



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

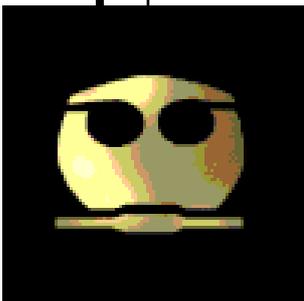
**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN UNA
PRESENTACIÓN FARMACÉUTICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SONIA ALEJANDRA REYES ZEPEDA



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. PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

VOCAL : Prof. MARIA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS

SECRETARIO : Prof. HONORIA FUENTES SIXTOS

1er. SUPLENTE : Prof. ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ

2do. SUPLENTE : Prof. NATIVIDAD GARCIA ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA

Pedro Villanueva González

SUTENTANTE

Sonia Alejandra Reyes Zepeda

AGRADECIMIENTOS.

Le doy gracias a Dios por todo lo que tengo en la vida, incluyendo lo que en cierto momento pudo llegar a ser malo pero con el paso del tiempo uno va comprendiendo que son lecciones para poder apreciar lo bueno, por mi familia y por coincidir en la vida con personas que son muy buenas conmigo.

A mis padres, ustedes son las personas mas importantes en mi vida, por lo que doy gracias a Dios de tenerlos con migo. Les agradezco todo el amor que me brindan, confianza, tolerancia y paciencia, por ser mi guía en mi vida. En fin todo lo que les pueda escribir se queda corto comparado con lo que siento por ustedes.

A mis hermanos, gracias por su apoyo, tolerancia y paciencia.

A mi amada familia gracias les debo lo que soy.

A la familia Reyes Landeros en especial a mi prima Claudia, a la familia Pérez Reyes y Carmen Cruz, les agradezco la ayuda que me proporcionan tanto a nivel profesional como personal.

A mi asesor Pedrito, muchas gracias por tu amistad, consejos, paciencia, tiempo y apoyo para poder realizar este proyecto.

A mis amigos:

Todos ustedes son importantes para mí no tomen en cuenta el orden saben que los quiero.

Rosario, América, Caro, Gaby Ortiz, Beto y Alejandro Arcos por su amistad sincera que a pesar de los años y la distancia siempre están para mí.

Miguel Ángel, Tere y Claudia que han estado con mígo casi desde el inicio de la carrera, gracias por su amistad y consejos, por ustedes mi estancia en la facultad fue mas agradable.

Juanita, Fernando (Moe), Mariela, Efrén, Belmont, Sandra y Víctor, gracias por ayudarme a lo largo de la carrera con sus conocimientos y recomendaciones.

Miriam Gabriela de verdad que con tígo en el servicio social todo fue mas divertido, por tu amistad gracias. Luis Merced que te puedo decir sabes que antes que nada eres un amigo al que aprecio y he aprendido mucho de tí.

Oscar, Manuel y Marino, gracias por su amistad.

A las personas que en algún momento estuvieron apoyándome y que por alguna razón o circunstancia las cosas cambiaron, les agradezco todo lo que en su momento me brindaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de química, gracias por la formación profesional que recibí, y por ser el medio para conocer personas que ahora son importantes para mí.

INDICE

	Pág.
CAPÍTULO I	
◆INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	4
CAPÍTULO II	
◆GENERALIDADES	5
Validación	6
Espectrofotometría	8
Ley de Lambert-Beer	14
Monografía de las tabletas de ácido fólico	15
Generalidades del ácido fólico	19
Características de los excipientes	20
CAPÍTULO III	
◆DESARROLLO EXPERIMENTAL	22
Material empleado	23
Disoluciones y reactivos empleados	23
Metodología para realizar la validación	24
Metodología para determinar ácido fólico en tabletas	38
CAPÍTULO IV	
◆RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Parámetros del sistema:	

	Pág.
Especificidad	43
Linealidad del sistema	44
Precisión del sistema	46
Parámetros del método:	
Linealidad del método	47
Exactitud y repetibilidad del método	49
Precisión del método	50
Estabilidad analítica de la muestra	50
Determinación de ácido fólico en tabletas	54
CAPÍTULO V	
◆ CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO VI	
◆ BIBLIOGRAFÍA	59
◆ ANEXOS	62

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCIÓN. (1,2,3,4,5,6,7)

Como muestra la bibliografía sabemos que el uso de un método analítico se justifica sólo después de haberse validado, así que hay interés en asegurarse de que los métodos son lo que pretenden ser. La Norma Oficial Mexicana NOM - 059 – SSA1 – 1993, establece que se debe contar con métodos de análisis validados para producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Pero si a este método se le hace un cambio para su aplicación o se utiliza un método no farmacopeico es necesario validarlo y en el caso de obtener resultados satisfactorios de cada parámetro entonces aplicarlo.

Estamos hablando de parámetros analíticos que deben medirse para validar un procedimiento analítico, así en el presente trabajo se muestra la adecuación y validación de un método analítico para determinar ácido fólico, es un método espectrofotométrico publicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se hacen cambios en la metodología. Cumplió con las especificaciones establecidas para cada parámetro analítico, por lo que se aplicó determinando el contenido de ácido fólico en tabletas de diferentes dosis.

Este trabajo se divide en seis capítulos y un anexo, en los cuales se muestra lo siguiente: primero se habla sobre las generalidades que conciernen al tema, es decir el concepto de validación y los parámetros analíticos que se deben evaluar, en este caso se utilizó un método espectrofotométrico para determinar el principio activo y por lo tanto se habla sobre en que se basa, que equipo debe utilizarse y como es que funciona, después se muestran las propiedades del ácido fólico, quien es nuestro analito de interés, como la forma farmacéutica para quien va dirigido este método analítico, son tabletas y se muestra la formulación que se utiliza (la reportada en la bibliografía).

El método se basa en la cuantificación de ácido fólico por espectrofotometría en la región ultravioleta del espectro electromagnético, el ácido fólico es soluble en disolución de hidróxido de sodio. Así el ácido fólico en disolución de hidróxido de sodio se encuentra como ión folato. el cual presenta tres picos en su espectro de absorción uno de ellos es a 360 nm, siendo está la longitud de onda que se utiliza para determinar el ácido fólico.

Una vez adecuado el método analítico se procede a validarlo y por lo tanto se muestran todos los reactivos, equipo, material y metodología empleada, primero se muestra la metodología para analizar cada parámetro en el orden que se realizó y después la metodología para aplicarlo en la determinación del ácido fólico en tabletas de diferentes marcas comerciales y de las siguientes dosis: 0.4 , 4 y 5 mg por tableta, se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

Se obtuvieron conclusiones con respecto a los objetivos planteados el mas importante es que el método cumplió con las especificaciones, se mostró la bibliografía consultada para la realización de este trabajo y en el anexo proporcionamos todas las formulas, tabla y ejemplos de cálculo para la determinación de cada parámetro.

Este trabajo que esta dirigido a los colegas que tienen la inquietud de como se realiza una validación de un método analítico les sea de interés, utilidad y agrado ó si se esta en busca de un método para determinar ácido fólico en tabletas que no implique un gran costo les ofrezca una nueva opción.

OBJETIVO

Objetivo general:

- Adecuación de un método espectrofotométrico para determinar ácido fólico, posteriormente validarlo y cuantificar ácido fólico en la forma farmacéutica tabletas que serán de diferentes marcas comerciales y diferentes dosis. Establecer las ventajas y desventajas del método con respecto a equipo, material, reactivos y tiempo.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES.

GENERALIDADES.

VALIDACIÓN.^(1,2,8,9,10,11)

Siempre se ha perseguido elaborar productos de calidad ya que así se satisface al consumidor y al fabricante, es decir en el ámbito farmacéutico para el fabricante es importante ya que será mas competitivo además que esto se reflejará en ganancias porque para el usuario el producto será confiable y eficaz así como sabemos la salud es un factor fundamental para el bienestar y desarrollo social de la comunidad, por lo que establece la Secretaria de Salud los requisitos mínimos que se deben cumplir durante el proceso de fabricación de fármacos para garantizar la calidad de los mismos, ya que son la base en la fabricación de medicamentos.

Uno de los requisitos mínimos es Validar el proceso, así que el termino Validación se define como contar con evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Se busca hacer bien el proceso partiendo de que ya se tiene validado el proceso.

Como se puede ver se habla de un “proceso”, esto quiere decir que para validarlo se requiere la calificación de cada uno de los elementos importantes del proceso siendo uno de estos elementos el método analítico.

Método analítico tiene por definición al proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Así en la validación de un método analítico se estudian diferentes parámetros de desempeño, unos son con respecto al sistema y otros con respecto al método, en la tabla No.1 se muestran los parámetros de desempeño en función de la aplicación analítica del método.

Parámetros de desempeño.

Parámetro de desempeño	Contenido/ potencia/ valoración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido/ valoración	Límite	
Precisión / adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	1
Linealidad del sistema	Si	Si	No	No
Especificidad ²	Si ⁴	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del método	Si	Si	No	No
Precisión del método o intermedia ³	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica ³ de la muestra	1	1	No	No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	1	1	1	No
Tolerancia	1	1	1	No

Tabla No. 1. En función de la aplicación analítica de un método, esta tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar.

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.

Un parámetro de desempeño es un parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación tiene especificación que se refiere a los límites de aceptación. Debemos tener presente la definición de cada uno de estos parámetros, por lo tanto a continuación se definirá cada uno.

El término Precisión se refiere al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales obtenidos al aplicar un procedimiento varias veces a diferentes porciones de una muestra, en el caso de precisión del sistema la muestra es la referencia que se ocupa a lo largo de toda la metodología y en el caso de precisión del método la muestra es la sustancia a analizar pero en este caso también es llamada Precisión intermedia porque el grado de concordancia es relativo puesto que es entre determinaciones obtenidas independientemente por diferentes analistas, en distintos días pero en un mismo laboratorio y siguiendo cada quien exactamente el mismo procedimiento respetando las condiciones de análisis.

Adecuabilidad del sistema es verificar que el sistema opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

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

Especificidad este parámetro es de gran importancia, también lo es el resto pero de él depende que el método analítico sea el adecuado ya que es la capacidad del método analítico para que la respuesta obtenida sea solo por el analito de interés.

Exactitud es el grado de concordancia que existe entre el valor real y el valor experimental.

Repetibilidad se refiere a la precisión de un método analítico, o grado de concordancia entre determinaciones independientes pero realizadas por un mismo analista usando los mismos instrumentos y método.

Estabilidad analítica de la muestra es la 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.

Límite de cuantificación es la concentración mínima del analito, que es posible cuantificar con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección es la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada.

Robustez es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método es decir influencia de factores internos.

Tolerancia es la reproducibilidad de resultados analíticos de la misma muestra obtenidos a diferentes condiciones normales de operación. se refiere a factores externos del método.

ESPECTROFOTOMETRÍA.^(12,13,14,15)

En este trabajo se presenta la validación de un método analítico el cual es un método espectroscópico y para entender bien los fundamentos necesitamos tomar en cuenta que los fotones al incidir sobre la materia pueden ser absorbidos, transmitidos, reflejados, refractados o difractados. Entre todos estos fenómenos el que mas nos interesa es la absorción, pues el modelo de longitudes de onda del fotón absorbido depende en alto grado de la estructura de la molécula absorbente, cromóforo.

La absorción de un fotón por una molécula es un proceso cuantizado, esto significa que una molécula sólo absorbe radiación de ciertas longitudes de onda específicas; todas las demás longitudes de onda son transmitidas sin que se verifique cambio alguno en la materia. Los fotones de una cierta región espectral excitarán a una determinada molécula en una forma específica.

La espectroscopia es la medición e interpretación de la radiación electromagnética absorbida o emitida cuando las moléculas, átomos o iones de una muestra se desplazan de un estado energético a otro. Todo átomo, ion o molécula, posee una relación individual y característica con la radiación electromagnética.

El paso de un haz de radiación a través de un medio transparente va acompañado de una absorción parcial, y también la absorción de radiación electromagnética es equivalente a la absorción de energía.

Cuando un átomo, ion, o molécula absorbe un fotón, la energía añadida produce una alteración de estado; la especie se dice entonces que está excitada. La excitación puede implicar 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 de modo de rotación.

Cada una de estas transiciones requiere una cantidad definida de energía; la probabilidad de que ocurra una transición particular es mayor cuando el fotón absorbido suministra precisamente esta cantidad de energía.

Las energías requeridas para estas transiciones varían considerablemente. En general, la promoción de electrones a niveles superiores requiere mayores energías que las necesarias para llevar a cabo cambios vibracionales. Análogamente las alteraciones en el modo rotacional requieren las energías más bajas de todas. De este modo, las absorciones observadas en las regiones de las microondas e infrarroja lejana, serán debidas a desviaciones en niveles rotacionales ya que la energía de la radiación es insuficiente para causar otros tipos de transición. Los cambios en los niveles vibracionales son responsables de las absorciones en las regiones del infrarrojo próximo y visible. Debido a que existe una serie de estados rotacionales para cada nivel vibracional, serían, igualmente absorbidos grupos de longitudes de onda que difieren sólo ligeramente en energía. La absorción debida a la promoción de un electrón a algún nivel de energía superior tiene lugar en las regiones visible, ultravioleta, y de rayos X del espectro electromagnético.

La absorción de la radiación de rayos X muy energética implica transiciones electrónicas de los electrones más internos de un átomo mientras que la absorción de radiación ultra-violeta y visible implica los electrones exteriores formadores de enlaces.

La absorción de la radiación por un sistema puede ser descrita por medio de una representación de la absorción como función de la longitud de onda; tal gráfica es llamada un espectro de absorción. Lo mismo que las energías requeridas para los varios procesos responsables de la absorción son únicas para una especie dada, también es único su espectro de absorción; como consecuencia los espectros de absorción son frecuentemente útiles para fines de identificación cualitativa.

