	Cantidad adicionada mg	Cantidad recuperada mg	% Recobro Y
1	0.5346	20.4	20.7	101.27
2	0.5302	20.0	20.5	102.30
3	0.5272	20.1	20.4	101.29
4	0.5086	19.8	19.7	99.30
5	0.5302	20.0	20.5	102.30
6	0.5376	20.0	20.8	103.79

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

n	6
S	1.4967
\bar{y}	101.7083
% CV	1.47

$t_{0.975, n-1}$

$t_{0.975, 5} = 2.571$

$IC (\mu) = 101.7083 \pm (2.571 * (1.4967 / 2.4494)) = 103.2792, 100.1374$

Ejemplo de cálculo:

$$\text{mg Recuperados} = \frac{\text{Absorbancia de muestra} * \text{peso del estándar}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperados} * \text{pureza}}{\text{mg adicionados}}$$

Estándar	
Peso del estándar 1	20.2
Peso del estándar 2	20.0
Promedio	20.1
Pureza	99.8 %

Absorbancia del estándar 1	0.5229
Absorbancia del estándar 2	0.5157
Absorbancia promedio	0.5193
S	0.0051
CV	0.0098
% CV	0.9800

Para el placebo analítico adicionado 1

$$\text{mg Recuperados} = \frac{0.5346 * 20.1\text{mg}}{0.5193} = 20.7\text{mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{20.7\text{mg} * 99.8\%}{20.4 \text{ mg}} = 101.27\%$$

TABLA 6. Linealidad del método.

Placebo analítico adicionado	Nivel de concentración en %	Absorbancia λ 309 nm
1	60	0.3097
2	60	0.3027
3	60	0.3134
4	80	0.4112
5	80	0.4009
6	80	0.4165
7	100	0.5622
8	100	0.5415
9	100	0.5567
10	120	0.6314
11	120	0.6234
12	120	0.6171
13	140	0.7452
14	140	0.7468
15	140	0.7316

TABLA 7. Cantidad adicionada-cantidad recuperada, de linealidad del método.

Placebo analítico adicionado	X Cantidad adicionada (mg)	Y Cantidad recuperada (mg)	%Recobro
1	11.9	11.9	99.80
2	11.6	11.7	100.66
3	12.0	12.1	100.63
4	16.2	15.8	97.34
5	15.9	15.4	96.66
6	16.3	16.0	97.96
7	21.5	21.6	100.26
8	20.9	20.8	99.32
9	21.4	21.4	99.80
10	24.5	24.3	98.98
11	24.4	23.9	97.75
12	24.4	23.7	96.93
13	28.9	28.7	99.11
14	28.6	28.7	100.14
15	28.8	28.1	97.37

Estándar	
Peso estándar1	20.4
Peso estándar2	20.1
Promedio	20.25
Pureza	99.8 %

Absorbancia estándar ₁	0.5302
Absorbancia estándar ₂	0.5229
Absorbancia promedio	0.5265
<i>S</i>	0.0052
CV	0.0098
%CV	0.98