Así consideraremos la absorción de radiación ultravioleta, la unidad que usaremos para describir las longitudes de onda es el nanómetro. El espectro visible se extiende aproximadamente desde 400 hasta 750, mientras que el de ultravioleta abarca el intervalo 100 – 400.

Instrumentación para la espectrofotometría.

Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la transmitancia o la absorbancia de una muestra en función de una longitud de onda determinada; también se pueden realizar las mediciones de una serie de muestras a una sola longitud de onda. Estos instrumentos se pueden clasificar en: analógicos y digitales, de uno o doble haz, los instrumentos de un solo haz, por lo general, se operan en forma manual y los instrumentos de doble haz poseen el registro automático de los espectros de absorción, pero también es posible registrar un espectro con los de un solo haz. Una clasificación alternativa se basa en la región espectral y así hablamos de espectrofotómetros de infrarrojo o de ultravioleta o del visible.

Espectrofotómetros de un solo haz.

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro, los cuales se presentan en forma esquemática en la figura No.1 , son los siguientes:

1. Una fuente de energía radiante continua que cubre la región del espectro en la cual opera el instrumento.
2. Un monocromador, que es una parte del instrumento que aísla una banda angosta de longitud de onda de todo el espectro emitido por la fuente.
3. Un recipiente para la muestra.
4. Un detector.
5. Un amplificador y un circuito asociado que traduce la señal eléctrica a la lectura apropiada.
6. Un sistema de lectura de la medición que pone de manifiesto la magnitud de la señal eléctrica.

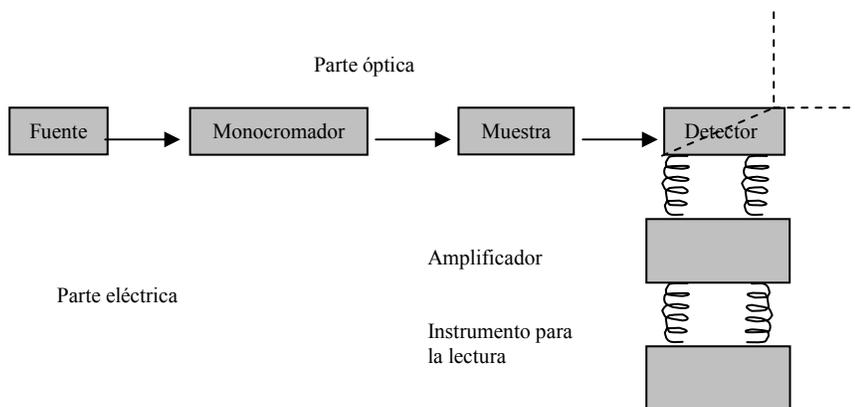


Figura No.1 Diagrama de bloques que muestra los componentes de un espectrofotómetro de un solo haz. Las flechas representan la energía radiante, las líneas enrolladas son conexiones eléctricas. Las partes óptica y eléctrica del instrumento se juntan en el detector, un transductor que convierte la energía radiante en energía eléctrica.

Fuente de energía radiante.

La fuente de energía radiante acostumbrada para la región visible del espectro, así como para el infrarrojo cercano y el ultravioleta cercano, es una lámpara incandescente con un filamento de tungsteno.

La distribución de la energía está en función de la temperatura del filamento, la cual depende a su vez del voltaje que se suministra a la lámpara: un incremento en la temperatura de operación aumenta la energía total que se produce y traslada el pico hacia una longitud de onda más corta. Por esta razón el voltaje de la lámpara debe ser estable; el instrumento tiene incorporado un regulador de voltaje.

Por debajo de los 350 nm, la potencia de una lámpara de tungsteno es inadecuada para los espectrofotómetros y se debe emplear una fuente diferente. La más común es un tubo de descarga de hidrógeno (o deuterio) el cual se utiliza de 175 a 375 o 400 nm. Cuando una descarga entre dos electrodos excita la emisión por medio de un gas como el hidrógeno, se obtiene un espectro de líneas que es característico del gas, siempre y cuando la presión sea relativamente baja.

Cuando aumenta la presión del hidrógeno, las líneas se ensanchan y con el tiempo se sobrepone, hasta que a presiones relativamente altas emiten un espectro continuo. La presión que se requiere en un tubo de descarga de hidrógeno es menor que la que se necesita con otros gases; además el tubo funciona a temperaturas más bajas. La cubierta que se emplea es de vidrio, pero para que pase la radiación ultravioleta está provista de una ventana de cuarzo. Para los tubos de descarga gaseosos se requiere una fuente de alto voltaje. En algunos espectrofotómetros se pueden intercambiar las fuentes de tungsteno y de hidrógeno para cubrir las regiones visible y ultravioleta en las que opera el instrumento.

El monocromador.

Este es un instrumento óptico que sirve para separar de una fuente de radiación continua un haz de elevada pureza espectral y de cualquier longitud de onda. Los componentes esenciales de un monocromador son rendijas y un elemento dispersor. La radiación de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada y es colimada por una lente o por un espejo para que el haz llegue paralelo al elemento dispersor, el cual puede ser un prisma o una rejilla de difracción. Al mover el prisma o la rejilla las fracciones del espectro que produce el elemento dispersor se enfocan sobre la rendija de salida, desde donde se dirigirá hacia la muestra siguiendo un patrón óptico adicional.

La pureza espectral de la radiación que emerge del monocromador depende del poder del elemento dispersor y del ancho de la rendija de salida. Como primera idea podríamos suponer que la monocromación se puede lograr como la deseamos al disminuir lo suficiente el ancho de la rendija.

Con los monocromadores de prisma no se obtiene el mismo grado de monocromación a lo largo de todo el espectro con una abertura de rejilla. La dependencia que tiene el prisma con respecto a la longitud de onda es tal que las longitudes de onda no se dispersan de manera uniforme en el espectro. La dispersión es mayor para las longitudes

de onda más cortas y por lo tanto en este caso las rendijas anchas alcanzarán el mismo grado de pureza espectral que el que logran las angostas a longitudes de onda mayores.

El recipiente para la muestra.

La mayor parte de la espectrofotometría utiliza soluciones y por esta razón la mayoría de los recipientes para la muestra son celdas para colocar líquidos en el haz del espectrofotómetro. La celda debe transmitir la energía radiante en la región espectral que nos interesa; de esta forma las celdas de vidrio sirven en la región visible, las de cuarzo o de vidrios especiales con alto contenido de sílice para la región ultravioleta y las de sal en la región infrarroja. Debemos recordar que la celda, que en cierto modo es sólo un recipiente para la muestra, en realidad es más que eso puesto que, cuando se coloca en su lugar, forma parte de la trayectoria óptica del espectrofotómetro y sus propiedades ópticas son importantes.

Las mejores celdas tienen superficies ópticas planas. Las celdas se deben llenar de tal forma que el haz de luz pase a través de la disolución. Por lo general, las celdas se mantienen en posición por medio del diseño o mediante sujetadores de resorte que aseguran la posición reproducible en el comportamiento de la celda en el instrumento.

Las celdas típicas para las regiones visible y ultravioleta tienen 1 cm de paso de luz, pero existe una gran variedad que va desde fracciones de milímetro hasta 10 cm o aún más.

Detector.

Las características que deseamos encontrar en un detector para un espectrofotómetro son: sensibilidad elevada en la región espectral que nos interesa, respuesta lineal para la energía radiante, tiempo de respuesta rápido, buena disponibilidad para la amplificación y alta estabilidad o bajo nivel de "ruido".

El detector fotoeléctrico más común es el fototubo. Consiste en un tubo al vacío con una ventana transparente que contiene un par de electrodos en los que se mantiene un potencial. La superficie del electrodo negativo es fotosensible; esto quiere decir que, cuando el electrodo se irradia con fotones de suficiente energía, los electrones son expulsados de su superficie. Los electrones se aceleran por la diferencia de potencial, llegan al electrodo positivo y se establece una corriente en el circuito. Existen varios fototubos que difieren en el material con el que está construida la superficie del cátodo (también es diferente la ventana) y por tanto en su respuesta a la radiación de diversas frecuencias.

Los tubos fotomultiplicadores son más sensibles que los fototubos comunes debido a la elevada amplificación que se logra con el tubo en sí. Este tipo de tubo tiene una serie de electrodos, cada uno con potencial positivo que va en aumento en forma progresiva con respecto al cátodo. La geometría del tubo es tal que los fotoelectrones primarios se enfocan en un haz y son acelerados hasta un electrodo que es más positivo que el cátodo. El bombardeo de este electrodo (o dínodo, como se le conoce) libera mucho más electrones

secundarios que se aceleran hasta un tercer electrodo, más positivo, y así sucesivamente, puede ser que hasta por diez etapas. Para operar el tubo se necesita una fuente de alto voltaje regulado. La señal de salida del fotomultiplicador se amplifica aún más con un amplificador electrónico externo.

Operación del espectrofotómetro de un solo haz.

Existe un obturador opaco, controlado por el operador, que puede colocarse enfrente del fototubo de modo que el tubo esté en la oscuridad. Con este obturador en posición fluye una pequeña corriente (“corriente oscura”) en el circuito del fototubo, debido a la emisión térmica de electrones mediante el cátodo o probablemente por una pequeña fuga en el tubo. El operador cancela la corriente oscura por medio de un botón del instrumento y coloca la escala del aparato para medir absorbancia infinita (cero transmitancia). En seguida, se coloca la longitud de onda en el valor deseado y la celda que contiene una solución de referencia se pone en su compartimiento (la referencia puede ser el solvente puro, un “blanco” de un procedimiento analítico, etc.); después se quita el obturador para que el detector quede expuesto. Ahora la escala del instrumento se ajusta para leer cero de absorbancia (100 % transmitancia) por medio del control del haz que sale del monocromador ajustando la energía radiante que llega al detector y/o cambiando en forma electrónica la ganancia del amplificador. Cuando ya se ajustó la escala de esta manera, la solución que contiene la muestra se coloca en su posición y se lee la absorbancia o la transmitancia. (La escala por lo general es lineal en transmitancia, pero la mayoría de los instrumentos tienen una escala para la absorbancia junto con la transmitancia para que se pueda leer cualquiera de las dos.)

La escala se debe reajustar, justo como se describió antes, cada vez que se cambie la longitud de onda para compensar la variación que tiene la salida de la fuente de energía con la longitud de onda, así como la dependencia que tiene la respuesta del detector con la longitud de onda y también cualquier absorción que pudiera tener la solución de referencia en la nueva longitud de onda. Es una buena práctica verificar la corriente oscura y la solución de referencia porque puede existir una derivación en el circuito y en la salida de la fuente. Por lo general se emplean dos celdas, una para la solución de referencia y la otra para la muestra que se va a medir; es obvio que estas celdas deben ser semejantes con respecto a la longitud que atraviesa el haz y a sus cualidades ópticas.

Selección de la longitud de onda a emplear.

Es buena práctica escoger la longitud de onda más adecuada para la medida cuantitativa a partir del espectro de absorción completo de la sustancia a determinar. En algunos casos, éste se encuentra en la bibliografía; sin embargo, a menudo es preferible producir la curva experimentalmente bajo condiciones idénticas a las que serán empleadas en el análisis. Ordinariamente, es seleccionando para el trabajo cuantitativo una longitud de onda que relacionan la absorbancia con la concentración será obtenida a un máximo de absorción; como consecuencia se conseguirá un máximo en la sensibilidad.

VARIABLES QUE INFLUYEN SOBRE LA ABSORBENCIA.

Algunas variables comunes influyen de ordinario sobre el espectro de absorción de una sustancia. La naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, la presencia de altas concentraciones de electrolito, y la presencia de otras ciertas sustancias pueden ser citadas como ejemplos comunes. Los efectos de estas variables deben ser conocidos y elegidos una serie de condiciones analíticas tales para que la absorbancia no esté materialmente influenciada por su variación incontrolada.

En muchos casos la especie absorbente es producida por una reacción química entre la sustancia a determinar y el reactivo. Aquí debe ser también estudiada la influencia de la concentración del reactivo y la velocidad a la cual se forma el producto.

LEY DE LAMBERT Y BEER.^(14,15)

La siguiente ecuación muestra que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes cuando es fija la longitud del paso de luz y directamente proporcional a la longitud del paso de luz cuando es fijada la concentración

$$\log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = A$$

P_0 y P , se recomiendan para las energías radiante y transmitida, respectivamente, el término $\log (P_0/P)$ se conoce como la absorbancia y se le adjudica el símbolo A , b está aceptado para representar la longitud de la trayectoria del haz de radiación a través del medio absorbente; casi siempre se expresa en centímetros.

Para la concentración del soluto absorbente, c , se emplean con frecuencia dos unidades diferentes, gramos por litro y moles por litro. Es claro que el valor de la constante, Cuando c está en gramos por litro, la constante es la absorptividad cuyo símbolo es a . Cuando c está en moles por litro, la constante se denomina absorptividad molar cuyo símbolo es ϵ . De esta manera, dependiendo del sistema de concentración, la ley de Lambert y Beer puede tomar dos formas:

$$A = abc_{\text{g/litro}} \quad \text{o} \quad A = \epsilon bc_{\text{mol/litro}}$$

La transmitancia, $T = P/P_0$, es sencillamente la fracción de la energía incidente que es transmitida por una muestra. El por ciento de transmitancia, $\%T = (P/P_0) 100$, también se utiliza mucho. Si $A = -\log (P/P_0)$ y $T = P/P_0$, entonces $A = \log (1/T)$. Puesto que por la ley de Beer sabemos que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, es claro que la transmitancia no lo es; para obtener una gráfica lineal debemos graficar $\log T$ contra c . En la figura 2 podemos apreciar este fenómeno. Los detectores de la mayoría de los instrumentos generan una señal que es lineal en transmitancia, debido a que responden en forma lineal a la energía radiante. Es por esto que si un instrumento se va a leer en

unidades de absorbancia, debe existir una escala logarítmica en la pantalla del aparato o la señal debe alterar por medio de un circuito electrónico o un dispositivo mecánico para producir una respuesta logarítmica.