Para el placebo analítico adicionado 1

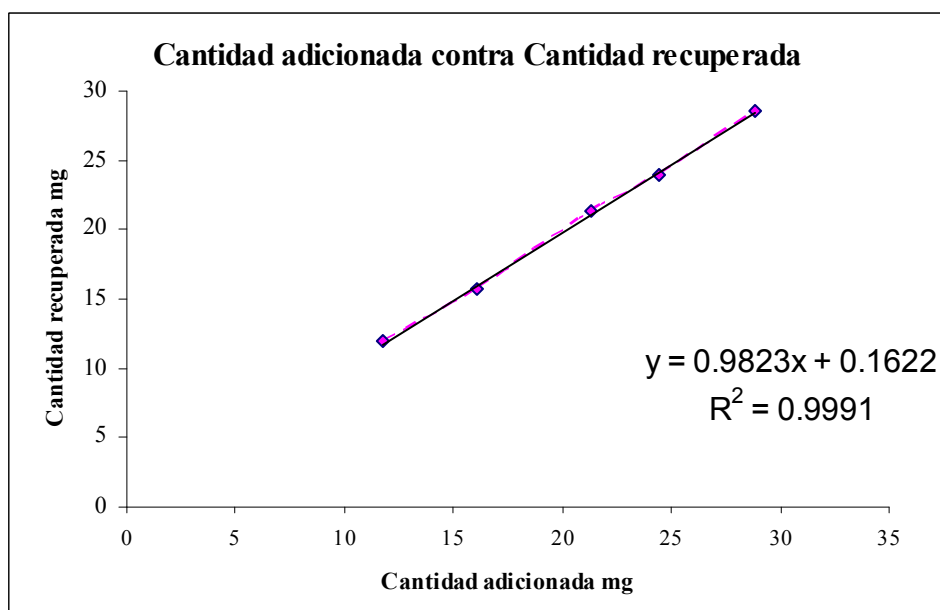
$$\text{mg Recuperados} = \frac{0.3097 * 20.25\text{mg}}{0.5265} = 11.9\text{mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{11.9\text{mg} * 99.8\%}{11.9 \text{ mg}} = 99.80\%$$

TABLA 8. Promedio de mg de cantidad adicionada-cantidad recuperada de linealidad del método, en base a los datos de la tabla 7

Promedio X cantidad adicionada (mg)	Promedio Y Cantidad recuperada (mg)
11.8	11.9
16.1	15.7
21.3	21.3
24.4	24.0
28.8	28.5

Grafico 3. Cantidad recuperada para cada nivel



Pendiente	$b_1 = 0.9823$
Ordenada al origen	$b_0 = 0.1622$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0.9991$

TABLA 9. % de recobro de linealidad del método.

Placebo analítico adicionado	Nivel de concentración en %	%Recobro
1	60	99.80
2	60	100.66
3	60	100.63
4	80	97.34
5	80	96.66
6	80	97.96
7	100	100.26
8	100	99.32
9	100	99.80
10	120	98.98
11	120	97.75
12	120	96.93
13	140	99.11
14	140	100.14
15	140	97.37

n	15
S	1.3929
promedio	98.85
CV	0.0140
% CV	1.40

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

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

$$t_{0.975, 14} = 2.145$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = 98.85 \pm (2.145 * (1.3929/3.8729)) = 99.62, 98.08$$

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

DÍA 1

TABLA 10. Analista 1, día uno.

Placebo analítico adicionado	Absorbancia a λ 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro
1	0.5346	20.4	20.7	101.27
2	0.5302	20.4	20.5	102.39
3	0.5317	20.4	20.6	102.67

Estándar	
Peso estándar 1	20.2
Peso estándar 2	20.0
Promedio	20.1
Pureza	99.8

Absorbancia 1	0.5228
Absorbancia 2	0.5157
Promedio Absorbancia	0.5193
S	0.0051
CV	0.0098
% CV	0.98

Ejemplo para el placebo analítico adicionado 1 del analista 1:

$$\text{mg Recuperado} = \frac{0.5346 * 20.1 \text{ mg}}{0.5193} = 20.7 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{20.7 \text{ mg} * 99.8\%}{20.4 \text{ mg}} = 101.27 \%$$

TABLA 11. Analista 2, día uno.

Absorbancia	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro
0.4962	20.1	20.5	101.88
0.4921	20.1	20.3	101.79
0.4855	20.1	20.1	99.8

Estándar	
Peso estándar 1	20.5
Peso estándar 2	20.2
Promedio	20.35
Pureza	99.8

Absorbancia 1	0.4935
Absorbancia 2	0.4908
Promedio Absorbancia	0.4921
S	0.0019
CV	0.0039
% CV	0.39

Ejemplo para el placebo analítico adicionado 1 del analista 1:

$$\text{mg Recuperado} = \frac{0.4962 * 20.35 \text{ mg}}{0.4921} = 20.5 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{20.5 \text{ mg} * 99.8\%}{20.1 \text{ mg}} = 101.88\%$$

DÍA 2

TABLA 12. Analista 1, día dos.