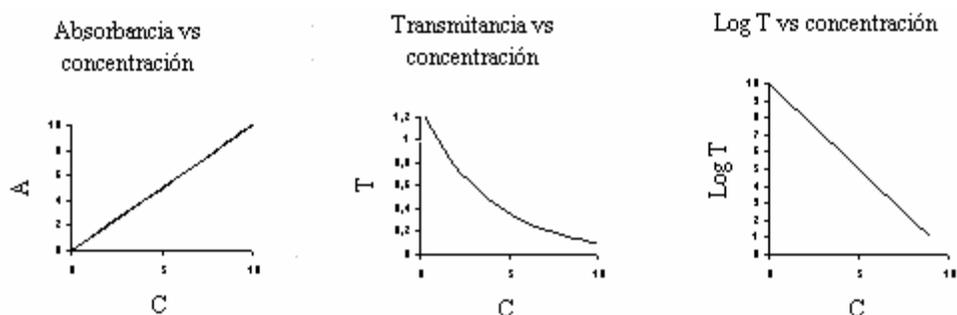
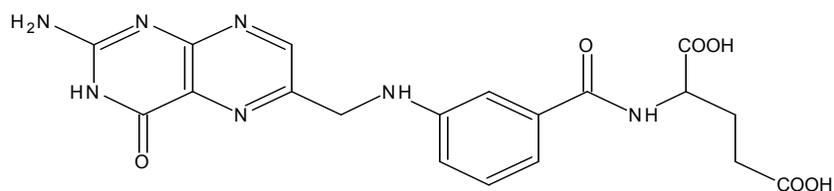


Figura No.2 Apariencia de las gráficas de la Ley de Beer.

MONOGRAFÍA DE LAS TABLETAS DE ACIDO FÓLICO. ⁽⁵⁾

Fórmula $C_{19}H_{19}N_7O_6$



Ácido fólico. Tabletas

Contienen no menos del 90 % y no más del 110 % de la cantidad de $C_{19}H_{19}N_7O_6$, indicada en el marbete.

Sustancia de referencia.

Ácido fólico, no secar, determinar el contenido de agua como se indica en MGA 0041, valoración directa.

Ensayos de identidad.

A. MGA 0361.

Preparación de referencia. Preparar una disolución de la disolución de referencia con solución al 0.4 por ciento m/v de hidróxido de sodio que contenga 10 µg/mL de ácido fólico.

Preparación de la muestra. Pesar no menos de 30 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino, pesar una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de ácido fólico, digerir con 100 mL de solución al 0.4 % m/v de hidróxido de sodio y filtrar . Ajustar el pH de la disolución a 3 con disolución de ácido clorhídrico , enfriar la disolución hasta 5° C, filtrar y lavar el precipitado con agua fría hasta que los lavados no contengan cloruros, lavar el precipitado con acetona y secarlo a 80° C durante 1 hora. Del residuo obtenido pesar 10 mg, pasar a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar al aforo con solución al 0.4 % m/v de hidróxido de sodio, mezclar. Pasar una alícuota de 1 mL de la disolución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con disolución al 0.4 % m/v de hidróxido de sodio y mezclar. El espectro de absorción en la región ultravioleta obtenido con la preparación de la muestra, corresponde con lo obtenido con la preparación de referencia, emplear celdas de 1 cm y solución al 0.4 % m/v de hidróxido de sodio, como blanco de ajuste.

B. MGA 0241, Capa delgada.

Soporte. Gel de sílice GF₂₅₄; capa de 0.25 mm de espesor.

Fase móvil. Mezcla de etanol-1-propanol-hidróxido de amonio (60:20:20).

Preparación de referencia. Preparar una solución de la disolución referencia de ácido fólico en una mezcla de metanol-hidróxido de amonio (9:1) que contenga 1 mg/mL de ácido fólico.

Preparación de la muestra. Pesar no menos de 10 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino y pesar una cantidad de polvo equivalente a 25 mg de ácido fólico, pasar a un tubo de centrifuga, agregar una alícuota de 25 mL de una mezcla de metanol-hidróxido de amonio (9:1), agitar y centrifugar, utilizar el líquido sobrenadante de la prueba.

Procedimiento. Aplicar a la cromatoplaça, en carriles separados, 10 µL de la preparación de referencia y 10 µL de preparación de la muestra. Desarrollar el cromatograma dejando correr la fase móvil hasta $\frac{3}{4}$ partes arriba de la línea de aplicación, retirar la cromatoplaça de la cámara, marcar el frente de la fase móvil, secarla con corriente de aire seco y observar bajo lámpara de luz ultravioleta. La mancha obtenida en el cromatograma para la preparación de la muestra, debe corresponder en tamaño, color y R_f a la mancha obtenida con la preparación de referencia.

Tiempo de Desintegración.

MGA 0261. Tiempo máximo 30 minutos.

Uniformidad de dosis.

MGA 0299. Cumple con los requisitos.

Aminas libres.

MGA 0361. Proceder como se indica en Valoración. La absorbancia obtenida con la disolución no reducida de la preparación de la muestra, no debe ser mayor que una tercera parte de la absorbancia obtenida con la disolución reducida de la preparación de la muestra.

Valoración.

MGA 0361.

Preparación de referencia:

Disolución concentrada. Preparar una solución de la disolución de referencia en disolución 0.1 M de hidróxido de sodio que contenga 500 µg/mL de ácido fólico.

Disolución reducida. Pasar una alícuota de 3 mL de la disolución concentrada a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 20 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico, llevar al aforo con agua y mezclar. Pasar 50 mL de la disolución anterior a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, agregar 500 mg de zinc en polvo, mantener la disolución en la obscuridad durante 20 minutos, con agitación frecuente y filtrar. Pasar una alícuota de 10 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 15 mL de agua, 5 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico y 5 mL de disolución al 0.1 % m/v de nitrito de sodio, mezclar y dejar reposar durante 2 minutos, agregar 5 mL de disolución al 0.5 % m/v de sulfamato de amonio, mezclar y dejar reposar durante 2 minutos, agitar nuevamente hasta desaparición de las burbujas de dióxido de nitrógeno, agregar 5 mL de solución al 0.1 % m/v de dicloruro de N-(1-naftil)-etanol-1,2-diamonio, mezclar y dejar reposar durante 10 minutos, llevar al aforo con agua y mezclar.

Disolución no reducida. Pasar una alícuota de 30 mL de la solución concentrada a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 20 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico, llevar al aforo con agua y mezclar. Pasar una alícuota de 10 mL de la disolución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL y proseguir como se indica en la disolución reducida a partir de "...agregar 15 mL de agua...".

Preparación de la muestra:

Disolución concentrada. Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino, pesar una cantidad del polvo equivalente a 50 mg de ácido fólico, pasar a un matraz Erlenmeyer agregar una alícuota de 100 mL de disolución 0.1 M de hidróxido de sodio, agitar y filtrar.

Disolución reducida. Pasar una alícuota de 3 mL de la disolución concentrada a un matraz volumétrico de 100 mL y continuar como se indica en la preparación de la disolución reducida de la preparación de referencia a partir de "...agregar 20 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico...".

Disolución no reducida. Pasar una alícuota de 30 mL de la disolución concentrada a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 20 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico, llevar al aforo con agua y mezclar. Pasar una alícuota de 10 mL de la disolución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL y proseguir como se indica en la preparación de la disolución reducida de la preparación de referencia a partir de "...agregar 15 mL de agua...".

Blanco de reactivos. Pasar 25 mL de agua a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 5 mL de disolución 2 M de ácido clorhídrico y 5 mL de disolución al 0.1 % m/v de nitrito de sodio, mezclar y dejar reposar durante 2 minutos, agregar 5 mL de disolución al 0.5 % m/v de sulfamato de amonio; mezclar y dejar reposar durante 2 minutos, agregar 5 mL de disolución al 0.1 % m/v de dicloruro de N-(1-naftil)-etanol-1,2-diamonio, mezclar y dejar reposar durante 10 minutos, llevar al aforo con agua y mezclar.

Procedimiento. Obtener las absorbancias de las disoluciones reducidas de la preparación de la muestra y de la referencia, antes de que transcurran 25 minutos de la adición de la disolución de dicloruro de N-(1-naftil)-etanol-1,2-diamonio, a la longitud de onda de 550 nm aproximadamente, empleando celdas de 1 cm y el blanco de reactivos para ajustar el aparato. Restar un décimo de la absorbancia obtenida con la disolución no reducida a la absorbancia obtenida con la disolución reducida de las preparaciones de referencia y de la muestra. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ en la porción de la muestra tomada, por medio de la siguiente fórmula:

$$C * D * \frac{A_m - A'_m}{A_{ref} - A'_{ref}}$$

En donde, C es la concentración de la disolución de referencia de ácido fólico por mililitro en la disolución concentrada de referencia; D es el factor de dilución de la muestra; A_m es la absorbancia obtenida con la disolución reducida de la preparación de la muestra; A'_m un décimo de la absorbancia obtenida con la disolución no reducida de la preparación de la muestra; A_{ref} es la absorbancia obtenida con la disolución reducida de la preparación de referencia y A'_{ref} un décimo de la absorbancia obtenida con la disolución no reducida de la preparación de referencia.

GENERALIDADES DEL ÁCIDO FÓLICO. ^(16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27)

Ácido fólico

En la bibliografía se encuentra que el ácido fólico son cristales color amarillo anaranjado, insípido, inodoro, ligeramente soluble en metanol y escasamente soluble en agua, insoluble en acetona, éter, benceno, moderadamente soluble en hidróxido de sodio diluido y disoluciones carbonadas, estable al calor en disoluciones alcalinas y neutras; destruido por el calor en ácidos; inactivado por la luz. Tiene tres constantes de disociación pKa 4.7 , 6.8 y 9.0 a 30° C.

El espectro de absorción en el ultravioleta, de disoluciones a pH = 13, presenta 3 picos en las longitudes de 256, 283 y 368 nm.

El ácido fólico es la sustancia precursora de un grupo grande de compuestos conocidos como folatos es el compuesto químico ácido pteroilglutámico y su estructura consta de tres residuos: pteridina, á. p-aminobenzoico y á. L-glutámico.

Las principales fuentes dietéticas de ácido fólico son los vegetales con hojas verdes, huevos, leche, levadura, hígado, cereales integrales y frutas. También es sintetizado por microorganismos intestinales. El folato es absorbido por las células del yeyuno proximal; en ellas es reducido y convertido en su forma transportable, este último es transportado a través del plasma hasta los tejidos donde es utilizado.

Es un componente esencial en la dieta del ser humano puesto que su deficiencia produce una síntesis defectuosa del DNA., en toda célula que intenta su replicación cromosómica y división. Dado que los tejidos con mayor índice de renovación celular son los que presentan mayores alteraciones, el sistema hematopoyético resulta especialmente sensible a la deficiencia de ácido fólico así que el signo mas temprano de la deficiencia de ácido fólico es la anemia megaloblástica en la cual el defecto de la síntesis del DNA. produce anomalía morfológica característica de las células precursoras de la médula ósea.

La deficiencia de folato puede deberse a diversas causas algunos ejemplos son: deficiencia nutricional de folato, defectos en su absorción, empleo prolongado de anticoagulantes y en algunas mujeres, de anticonceptivos orales además de enfermedad hepática. Sus altas concentraciones se han relacionado con efecto teratogénico, así como enfermedad cardiovascular por afección de los sistemas de coagulación y de integridad del endotelio vascular.

La ración diaria de folato recomendada es de 400 mg para proporcionar un requerimiento mínimo diario de unos 50 µg. El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del complejo B, que se administra por vía oral y parenteral., las presentaciones farmacéuticas que ofrecen como principio activo solo ácido fólico son inyectables y tabletas en diferentes dosis.

Como sabemos el tratamiento será específico para cada padecimiento, las dosis en tabletas que hay son de 0.4 ,4 y 5 mg por tableta.

Existen diferentes métodos directos e indirectos para determinar ácido fólico dependiendo de en donde se encuentra, así para determinar folato sérico se utiliza radioinmunoensayo (RIA), cuantificar excreción de metabolitos específicos en orina para indirectamente indicar si hay o no deficiencia de ácido fólico en el organismo, en alimentos el método mas utilizado es cromatografía de líquidos (HPLC). Pero para determinar ácido fólico en preparaciones farmacéuticas el método que al igual que en los alimentos se utiliza mucho es cromatografía de líquidos, también hay muchos mas y entre ellos son: electroanálisis, espectrofotometría, quimioluminiscencia., inmunoenzimaticos y fluorimetria.

En este trabajo se presenta un método espectrofotometrico para determinar ácido fólico en presentación farmacéutica tabletas, por lo que se tomo en cuenta la siguiente formulación reportada en bibliografía:

Formulación para tabletas de ácido fólico en dosis de 5 mg por tableta.

Ácido fólico	5.0 g
Ludipress	195.0 g
Estearato de Magnesio	1.5 g

CARACTERÍSTICAS DE LOS EXCIPIENTES. ^(5,28)

Ludipress

Es una mezcla de productos que esta formado por: el 93.4 % de alfa lactosa monohidrato (diluyente), el 3 % de povidona (aglutinante) y el 3.4 % de crospovidona (desintegrante).

Dentro de sus características físicas se encuentra que el material consiste en partículas esféricas hechas de pequeños cristales lo que le da excelente fluidez y excelente perfil de presión y dureza. El desintegrante que posee es muy eficaz lo que provoca la rápida liberación del principio activo.

Estearato de Magnesio

Sal magnésica del ácido octadecanoico. Compuesto de magnesio con una mezcla ácidos orgánicos sólidos obtenida a partir de grasas y que consiste fundamentalmente en proporciones variables de estearato de magnesio y palmitato de magnesio. Contiene el equivalente de 6.8 a 8 % de MgO.

Polvo blanco, ligero, fino, inodoro o con ligero olor a ácido esteárico, untuoso al tacto. Casi insoluble en agua, etanol al 95 % v/v y éter dietílico.

CAPÍTULO III

DESARROLLO

EXPERIMENTAL.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

MATERIAL Y EQUIPO EMPLEADO.

Anillo metálico
Bulbo
Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
Embudos
Espátula
Frascos viales de 20 mL con tapa de rosca
Gradilla
Matraz volumétrico de 1 L
Matraces volumétricos de 5 mL
Matraces volumétricos de 10 mL
Matraces volumétricos de 50 mL
Matraces volumétricos de 100 mL
Microbureta de 10 mL con graduación de 0.05 mL
Mortero y pistilo de porcelana
Naves
Papel filtro Whatman No. 40
Pinzas para bureta
Pipetas Pasteur
Pipetas volumétricas de 2 mL
Pipetas volumétricas de 5 mL
Pizeta
Propipeta
Soporte universal
Termómetro
Tubos de ensayo de 16 * 150
Vasos de precipitados de 50 , 100 y 250 mL
Vidrio de reloj
Balanza modelo BP210S marca Sartorius máxima. 210 g d = 0.1 mg
Espectrofotómetro Hitachi Perkin- Elmer Coleman 139.
Refrigerador con una temperatura de 4° C.

DISOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS.

Agua destilada.
Disolución de Hidróxido de sodio 0.1 M la cual fue preparada de la siguiente manera: pesar 4 g de lentejas de hidróxido de sodio, transferirlas a un vaso de precipitados y diluir en aproximadamente 20 mL de agua destilada, después pasar esta disolución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 L , aforar y homogenizar.
Estándar de ácido fólico pureza 98 %
Estearato de Magnesio USP.
Ludipress USP.

METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Especificidad.

Para evaluar este parámetro del sistema, se obtuvo el espectro de absorción en un intervalo de longitud de onda de 220 a 400 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y disolución de hidróxido de sodio 0.1 M como blanco de ajuste de las siguientes disoluciones:

- Disolución de la muestra de referencia de concentración 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$.
- Disolución de la muestra de placebo cargado con ácido fólico, concentración 29.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Disolución del placebo.

Se utilizó para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1 \text{ mg}$ y una microbureta de 10 mL con graduación de 0.05 mL para tomar las alícuotas.

Para el cálculo de la concentración de cada disolución se tomó en cuenta la pureza del estándar.

El placebo adicionado con ácido fólico contiene por cada 3 g : 0.0744 g de estándar de ácido fólico, 2.9032 g de Ludipress y 0.0223 g de Estearato de Magnesio.

Ejemplo, disolución de la muestra de referencia concentración 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ácido fólico.

$$\left(\frac{0.0060 \text{ g estándar}}{10 \text{ mL}}\right)\left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right)\left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right)\left(\frac{0.5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right)\left(\frac{98\%}{100\%}\right) = 29.40 \mu\text{g} / \text{mL}$$

La figura No.3 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA

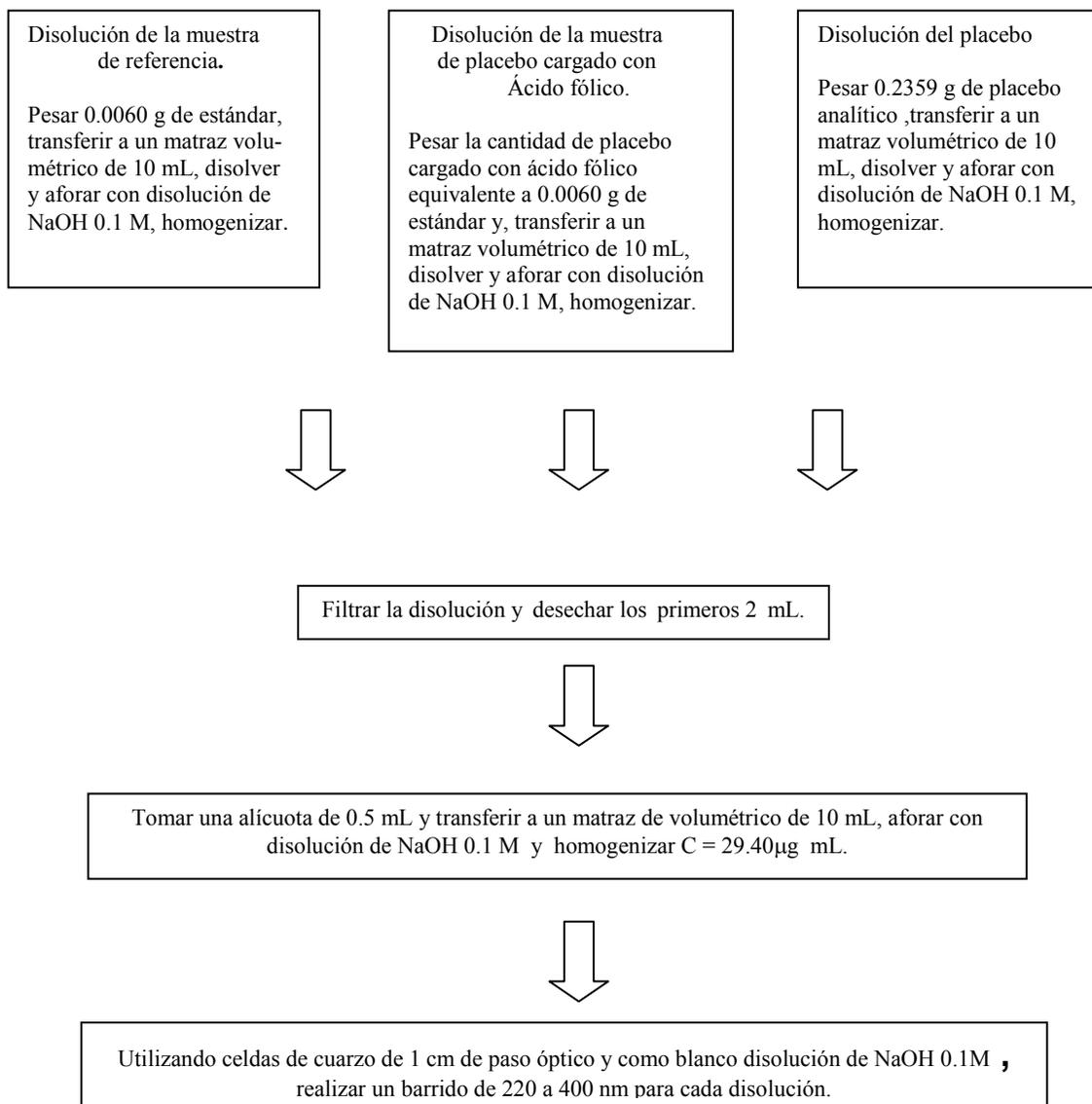


Figura No. 3 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Especificidad.

Linealidad del Sistema.

Por triplicado y por dilución se prepararon 7 niveles de concentración (11.76, 17.64, 23.52, 29.40, 35.28, 41.16 y 47.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$) partiendo de una disolución de referencia de ácido fólico de concentración de 98 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (se pesó 0.005 g de estándar de ácido fólico y se llevó a 50 mL), por ejemplo para preparar la disolución de concentración 47.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$ se tomó una alícuota de 2.4 mL de la disolución concentrada utilizando una bureta de 10 mL y graduación de 0.05 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, se llevó al aforo con la disolución de hidróxido de sodio. Las concentraciones corresponden al 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 %, considerando como el 100 % la concentración de 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se obtuvieron las absorbancias de cada disolución a 360 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y disolución de hidróxido de sodio 0.1 M como blanco.

Se utilizó para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1$ mg y una microbureta de 10 mL con graduación de 0.05 mL para tomar las alícuotas.

Para el cálculo de la concentración de cada disolución se tomó en cuenta la pureza del estándar.

Ejemplo, disolución de ácido fólico concentración 47.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ácido fólico.

$$\left(\frac{0.0050 \text{ g estándar}}{50 \text{ mL}}\right)\left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right)\left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}\right)\left(\frac{2.4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}}\right)\left(\frac{98\%}{100\%}\right)=47.04 \mu\text{g} / \text{mL}$$

Ejemplo para calcular la concentración en porcentaje, considerando que el 100 % corresponde a 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

$$\left(\frac{47.04 \mu\text{g} / \text{mL}}{29.40 \mu\text{g} / \text{mL}}\right)(100\%)=160\%$$

La figura No.4 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar una disolución de $C = 98 \mu\text{g} / \text{mL}$, pesar 0.0050 g de estándar de ácido fólico, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL disolver y aforar con disolución de $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$, homogenizar.



Enumerar del 1 al 7 matraces volumétricos de 5 mL y tomar las siguientes alícuotas:

Matraz	Volumen (mL)	Concentración (%)
1	0.6	40
2	0.9	60
3	1.2	80
4	1.5	100
5	1.8	120
6	2.1	140
7	2.4	160



Diluir y aforar con disolución de $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$,



Utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y como blanco disolución de $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$ determinar la absorbancia de cada disolución a 360 nm .

Figura No. 4 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Linealidad del sistema.

Precisión del Sistema.

Para evaluar este parámetro se prepararon por dilución y por sextuplicado disoluciones de ácido fólico concentración al 100 % es decir 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se obtuvieron las absorbencias de cada disolución a una longitud de onda de 360 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y disolución de hidróxido de sodio 0.1 M como blanco.

Se utilizó para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1$ mg y una microbureta de 10 mL con graduación de 0.05 mL para tomar las alícuotas.

Para el cálculo de la concentración de cada disolución se tomó en cuenta la pureza del estándar.

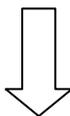
Ejemplo, disolución de ácido fólico concentración 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ácido fólico.

$$\left(\frac{0.0060 \text{ g estándar}}{10 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) \left(\frac{0.5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) \left(\frac{98\%}{100\%} \right) = 29.40 \mu\text{g} / \text{mL}$$

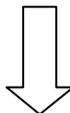
La figura No.5 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO PRECISIÓN DEL SISTEMA

Pesar 0.0060 g de estándar, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con disolución de NaOH 0.1 M, homogenizar $C = 588 \mu\text{g} / \text{mL}$.



Por sextuplicado preparar la siguiente disolución: tomar una alícuota de 0.5 mL, transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con disolución de NaOH 0.1 M y homogenizar $C = 29.40 \mu\text{g} / \text{mL}$.



Utilizando celdas de 1 cm de paso óptico y como blanco disolución de NaOH 0.1 M, determinar la absorbancia de cada disolución a 360 nm.

Figura No. 5 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Precisión del sistema.

Linealidad del Método.

Para obtener la linealidad del método se prepararon por triplicado tres muestras a diferentes niveles de concentración 23.52 , 29.79 y 35.28 $\mu\text{g} / \text{mL}$ que corresponden al 80 , 101.33 y 120 %, dichas muestras se prepararon con la cantidad de placebo analítico constante y correspondiente a una muestra analítica al 101.33 %, se adicione la cantidad de ácido fólico SR necesaria para cada concentración. También se preparo una disolución de referencia de ácido fólico pesando 0.0038 g de estándar transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 50 mL disolver y aforar con disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, homogenizar, filtrar desechando los primeros 2 mL, tomar una alícuota de 2 mL transferirlos a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con disolución de hidróxido de sodio, homogenizar.

Se utilizo para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1$ mg y una pipeta volumétrica de 2 mL para tomar las alícuotas.

Por ejemplo para preparar una disolución de nivel de concentración al 80 %, a un matraz volumétrico de 50 mL se agrego 0.1494 g de placebo y 0.0030 g de estándar de ácido fólico (es importante recordar que su pureza es de 98 %), después se agrego un poco de la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M para disolver y posteriormente aforar con la misma disolución.

Una vez que se tiene homogénea la disolución se filtra con papel Whatman No.40 desechando los primeros 2 mL del filtrado. Pasar una alícuota de 2 mL de esta disolución a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar al aforo con la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, homogenizar.

Se obtuvieron las absorbencias de cada disolución a 360 nm utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y disolución de hidróxido de sodio como blanco de ajuste.

Para el calculo de la concentración de cada disolución se tomo en cuenta la pureza del estándar.