Placebo analítico adicionado	Absorbancia 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro
1	0.5031	19.9	19.9	99.84
2	0.5157	19.9	20.4	102.34
3	0.5114	19.9	20.2	101.48

Estándar	
Peso estándar 1	20.2
Peso estándar 2	20.3
Promedio	20.3
Pureza	99.8

Absorbancia 1	0.5162
Absorbancia 2	0.5097
Promedio absorbancia	0.5130
S	0.0051
CV	0.0098
% CV	0.98

Ejemplo para el placebo analítico adicionado 1 del analista 1 en el día 2 :

$$\text{mg Recuperados} = \frac{0.5031 * 20.3 \text{ mg}}{0.5130} = 19.9 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{19.9 \text{ mg} * 99.8\%}{19.9 \text{ mg}} = 99.84\%$$

TABLA 13. Analista 2, día dos.

Absorbancia 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro
0.4980	20.5	20.3	97.37
0.5106	20.5	20.8	101.26
0.5045	20.5	20.5	99.81

Estándar	
Peso estándar 1	20.2
Peso estándar 2	20.3
Promedio	20.3
Pureza	99.8

Absorbancia 1	0.5017
Absorbancia 2	0.4949
Promedio absorbancia	0.4983
S	0.0048
CV	0.0096
% CV	0.96

Ejemplo para el placebo analítico adicionado 1 del analista 2 en el día 2:

$$\text{mg Recuperado} = \frac{0.4980 * 20.3 \text{ mg}}{0.4983} = 20.3 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{20.3 \text{ mg} * 99.8\%}{20.5 \text{ mg}} = 97.37\%$$

TABLA 14. Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista.

	Analista 1	Analista 2
	Cantidad recuperada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
Día 1	20.7	20.5
	20.5	20.3
	20.6	20.1
Día 2	19.9	20.3
	20.4	20.8
	20.2	20.5

$n = 12$

$S = 0.2558$

Promedio = 20.4

$\% CV = 1.25$

TABLA 15. Estabilidad analítica de la muestra.

Almacenamiento luz y temperatura ambiente (Tiempo Cero)			
Muestra	Absorbancia λ 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
1	0.5317	20.4	20.6
2	0.5258	20.0	20.4
3	0.5243	20.1	20.3
Almacenamiento luz y temperatura ambiente (Tiempo 24 hrs)			
Muestra	Absorbancia λ 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
1	0.5031	20.4	19.4
2	0.4976	20.0	19.2
3	0.5100	20.1	19.7
Almacenamiento luz y temperatura ambiente (Tiempo 48 hrs)			
Muestra	Absorbancia λ 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
1	0.4330	20.4	16.5
2	0.4283	20.0	16.3
3	0.4449	20.1	17.0
Almacenamiento luz y temperatura ambiente (Tiempo 72 hrs)			
Muestra	Absorbancia λ 309 nm	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
1	0.4330	20.4	16.7
2	0.4283	20.0	16.5
3	0.4260	20.1	16.4

Para cada día del análisis se preparo por duplicado estándar

	Datos de estándar	
	Peso promedio de estándar ₁ + estándar ₂	Absorbancia promedio de estándar ₁ + estándar ₂
t (cero h)	20.1	0.5193
t (24 h)	20.2	0.5236
t (48 h)	20.4	0.5332
t (72 h)	20.2	0.5236

Ejemplo de cálculo para el tiempo cero muestra 1 en almacenamiento luz a temperatura ambiente:

$$\text{mg Recuperados} = \frac{0.5317 * 20.1\text{mg}}{0.5193} = 20.6\text{mg}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{20.6 \text{ mg} * 99.8\%}{20.4\text{mg}} = 100.67\%$$

Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$)

$$|d_i| = |y_1 - y_0|$$

Ejemplo para almacenamiento luz a temperatura ambiente 24 horas:

$$|d_{24 \text{ hrs}}| = |96.14 - 101.00| = 4.86$$

TABLA 16. % de recobro de estabilidad analítica de la muestra.