Ejemplo, disolución de ácido fólico concentración 23.52 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de ácido fólico.

$$\left(\frac{0.0030\text{g estándar}}{50\text{mL}}\right)\left(\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}\right)\left(\frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}}\right)\left(\frac{2\text{mL}}{5\text{mL}}\right)\left(\frac{98\%}{100\%}\right)=23.52\ \mu\text{g} / \text{mL}$$

Ejemplo para calcular la concentración en porcentaje, considerando que el 100 % corresponde a 29.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

$$\left(\frac{23.52\ \mu\text{g} / \text{mL}}{29.40\mu\text{g} / \text{mL}}\right)(100\%)=80\%$$

La figura No. 6 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO LINEALIDAD DEL MÉTODO

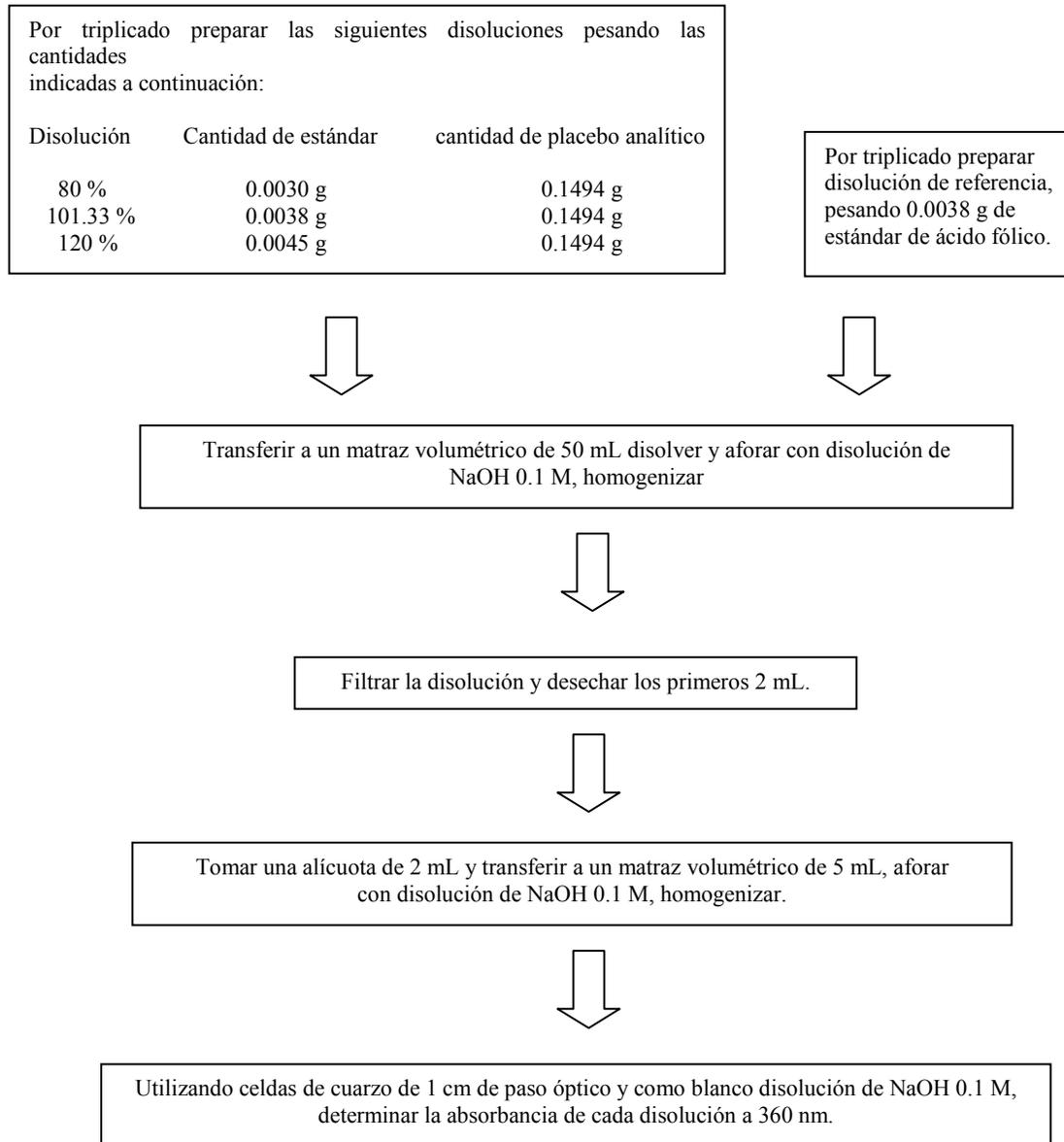


Figura No. 6 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Linealidad del método.

Exactitud y Repetibilidad del Método.

Por sextuplicado se preparó una disolución de concentración 29.79 µg / mL que corresponde al 101.33 % , estas disoluciones se prepararon adicionando a un matraz de 50 mL 0.1494 g de placebo analítico y 3.8 mg de ácido fólico SR disolver y aforar con disolución de hidróxido de sodio 0.1 M , homogenizar , filtrar la disolución desechando los primeros 2 mL, tomar una alícuota de 2 mL y transferirla a un matraz aforado de 5 mL aforar con disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, mezclar, esta disolución es equivalente a una muestra analítica, a la par se preparó una disolución a la misma concentración utilizando solo estándar de ácido fólico el cual se utilizo como referencia.

Se utilizo para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g d = 0.1 mg y una pipeta volumétrica de 2 mL para tomar las alícuotas.

Se obtuvieron las absorbencias a 360 nm utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y disolución de hidróxido de sodio 0.1 M como blanco de ajuste.

Ejemplo para calcular la concentración de la disolución de ácido fólico concentración 29.79 µg / mL de ácido fólico.

$$\left(\frac{0.0038\text{g estándar}}{50\text{mL}}\right)\left(\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}\right)\left(\frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}}\right)\left(\frac{2\text{mL}}{5\text{mL}}\right)\left(\frac{98\%}{100\%}\right)=29.79\mu\text{g/mL}$$

Ejemplo para calcular la concentración en porcentaje, considerando que el 100 % corresponde a 29.40 µg / mL.

$$\left(\frac{29.79\mu\text{g/mL}}{29.40\mu\text{g/mL}}\right)(100\%)=101.33\%$$

La figura No. 7 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

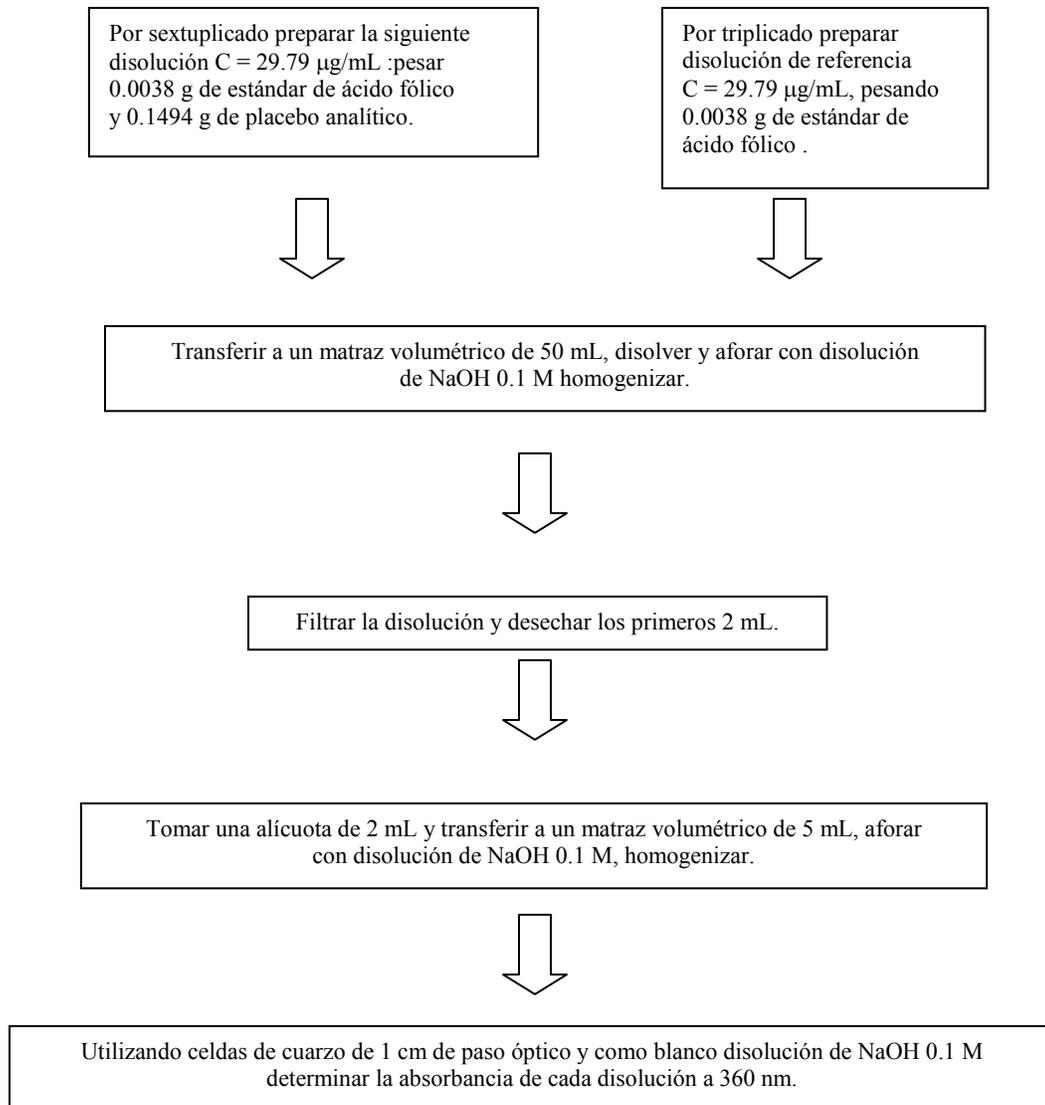


Figura No. 7 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Exactitud y repetibilidad del método.

Precisión del Método.

En dos días diferentes y por dos analistas se analizo por triplicado una muestra de placebo adicionado con ácido fólico el cual contiene un nivel del 100 %(este placebo adicionado contiene 0.1489 g de ácido fólico por cada 6 g de mezcla), la preparación de la disolución se realizo de la manera siguiente se adiciono 0.1511 g de placebo adicionado a un matraz de 50 mL disolver y aforar con disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, mezclar , filtrar desechando los primeros 2 mL , tomar una alícuota de 2 mL de la disolución filtrada y transferirlos a un matraz de 5 mL , aforar con la misma disolución de hidróxido de sodio 0.1M y mezclar, la concentración de la disolución es de 29.40 µg / mL.

Preparar de igual forma una disolución de concentración 29.79 µg / mL con estándar de ácido fólico , está ultima es la solución de referencia.

Se utilizo para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g d = 0.1 mg y una pipeta volumétrica de 2 mL para tomar las alícuotas.

Ejemplo de calculo para calcular la concentración de la disolución de ácido fólico.

$$\left(\frac{(151100 \mu\text{g de placebo adicionado}) \left(\frac{148900 \mu\text{g ac. folico}}{6000000 \mu\text{g de placebo adicionado}} \right)}{50 \text{mL}} \right) \left(\frac{2 \text{mL}}{5 \text{mL}} \right) \left(\frac{98\%}{100\%} \right) = 29.40 \mu\text{g} / \text{mL}$$

La figura No. 8 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO PRESICIÓN DEL MÉTODO

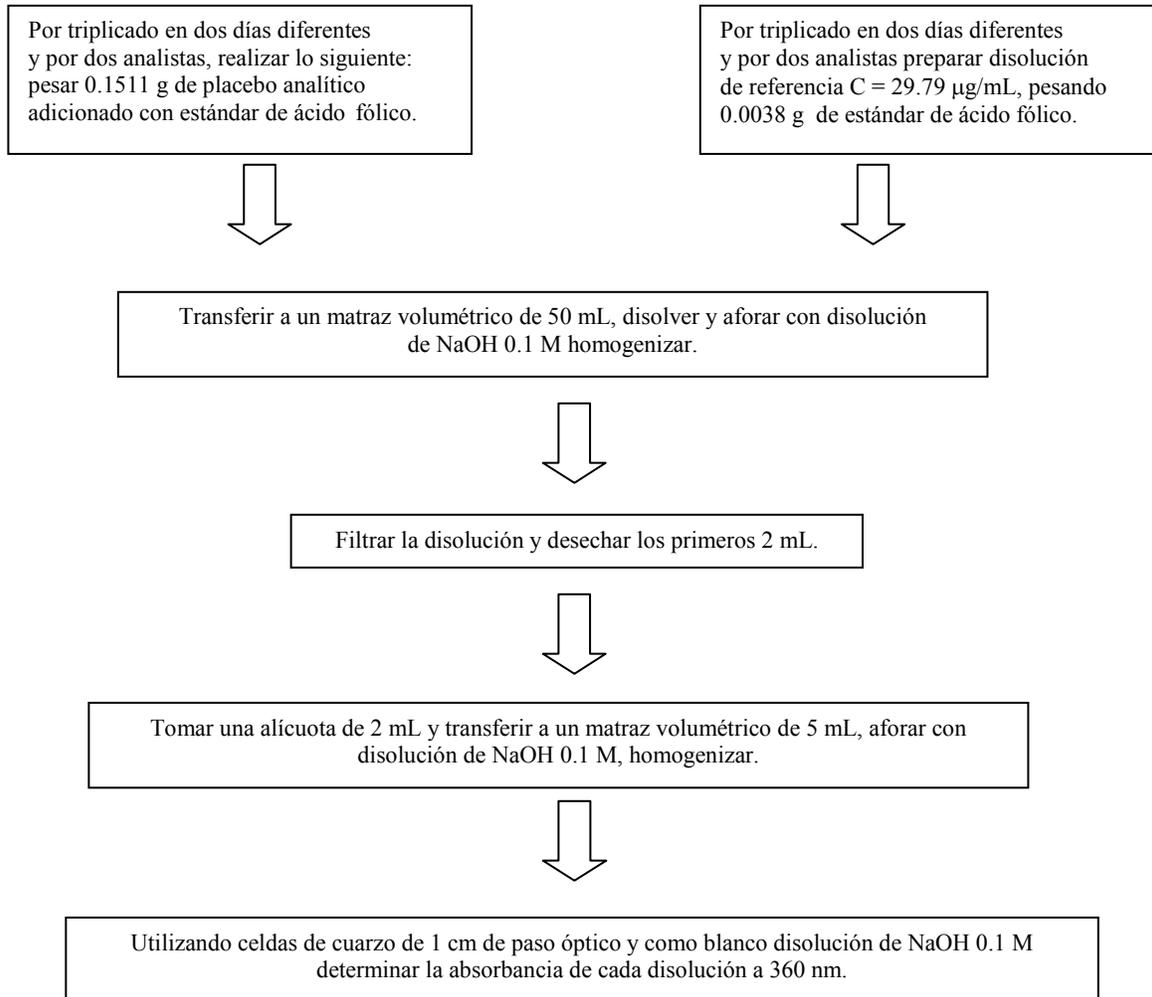


Figura No. 8 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Precisión del método.

Estabilidad Analítica de la Muestra.

Por triplicado y de una muestra homogénea se preparo una disolución de concentración $29.40 \mu\text{g} / \text{mL}$ de al siguiente manera pesar 0.0060 g de estándar de ácido fólico transferirlos a un matraz volumétrico de 10 mL disolver y aforar con disolución de hidróxido de sodio 0.1 M , tomar una alícuota de 5 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con disolución de hidróxido de sodio, esta ultima disolución es la que se somete a la prueba de estabilidad ,se fracciono en 9 frascos viales, tres de los frascos se almacenaron en refrigeración (4° C), otros tres almacenados a temperatura ambiente sin exponer a la luz (oscuridad) y los últimos tres a temperatura ambiente expuestos a la luz blanca. Como referencia se utilizo una disolución de ácido fólico recientemente preparada de concentración $29.79 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Se utilizo para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1 \text{ mg}$ y pipetas volumétricas de 5 mL y 2 mL para tomar las alícuotas.

El tiempo de almacenaje fueron 48 horas, midiendo la absorbancia a las 24 h y 48 h además de la inicial , usando como blanco disolución de hidróxido de sodio 0.1 M y como referencia disolución de ácido fólico recientemente preparada.

La figura No. 9 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EL PARÁMETRO ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

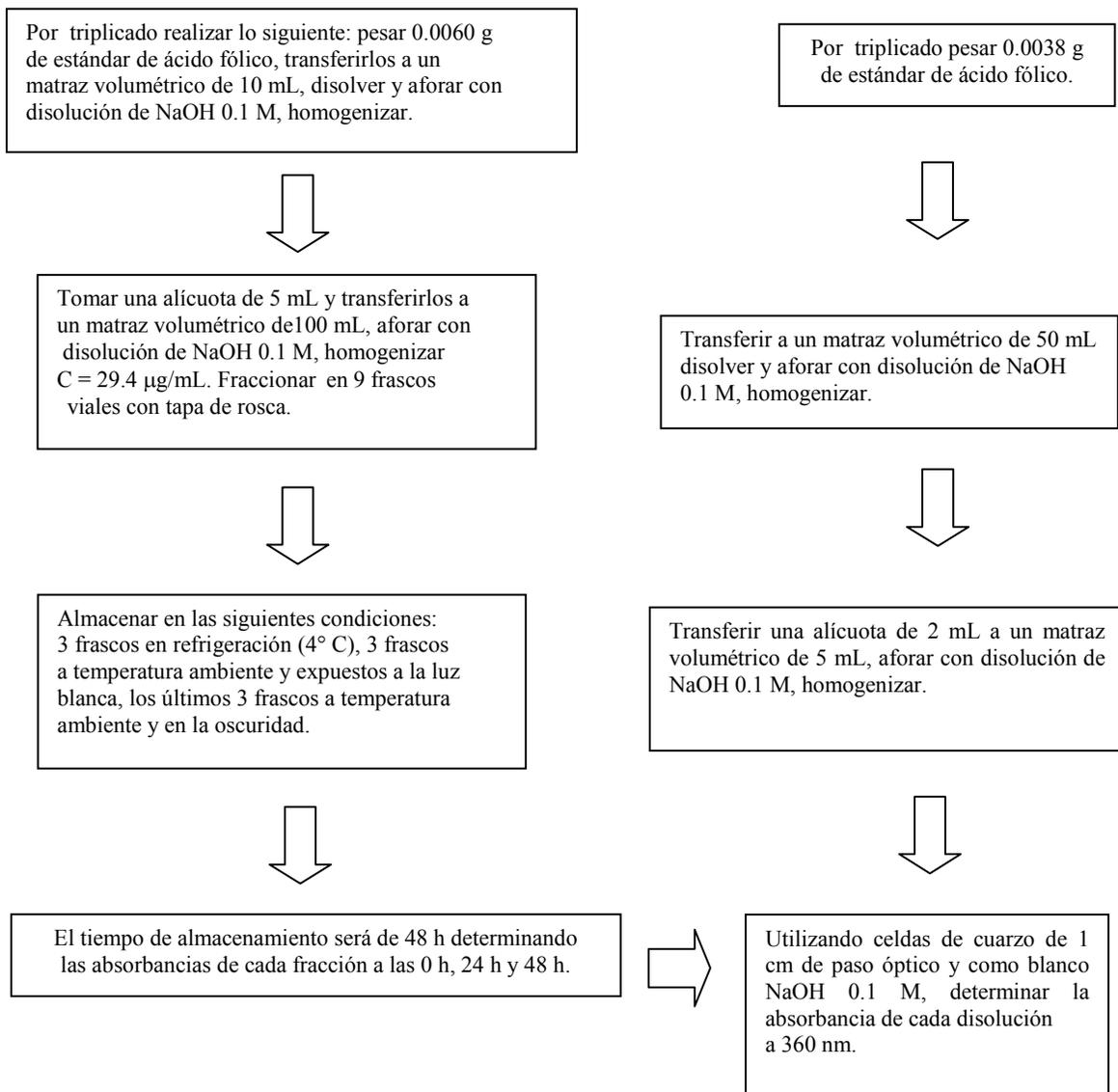


Figura No. 9 Diagrama de metodología para evaluar el parámetro Estabilidad analítica de la muestra.

METODOLOGÍA PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN TABLETAS.

Preparación de la disolución de referencia.

Pesar con exactitud, aproximadamente 3.8 mg de ácido fólico SR, pasar a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar al aforo con la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, homogenizar. Pasar una alícuota de 2 mL de esta disolución a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar al aforo con la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, mezclar. La concentración de esta disolución es de 29.79 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Preparación de la disolución de la muestra.

Se pesan no menos de 20 tabletas, calcular el peso promedio por tableta, se colocan en un mortero de porcelana y trituran hasta polvo fino, del polvo obtenido pesar una cantidad aproximada a 3.75 mg de ácido fólico, pasar a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar al aforo con la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, homogenizar.

Esta disolución se filtra a través de papel Whatman No.40 desechando los primeros 2 mL del filtrado. Pasar una alícuota de 2 mL de esta disolución a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar al aforo con la disolución de hidróxido de sodio 0.1 M, homogenizar. La concentración de esta disolución es de aproximadamente 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Se utilizo para pesar una balanza analítica marca Sartorius máxima. 210 g $d = 0.1$ mg y pipeta volumétrica de 2 mL para tomar las alícuotas.

Determinación de las absorbencias.

Se obtiene la absorbencia de la disolución de referencia y disolución de la muestra a 360 nm utilizando un espectrofotómetro Coleman 139 y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, disolución de hidróxido de sodio 0.1 M como blanco.

La figura No. 10 muestra el diagrama de la metodología.

METODOLOGÍA PARA DETERMINAR ÁCIDO FÓLICO EN TABLETAS.

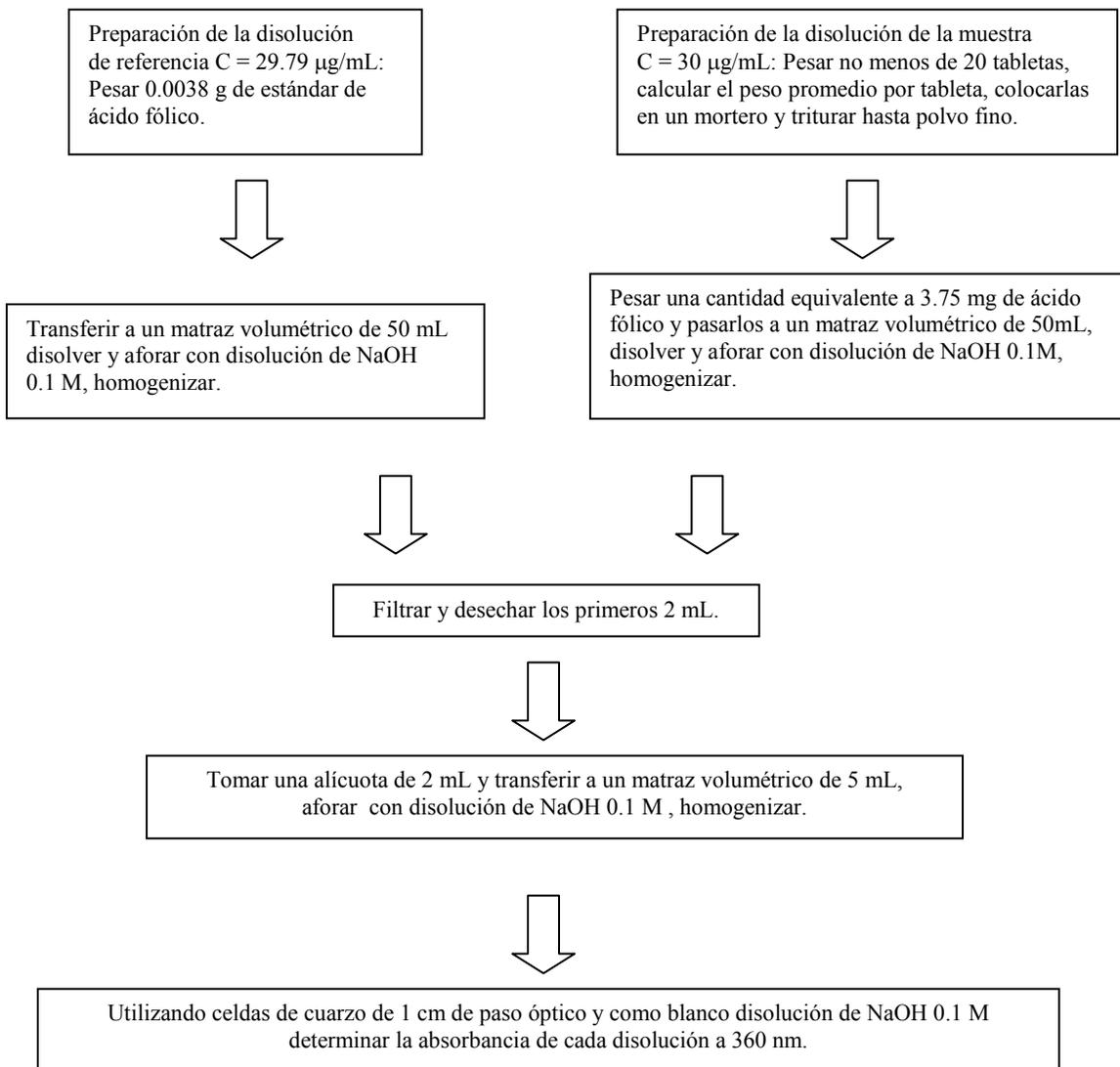


Figura No. 10 Diagrama de metodología para determinar ácido fólico en tabletas.

Cálculos.

El contenido de ácido fólico por tableta se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{Am}{Ar} * \frac{Pr}{50mL} * \frac{Pureza}{100\%} * \frac{2mL}{5mL} * \frac{5mL}{2mL} * \frac{50mL}{Pm} * Pp = \frac{mg}{Tableta}$$

Ejemplo de calculo para el producto No.1:

$$\frac{0.699}{0.657} * \frac{3.8 \text{ mg de std}}{50mL} * \frac{98\%}{100\%} * \frac{2mL}{5mL} * \frac{5mL}{2mL} * \frac{50mL}{76.3 \text{ mg}} * 101.7 \text{ mg/tab} = 5.28 \text{ mg/tableta}$$

La fórmula para obtener el porcentaje de ácido fólico por tableta de acuerdo a lo especificado en el marbete es la siguiente:

$$\frac{\frac{Am}{Ar} * \frac{Pr}{50mL} * \frac{Pureza}{100\%} * \frac{2mL}{5mL} * \frac{5mL}{2mL} * \frac{50mL}{Pm} * Pp}{C} * 100\% = \% \text{Ác.Fólico}$$

Ejemplo de calculo para el producto No.1:

$$\frac{\frac{0.699}{0.657} * \frac{3.8 \text{ mg de std.}}{50mL} * \frac{98\%}{100\%} * \frac{2mL}{5mL} * \frac{5mL}{2mL} * \frac{50mL}{76.3 \text{ mg}} * 101.7 \text{ mg/tab}}{5 \text{ mg}} * 100\% = 105.62 \%$$

Donde:

Am = Absorbencia de la disolución de la muestra.

Ar = absorbencia de la disolución de referencia.

Pureza = pureza del estándar

Pr = Peso en miligramos de estándar de ácido fólico .

Pm = Peso de la muestra en miligramos.

Pp = Peso promedio de la muestra en miligramos por tableta.

C = Cantidad de ácido fólico por tableta reportado en el marbete en miligramos.

Es importante mencionar que se realizó en base húmeda por no contar con el equipo y reactivos. Al estándar de ácido fólico se debe determinar su contenido de agua y hacer la corrección necesaria para poder reportar contenido de ácido fólico por tableta en base seca y comparar el resultado con la especificación dada en farmacopea.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

ESPECIFICIDAD.

En la Tabla No.2, se muestran las absorbencias obtenidas de la sustancia de referencia, del placebo cargado con ácido fólico y del placebo solo. A las longitudes de onda de 260, 280 y 360 nm, utilizando celdas de cuarzo de un cm de paso óptico y mediante las cuales se detecto la especificidad del sistema.