Almacenamiento luz y temperatura ambiente				
Muestra	% Recobro cero h	% recobro 24 h	% recobro 48 h	% recobro 72 h
1	100.67	94.95	80.85	81.72
2	101.55	95.79	81.57	82.45
3	100.77	97.70	84.32	81.59
PROMEDIO	101.00	96.14	82.25	81.92
<i>d</i>		4.86	18.75	19.08

Almacenamiento oscuridad y temperatura ambiente				
Muestra	% recobro cero h	% recobro 24 h	% recobro 48 h	% recobro 72 h
1	100.67	100.34	88.93	81.72
2	101.55	101.22	89.97	82.45
3	100.77	100.44	89.03	81.82
PROMEDIO	101.00	100.66	89.31	81.90
<i>d</i>		0.34	11.69	19.1

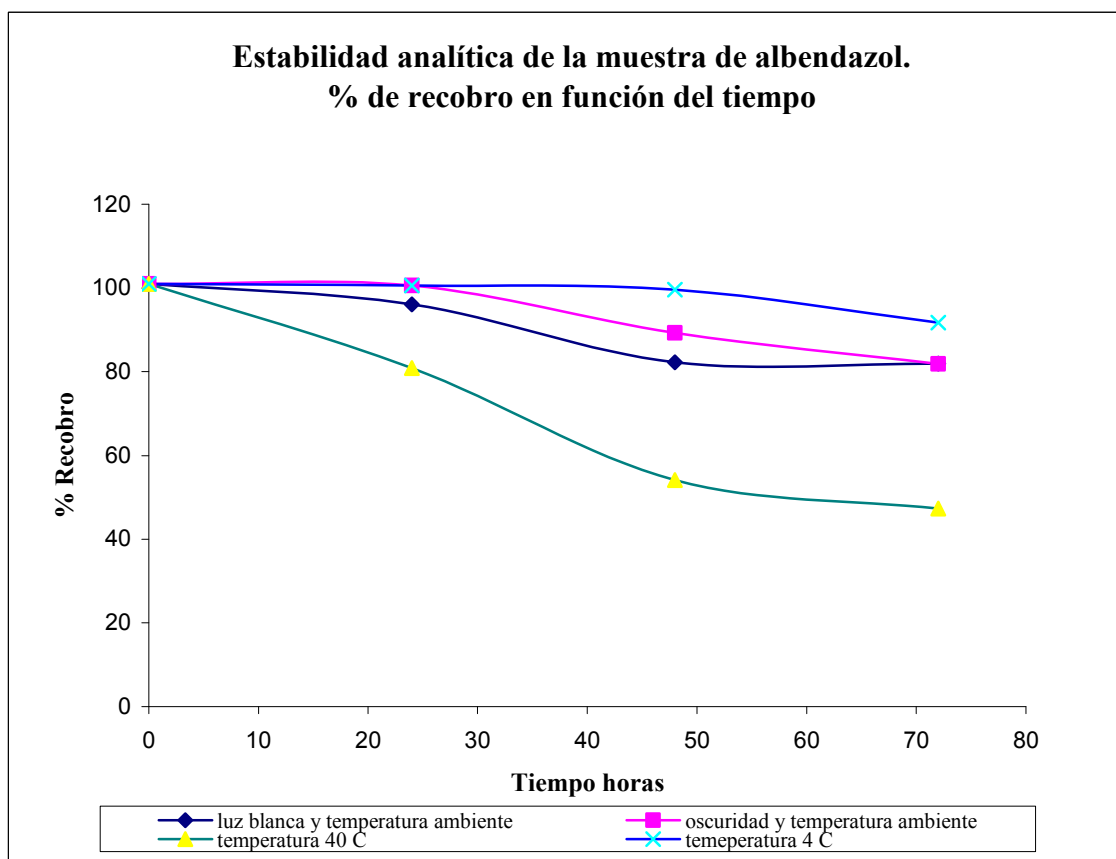
Almacenamiento 40 °C				
Muestra	% recobro cero h	% recobro 24 h	% recobro 48 h	% recobro 72 h
1	100.67	82.83	54.76	47.67
2	101.55	79.15	55.21	48.03
3	100.77	80.71	52.41	46.18
PROMEDIO	101.00	80.90	54.13	47.29
<i>d</i>		20.1	46.87	53.71

Almacenamiento 4 °C				
Muestra	% recobro cero h	% recobro 24 h	% recobro 48 h	% recobro 72 h
1	100.67	100.34	99.27	93.65
2	101.55	101.22	100.14	90.69
3	100.77	100.44	99.37	90.98
PROMEDIO	101.00	100.66	99.60	91.77
<i>d</i>		0.34	1.40	9.23

TABLA 17. % de recobro de las condiciones de almacenaje en los diferentes tiempos.

Tiempo en horas	Luz y temperatura ambiente % recobro	Oscuridad y temperatura ambiente % recobro	Temperatura 40° C % recobro	Temperatura 4 °C % recobro
0	101.00	101.00	101.00	101.00
24	96.14	100.66	80.90	100.66
48	82.25	89.31	54.13	99.60
72	81.92	81.90	47.29	91.77

Grafico 4. % de recobro obtenido de las diferentes condiciones de almacenaje.



- Determinación del contenido de albendazol en productos comerciales, presentación tabletas.

Las siguientes muestras se preparan igual que la disolución estándar, excepto que la cantidad equivalente a 20 mg de principio activo se calcula en base al peso promedio de 20 tabletas

PRODUCTO I

Albendazol tabletas 200 mg

Lote: 042340

Caducidad: AGO 2006

Peso promedio de 20 tabletas: 431mg

TABLA 18. Análisis de tabletas del Producto I

Muestra	Masa mg	Absorbancia λ 309 nm	mg / tableta	% principio activo con respecto al marbete
1	43.2	0.5751	220.9	110.46
2	43.3	0.5686	217.9	108.96
3	42.5	0.5702	222.6	111.31
				Promedio 110.24
				%CV 1.08

PRODUCTO II

Albendazol 200 mg

Lote: 38152

Caducidad: 18OCT05

Peso promedio de 20 tabletas: 342 mg

TABLA 19. Análisis de tabletas del Producto II

Muestra	Masa mg	Absorbancia λ 309 nm	mg / tableta	% principio activo con respecto al marbete
1	33.5	0.5391	211.9	105.95
2	34.1	0.5346	206.4	103.22
3	34.2	0.5452	209.9	104.96
				Promedio 104.71
				%CV 1.32

Para la valoración de productos comerciales se preparo estándar por duplicado:

Estándar	
Peso estándar 1	20.1 mg
Peso estándar 2	20.3 mg
promedio	20.2 mg
Pureza	99.8

Absorbancia	
0.5214	
0.5258	
S	0.0031
Promedio	0.5236
CV	0.0059
% CV	0.59

Ejemplo de cálculo:

Cantidad de principio activo en mg / tableta

$$\text{mg /tableta} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs referencia}} * \frac{\text{mg referencia}}{\text{aforo}} * \frac{\text{alicuota}}{\text{aforo}} * \frac{\text{pureza}}{100} * \frac{\text{aforo}}{\text{mg muestra}} * \frac{\text{aforo}}{\text{alicuota}} * \frac{\text{Ptabletas}}{\text{1tableta}}$$

$$\text{mg /tableta} = \frac{0.5751}{0.5236} * \frac{20.2\text{mg}}{100\text{ml}} * \frac{0.510\text{ml}}{10\text{mL}} * \frac{99.8}{100} * \frac{100}{43.2\text{mg}} * \frac{10\text{mL}}{0.510\text{mL}} * \frac{431\text{mg}}{\text{1tableta}}$$

$$\text{mg /tableta} = 220.9$$

% de principio activo con respecto al marbete

$$\% = \frac{\text{Absmuestra}}{\text{Absreferencia}} * \frac{\text{mgreferencia}}{\text{aforo}} * \frac{\text{alicuota}}{\text{aforo}} * \frac{\text{pureza}}{100} * \frac{\text{aforo}}{\text{mgmuestra}} * \frac{\text{aforo}}{\text{alicuota}} * \frac{\text{Ptabletas}}{\text{1tableta}} * \frac{\text{1tableta}}{\text{mgmarbet}} * 100\%$$

$$\% = \frac{0.5751}{0.5236} * \frac{20.2\text{mg}}{100\text{ml}} * \frac{0.510\text{ml}}{10\text{mL}} * \frac{99.8}{100} * \frac{100}{43.2\text{mg}} * \frac{10\text{mL}}{0.510\text{mL}} * \frac{431\text{mg}}{1\text{tableta}} * \frac{1\text{tableta}}{200\text{mg}} * 100\%$$

$$\% = 110.46$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Basados en las propiedades fisicoquímicas del albendazol, se analizó en un medio acuoso alcalino a una longitud de onda de 309 nm.

En el estudio de los parámetros de desempeño se encontró:

- Especificidad

Se compararon los espectros de absorción de las muestras de placebo adicionado y analito en las cuales solo se observó un solo máximo de absorción, el cual era el mismo para ambas muestras, lo que indica que los excipientes aerosil, estearato de magnesio y ludipress, presentes en la formulación no interfieren en la lectura, este máximo de absorbancia se encuentra en la longitud de onda de 309 nm, el que corresponde a albendazol reportado en literatura.

- Precisión del sistema

Se analizaron seis muestras de diferentes porciones de una muestra homogénea de referencia y los resultados individuales, obtenidos tienen concordancia, ver Tabla 1 en donde indica que el de CV es de 0.7%, lo que indica que la dispersión entre muestras no es significativo.

- Linealidad del sistema

Los resultados obtenidos en los cinco niveles de concentración, preparados por triplicado, demuestran concordancia, ver Tabla 2, y en el Gráfico 1 se observa que los valores obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado, en el que se calcula r^2 la cual es igual a 0.9971 que compara los valores estimados y reales, y los

rangos con valor de 0 a 1. Si el valor es 1 hay una correlación perfecta en la muestra, es decir no hay diferencia entre el valor estimado y el valor real.

- Exactitud y repetibilidad del método

Al placebo adicionado preparado al 100% por sextuplicado presenta concordancia en los valores obtenidos independientes, estos resultados se muestran en la Tabla 5 teniendo un CV de 1.47 %.

- Linealidad del método

Para los niveles de concentración preparados por triplicado, en el Grafico 3 se observa que el valor r^2 es de 0.9991 el cual indica la proporcionalidad del analito adicionado y recuperado, y en la Tabla 9 se observa que el % de recobro obtenido para cada nivel, tiene un CV de 1.40 %.

- Precisión intermedia

En la Tabla 14 se observa que la cantidad recuperada individual por analista tiene concordancia entre un día y otro, no se observaron diferencias significativas entre las medidas de ambos analistas, el CV para este parámetro es de 1.25 %, lo que indica la poca dispersión entre muestras.