Muestra	Absorbencia a $\lambda=260$ nm	Absorbencia a $\lambda=280$ nm	Absorbencia a $\lambda=360$ nm
Referencia	1.700	1.700	0.602
Placebo cargado con ácido fólico	1.523	1.523	0.509
Placebo	0.086	0.070	0.009

Tabla No. 2 Resultados de la especificidad del sistema, se muestran en función de las absorbencias obtenidas a las longitudes de onda para cada máximo de absorción.

Y en la figura No.11 se presentan los espectros de absorción para las disoluciones de referencia, del placebo cargado con ácido fólico y del placebo solo a las longitudes de onda de 260, 280 y 360 nm, utilizando celdas de cuarzo de un cm de paso óptico.

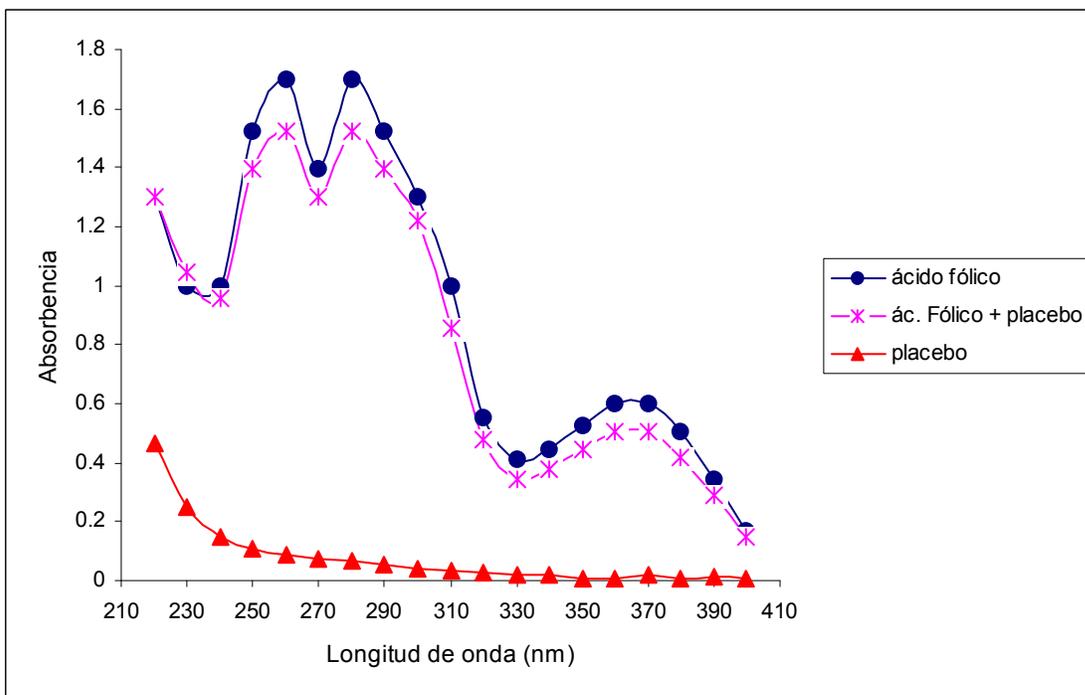


Figura No.11 Especificidad del Sistema (Absorbencia vs Longitud de onda).

Analizando los espectros de absorción se deduce que la respuesta del método únicamente es debida al analito o sea al ácido fólico, ya que para las disoluciones estándar y placebo cargado con ácido fólico se aprecia el mismo comportamiento siendo su espectro bastante parecido, presentando a las mismas longitudes de onda los máximos de absorbencia registrados a 260 , 280 y 360 nm y la longitud de onda a la que se llevó a cabo todo el trabajo fue de 360 nm puesto que a esa longitud de onda el máximo que se presenta necesita de una mayor concentración en la disolución que el resto de los picos disminuyendo así una fuente de error al pesar la cantidad de muestra, en cuanto a los valores de absorbencia, para la disolución de placebo cargado se ve que es menor en comparación al valor de la disolución de referencia atribuyendo esto a la forma en que se preparo el placebo cargado con ácido fólico y no se puede asegurar que dicha preparación contenga exactamente la cantidad de principio activo y bien mezclado, pero tomando en cuenta la determinación de porcentaje de recobro en otros parámetros como linealidad del método y debido a que la absorción que presentan los componentes del placebo es mínima, especialmente a 360 nm donde absorbe el 1.4 % (tomando en cuenta como 100% el valor de 0.602) se deduce que, ninguno de los excipientes presentes en la muestra interfieren en la respuesta de las disoluciones que contienen ácido fólico y que la respuesta del método es debida únicamente al principio activo, ácido fólico.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la Tabla No.3, se muestran las absorbencia obtenidas a la longitud de onda de 360 nm, para cada una de las siete diferentes concentraciones que van del 40 al 160 %.

Disolución	X (Concentración (%))	Y (Absorbencia)
1	40	0.187
2	40	0.187
3	40	0.187
4	60	0.292
5	60	0.292
6	60	0.301
7	80	0.432
8	80	0.420
9	80	0.420
10	100	0.523
11	100	0.523
12	100	0.523
13	120	0.638
14	120	0.638
15	120	0.638
16	140	0.770
17	140	0.745
18	140	0.745
19	160	0.886
20	160	0.886
21	160	0.886

Tabla No. 3, Resultados de linealidad del sistema, las Absorbencia fueron medidas a una longitud de onda de 360 nm utilizando celdas de cuarzo de un cm de paso óptico.

En la Tabla No.4, se muestran los resultados calculados para cada parámetro (ejemplo de calculo en el Anexo No.1) y en su caso el criterio de aceptación y en la figura No.12, se muestra la gráfica de la concentración (x) vs la respuesta analítica (y).

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
Pendiente (b_1)		0.0058
Ordenada al origen (b_0)		-0.0468
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9982
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)	$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	0.0056,0.0059

Tabla No. 4 Resultados de Linealidad del Sistema (parámetros calculados)

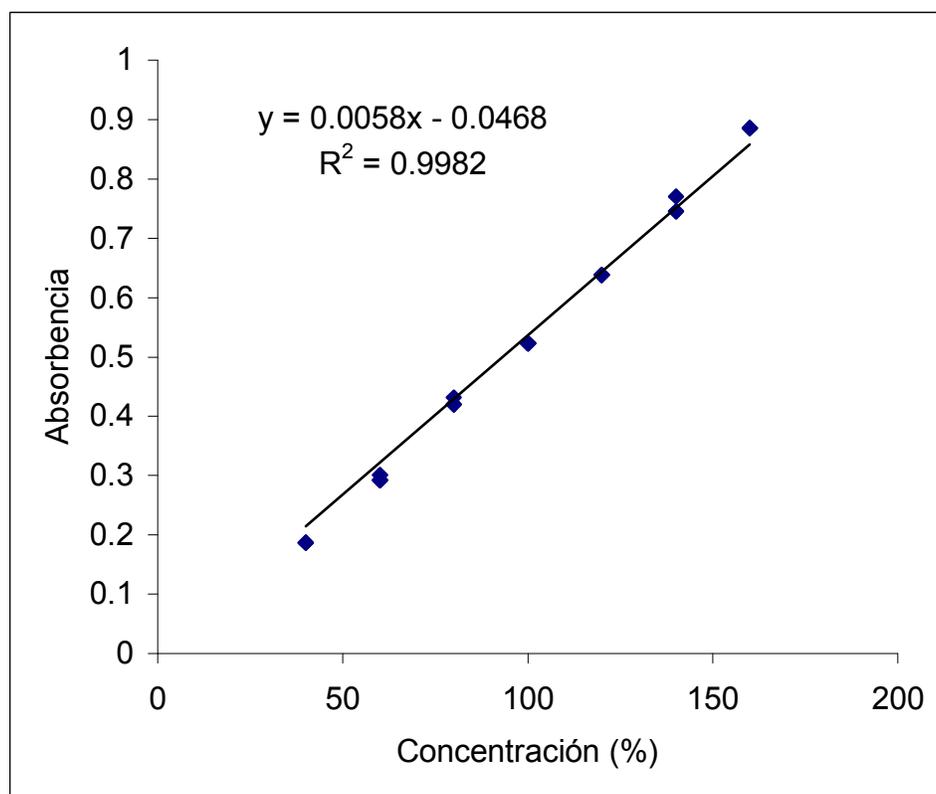


Figura No. 12 Linealidad del Sistema. Gráfica de Absorbancia vs Concentración.

Los resultados mas importantes en linealidad del sistema son el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente, así que analizándolos se deduce que el sistema si es lineal pues el valor de coeficiente de determinación es mayor a 0.98, dicho valor indica el porcentaje de la variación de la concentración que esta asociada con la variación de la absorbencia, o viceversa, es decir la intensidad de la asociación entre las dos variables. El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el cero.

PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No.5 y No.6 (ejemplo de calculo en el Anexo No.2)

Muestra	Absorbencia
1	0.553
2	0.569
3	0.569
4	0.569
5	0.569
6	0.569

Tabla No. 5 Resultados de precisión del sistema.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
N = 6		
\bar{y}		0.5663
S		0.0065
CV.	CV. \leq 1.5 %	1.15 %

Tabla No. 6 Resultados de Precisión del Sistema

Del resultado obtenido de coeficiente de variación se deduce que el sistema es preciso ya que cumple con el criterio de aceptación 1.15 % es menor a 1.5 % este valor representa a la desviación estándar expresada como un porcentaje de la media, siendo así el valor de 0.0065 la medida de que tan dispersos están los valores que componen la población.

De los parámetros: especificidad, linealidad del sistema y precisión del sistema se deduce que el sistema cumple con los criterios de aceptación que se establecen y se procede a valorar los parámetros del método.

PARÁMETROS DEL MÉTODO.

LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Iniciamos con el parámetro de linealidad del método, el cual lo conforman dos partes, una es el análisis de la proporción entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada, y la segunda parte es el porcentaje de recobro.

Se muestran en la Tabla No.7. Los resultados experimentales con los que se obtuvieron los resultados en la tabla No.8 referentes a los valores calculados de los parámetros involucrados a cantidad adicionada (X) vs cantidad recuperada (Y), y en la figura No. 13 se muestra la gráfica de esta relación, ejemplo de calculo en al Anexo No.3.

Placebo analítico adicionado	Absorbencia	Concentración (%)	X (µg / mL)	Y (µg / mL)	% De recobro (y)
1	0.444	80	23.520	23.045	97.98
2	0.444	80	23.520	23.045	97.98
3	0.456	80	23.520	23.668	100.63
4	0.569	101.33	29.792	29.532	99.13
5	0.569	101.33	29.792	29.532	99.13
6	0.569	101.33	29.792	29.532	99.13
7	0.678	120	35.280	35.190	99.74
8	0.699	120	35.280	36.280	102.83
9	0.678	120	35.280	35.190	99.74

Tabla No.7 Resultados de linealidad del método.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
Pendiente (b_1)		1.0449
Ordenada al origen (b_0)		-1.4109
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9947
Intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1))	Debe incluir la unidad	0.9767 , 1.1131
Intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC(β_0))	Debe incluir el cero	-3.4517 , 0.6300
Coefficiente de variación $CV_{y/x}$	No debe ser mayor de 3 %	1.41 %

Tabla No. 8 Resultados de linealidad del método cantidad adicionada -cantidad recuperada.

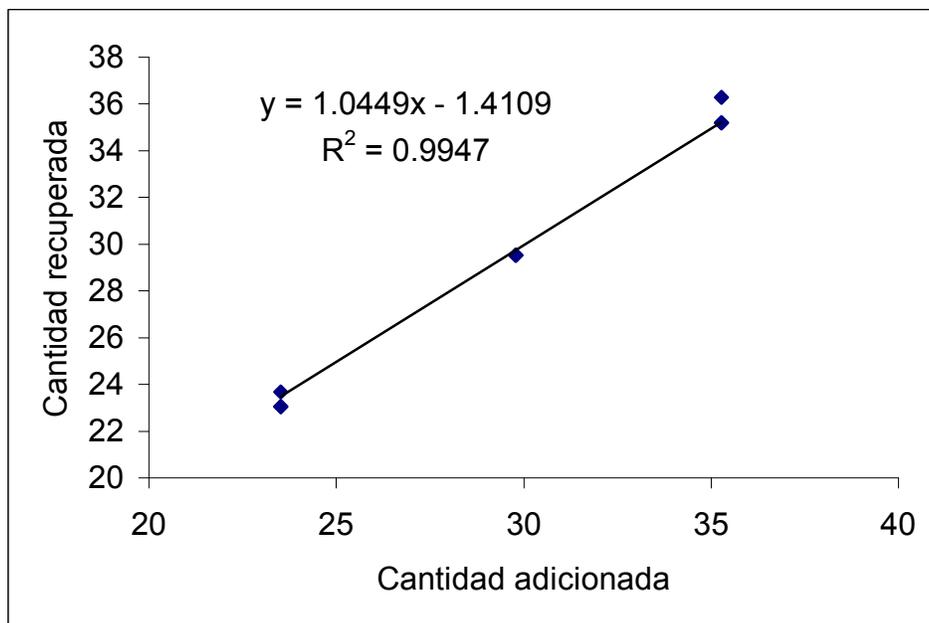


Figura No.13 Linealidad del método. Gráfica de cantidad adicionada ($\mu\text{g/mL}$) vs cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$).

Como vemos el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 lo que indica que la intensidad de la asociación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada es aceptable ya que podemos estar seguros que la variación de la cantidad adicionada, asociada con la cantidad recuperada en ese intervalo de concentraciones es aceptable. El intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad y el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye el cero además el coeficiente de variación no excede el 3 %, siendo sólo de 1.41 % que representa la medida de dispersión relativa.

Los resultados referentes al porcentaje de recobro se encuentran en la Tabla No.9.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
Media (\bar{y})		99.588
Desviación estándar (S)		1.477
Coefficiente de variación (CV)	No mayor de 3 %	1.483
Intervalo de confianza para media poblacional (IC(μ))	Debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103%	98.4528 , 100.7228

Tabla No. 9 Resultados de linealidad del método, porcentaje de recobro.