- Estabilidad analítica de la muestra

En la Tabla 16 se observa que la diferencia absoluta en condición de almacenaje:

*Almacenamiento luz y temperatura ambiente, los valores para las 24 h $d=4.5$, 48 h $d=18.75$ y para 72 h $d=19.08$

*Almacenamiento oscuridad y temperatura ambiente, los valores para las 24 h $d=0.34$, 48 h $d=11.69$ y para 72 h $d=19.1$

*Almacenamiento 40°C, los valores para las 24 h d=20.1, 48 h d=46.87 y para 72 h d=53.71

*Almacenamiento 4°C, los valores para las 24 h d=0.34, 48 h d=1.4 y para 72 h d=9.23

Se observa en el Grafico 4 que la condición a la que se encuentra más estable la muestra, es a 4°C durante 48 h, en la condición oscuridad a temperatura ambiente solo es estable durante 24 h, y para las otras dos condiciones que son luz a temperatura ambiente y 40°C a las 24 h se observa que el valor d es mayor al 3%.

- Determinación de contenido de albendazol en muestras comerciales

En la determinación de contenido, en los productos farmacéuticos: para el Producto I el % de principio activo respecto al marbete es de 110.2 % y para el Producto II el % de principio activo respecto al marbete es de 104.7 % de albendazol, basados en la FEUM el contenido indicado es no menos del 95.0 por ciento y no más del 105.0 por ciento de la cantidad de Albendazol, indicada en el marbete, por lo tanto el Producto I se encuentra fuera de lo especificado, por tener más contenido de principio activo, y para el Producto II este se encuentra dentro de los límites especificados.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

Se diseño y valido un método analítico, utilizando espectroscopia ultravioleta, con el objetivo de cuantificar los parámetros de validación de este.

Basados en los resultados, el parámetro de especificidad, demuestra que los excipientes no interfieren en el análisis, para precisión del sistema, linealidad del sistema, exactitud y repetibilidad del método, linealidad del método, precisión interdía, se evaluaron estadísticamente con el modelo de línea recta, en el cual el coeficiente de determinación r^2 fue mayor a 0.98 y los CV fueron menores al 3% especificado para los parámetros de desempeño que se realizaron.

La estabilidad analítica de la muestra solo se logra a 4° C durante 48 horas y en la condición de oscuridad a temperatura ambiente solo es estable durante 24 horas.

Se cuantifico albendazol en formas farmacéuticas comerciales presentación tabletas, para el Producto I se obtuvo 110.2 por ciento de principio activo respecto al marbete, lo que indica que se encuentra fuera de una especificación establecida y para el Producto II 104.7 por ciento de principio activo respecto al marbete, resultado que cumple con lo especificado.

Conforme a lo anterior podemos decir que el método es adecuado para cuantificar Albendazol en forma farmacéutica presentación tabletas, logrando los objetivos planteados al inicio de este trabajo.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO 1.

FORMULAS

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

$$CV = \frac{S}{y}$$

Pendiente

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

n= número de mediciones

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

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

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

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Intervalo de confianza para la vida poblacional

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

Media aritmética del análisis inicial

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

n_0 = numero de muestras del análisis inicial

Media aritmética de cada condición de almacenaje

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Comisión de validación de métodos analíticos. (2002) Guía de validación. Métodos analíticos. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. pp. 20-32, 55-70
2. Goodman and Gilman. (2001) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª ed. Mc Graw-Hill. pp. 1073-1079
3. Pavia Donal L. (1979) Introduction to spectroscopy. A guide for students of organic chemistry. 5ª ed. Saunders College Publishing. pp. 75-93
4. Skoog Douglas A.(2001) Principios de análisis instrumental. 5ª ed. Mc Graw Hill. pp. 322-347
5. Secretaria de Salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000) Farmacopea de lo Estados Unidos Mexicanos 7ª ed. pp. 628-629, 1048-1049
6. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SSA-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicadas a la fabricación de medicamentos.
7. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-073-SSA1-1993. Estabilidad de medicamentos.
8. Wade Ainley. (1994) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2ª ed. pp. 280-282, 424-426
9. www.pharma-solutions.bast.com, Información Técnica de Ludipress®