Del porcentaje de recobro se obtuvo un coeficiente de variación menor a 3 % y el intervalo de confianza incluye el 100 % además de que el promedio del porcentaje de recobro se incluye en el intervalo puesto que es 99.588 %.

Analizando los resultados se puede deducir que el método es lineal ya que cumple con los criterios de aceptación en lo referente a cantidad adicionada – cantidad recuperada y porcentaje de recobro.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

En la tabla No.10 se muestran los resultados experimentales involucrados con la exactitud del método.

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	% De recobro (y)
1	29.792	29.532	99.13
2	29.792	29.532	99.13
3	29.792	29.532	99.13
4	29.792	29.532	99.13
5	29.792	29.532	99.13
6	29.792	30.363	101.92

Tabla No. 10 Resultados de exactitud y repetibilidad del método.

En la tabla No.11 están los resultados calculados para cada parámetro y el criterio de aceptación. Las formulas y ejemplo de cálculo se encuentran en el Anexo 4.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
Media (\bar{y})		99.595
Desviación estándar (S)		1.139
Coeficiente de variación (CV)	No mayor de 3 %	1.144
Intervalo de confianza para media poblacional (IC(μ))	Debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103%	98.3995 , 100.7905

Tabla No. 11 Resultados de exactitud y repetibilidad del método.

Los resultados muestran que el método es exacto porque el coeficiente de variación es menor a 3 % y el intervalo de confianza para media poblacional incluye el 100 %. También el promedio del porcentaje de recobro se incluye en el intervalo especificado.

PRECISIÓN DEL MÉTODO.

En las tablas No.12 y No.13 se encuentran los resultados de concentración de las disoluciones de ácido fólico preparadas por dos analistas y en dos días diferentes, además del valor calculado para cada parámetro y su correspondiente criterio de aceptación. Formulas y ejemplo de calculo en el Anexo No.5.

DIA	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	
	Analista 1	Analista 2
1	28.18	28.98
	28.98	28.98
	28.18	28.98
2	28.69	28.43
	28.69	28.43
	28.69	28.43

Tabla No. 12 Resultados de precisión del método.

Parámetros	Criterio de aceptación	Valor calculado
\bar{y}		28.64
S		0.3053
CV	$CV \leq 3 \%$	1.066%

Tabla No. 13 Resultados de precisión del método.

Por los resultados obtenidos se deduce que el parámetro a validar cuenta con precisión debido a que el valor de coeficiente de variación es menor a 3 %.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

En las tablas No.14 , No.15 y No.16 se muestran los resultados del porcentaje de recobro de cada muestra determinando la concentración inicial, al termino de 24 h y a las 48 h de cada condición de almacenaje usando como referencia una disolución de ácido fólico recientemente preparada.

Condición de almacenamiento Oscuridad.

Muestra	Inicial (y_0)	Tiempo de almacenamiento	
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)
1	98.57	98.57	95.78
2	98.57	98.57	95.78
3	98.57	98.57	95.78
4	98.47	98.47	95.82
5	98.47	98.47	95.82
6	98.47	98.47	95.82
7	98.47	98.47	95.82
8	98.47	98.47	95.82
9	98.47	98.47	95.82

Tabla No.14 Resultados de la prueba de estabilidad (condición de almacenamiento oscuridad).

Condición de almacenamiento refrigeración.

Muestra	Inicial (y_0)	Tiempo de almacenamiento	
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)
1	98.57	98.57	98.47
2	98.57	98.57	98.47
3	98.57	98.57	98.47
4	98.47	98.47	98.47
5	98.47	98.47	98.47
6	98.47	98.47	98.47
7	98.47	98.47	98.47
8	98.47	98.47	98.47
9	98.47	98.47	98.47

Tabla No. 15 Resultados de la prueba de estabilidad (condición de almacenamiento refrigeración a 4° C).

Condición de almacenamiento expuesto a la luz.

Muestra	Inicial (y_0)	Tiempo de almacenamiento	
		24 horas (y_1)	48 horas (y_2)
1	98.57	107.21	110.75
2	98.57	107.21	110.75
3	98.57	110.31	110.75
4	98.47	104.18	110.41
5	98.47	104.18	110.41
6	98.47	104.18	110.41
7	98.47	107.21	110.41
8	98.47	107.21	110.41
9	98.47	107.21	110.41

Tabla No. 16 Resultados de la prueba de estabilidad (condición de almacenamiento exposición a la luz blanca).

En la Tabla No.17 se muestran los resultados del parámetro calculado y su criterio de aceptación para cada condición de almacenaje. Formulas y ejemplo de calculo en el Anexo No.6.

Condición de almacenamiento	Criterio de aceptación $ d_i $	Valor calculado de $ d_1 $	Valor calculado de $ d_2 $
Oscuridad	$ d_i \leq 3\%$	0 %	2.69 %
Refrigeración (4° C)	$ d_i \leq 3\%$	0 %	0.03 %
Exposición a la luz blanca	$ d_i \leq 3\%$	8.04 %	12.02 %

Tabla No.17 Resultados de Estabilidad del Método para las tres condiciones de almacenamiento.

Como se ve en la tabla de resultados, la disolución de ácido fólico se puede almacenar por 24 horas en condiciones de refrigeración a 4° C y también conservándola a temperatura ambiente sin exponer a la luz, pero no se puede almacenar expuesta a la luz blanca pues el porcentaje de recobro aumenta considerablemente. Por 48 horas la única condición de almacenaje recomendable es en refrigeración a 4° C pues el porcentaje de cambio de concentración con respecto a la inicial es menor a 3 % lo cual no ocurre si se almacena en condiciones de oscuridad o expuesta a la luz blanca.

La condición de almacenaje óptima es en refrigeración a 4° C por 48 horas.

Tabla No.18 Resultados de la validación del método adecuado para determinar ácido fólico en , tabletas.

Parámetro	Criterio de aceptación	Valor calculado
Especificidad	Cumple	Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	0.9982
	IC(β_1) no debe incluir el cero	0.0056,0.0059
Precisión del sistema	CV. ≤ 1.5 %	1.15 %
Linealidad del método	Cantidad adicionada – cantidad recuperada	
	$r^2 \geq 0.98$	0.9947
	IC(β_1) Debe incluir la unidad	0.9767 , 1.1131
	IC(β_0) Debe incluir el cero	-3.4517 , 0.6300
	CV _{y/x} No debe ser mayor de 3 %	1.41 %
	Porcentaje de recobro	
	CV No mayor de 3 %	1.483
	IC(μ) Debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103%	98.4528 , 100.7228
Exactitud y repetibilidad del método	CV No mayor de 3 %	1.144
	IC(μ) Debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 97 – 103%	98.3995 , 100.7905
Precisión del método	CV ≤ 3 %	1.066%
Estabilidad	$ d_i \leq 3\%$	$ d_1 $ $ d_2 $
		0 % 2.69 %
		0 % 0.03 %
		8.04 % 12.02 %

Como vemos el método analítico que se adecuo cumple con los criterios de cada parámetro analítico así que se aplicó determinando ácido fólico en tabletas de diferentes dosis, los resultados se muestran a continuación. Recuerde que dicho análisis es en base húmeda si se quiere aplicar correctamente debe de determinarse el contenido de agua y hacer la corrección.

**RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN TABLETAS
(PRODUCTOS COMERCIALES).**

En la tabla No. 19 se encuentran los resultados de la determinación de ácido fólico usando el método propuesto en productos farmacéuticos presentación tabletas con diferentes dosis y marcas.

La absorbencia promedio del estándar a 360 nm es 0.657, peso de estándar 0.0038 g.

Numero del producto	Muestra	Peso de la muestra (mg)	Peso promedio (mg / tableta)	Absorbencia ($\lambda = 360 \text{ nm}$)	Contenido en mg / tableta	% de Recobro
Producto No.1 (tabletas de 5 mg)	1	76.3	101.7	0.699	5.28	105.6
	2	76.3	101.7	0.669	5.28	105.6
	3	76.3	101.7	0.699	5.28	105.6
Producto No.2 (tabletas de 5 mg)	1	77.1	102.7	0.699	5.28	105.6
	2	77.1	102.7	0.699	5.28	105.6
	3	77.1	102.7	0.721	5.44	108.8
Producto No.3 (tabletas de 4 mg)	1	89.1	95	0.745	4.50	112.50
	2	89.1	95	0.745	4.50	112.50
	3	89.1	95	0.745	4.50	112.50
Producto No.4 (tabletas de 0.4 mg)	1	805.3	85.9	0.769	0.46	115
	2	805.3	85.9	0.745	0.45	112.5
	3	805.3	85.9	0.745	0.45	112.5

Tabla No.19 Resultados de determinación de ácido fólico en preparaciones farmacéuticas, tabletas, utilizando el método validado.

Numero del producto	\bar{X} del % de recobro	Desviación estándar	% C.V
PRODUCTO No.1 (tabletas de 5 mg)	105.6	0	0
PRODUCTO No.2 (tabletas de 5 mg)	106.67	1.847	1.73
PRODUCTO No.3 (tabletas de 4 mg)	112.50	0	0
PRODUCTO No.4 (tabletas de 0.4 mg)	113.33	1.443	1.27

Tabla No.20 Resultados estadísticos de determinación de ácido fólico en preparaciones farmacéuticas, tabletas, utilizando el método validado.

Como se muestra en la tabla No.20 se puede ver que los resultados son confiables pues el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no excede el 3 % para ningún producto en su dosis correspondiente.

No se puede determinar si cada producto cumple con la especificación de farmacopea puesto que se necesita determinar el contenido de agua en el estándar y hacer la corrección para calcular el contenido de principio activo en base seca.

Por ejemplo si tomamos en cuenta la especificación publicada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos octava edición, donde cada tableta no debe contener menos del 90.0 por ciento y no más de 110.0 por ciento de la cantidad indicada en el marbete solo los productos numero 1 y 2 cumplen con tal especificación, esta especificación se encuentra también en la séptima edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, no se sabe en que año fueron analizadas estas presentaciones farmacéuticas, es importante tomarlo en cuenta porque en la quinta edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 23) la especificación cambia y dice que deberán contener no menos del 90.0 por ciento y no más del 115.0 por ciento de la cantidad indicada en el marbete, siendo así todos los productos cumplen.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

El método espectrofotométrico que se validó para determinar ácido fólico en la presentación farmacéutica tabletas cumple con las especificaciones, como se muestra en la tabla No. 18 para los siguientes parámetros de rendimiento analítico:

Cumple con Especificidad, porque al realizar el barrido de las tres disoluciones (estándar de ácido fólico, placebo cargado con estándar de ácido fólico y placebo) los picos que se obtienen solo son por causa del ácido fólico, la absorción del placebo 360 nm que es la longitud de onda que se utiliza para la determinación del principio activo es mínima, no hay interferencias por lo que es específico.

Cumple con linealidad del sistema, para r^2 se obtuvo 0.9982 que es mayor a 0.98 y no incluye el cero el IC (β_1) 0.0056, 0.0059.

Cumple con precisión del sistema el coeficiente de variación es de 1.15 % y es menor a 1.5 %.

Cumple con linealidad del método, en lo referente a Cantidad adicionada – cantidad recuperada r^2 es de 0.9947 mayor a 0.98, IC (β_1) debe incluir la unidad y el intervalo de 0.9767, 1.1131 incluye la unidad, IC (β_0) debe incluir el cero y el intervalo de -3.4517, 0.6300 lo incluye, el valor de $CV_{y/x}$ es 1.41 % no es mayor a 3 %. En cuanto a porcentaje de recobro, el CV de 1.483 no es mayor a 3 % y el IC (μ) de 98.4528, 100.7228 incluye el 100 %.

Cumple con exactitud y repetibilidad del método, CV de 1.144 5 no es mayor de 3 %, IC (μ) 98.3995, 100.7905 incluye el 100.

Cumple con precisión del método el CV de 1.066% es menor a 3 %.

La muestra es estable si se almacena a 4 ° C y no se expone a la luz blanca pero solo por 48 horas. Por lo tanto se aplicó para determinar ácido fólico en tabletas de diferentes dosis y marcas obteniendo resultados satisfactorios y se muestran en la tabla No. 20, el coeficiente de variación de la determinación de ácido fólico para cada producto y dosis no excede el 2 %, pero para decir si cumple con la especificación de cualquier farmacoepa se requiere determinar el contenido de agua y hacer la corrección necesaria.

La ventaja del método con respecto al equipo Espectrofotometro Hitachi Perkin – Elmer Coleman Modelo 139 es de fácil manejo a pesar de que es analógico, no se requiere aprender el uso de un programa de computo, las desventaja es que manualmente se debe ajustar usando un blanco, cada que se modifique la longitud de onda, lo que provoca que el tiempo de análisis aumente.

En cuanto al material utilizado, la ventaja es su fácil adquisición y uso. En el caso de la microbureta de 10 mL con graduación de 0.05 mL una desventaja es que si no se afora correctamente, los cambios de volumen para tomar las alícuotas son un factor importante en el cambio de concentración y es más fácil cometer errores.

En este método se usaron dos reactivos que son el hidróxido de sodio y estándar de ácido fólico, la ventaja es que el manejo de las disoluciones que se prepararon no son peligrosas por su baja concentración. Pero la desventaja, es que la disolución de ácido fólico se debe almacenar en condiciones específicas y no se puede asegurar su conservación por más de 48 horas en refrigeración a 4 ° C.

El tiempo empleado para determinar ácido fólico en tabletas es relativamente corto aproximadamente 30 minutos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Remington.; Farmacia, 19^a edición, tomo 1, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 1998, pp. 627 – 654.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993.- Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. SSA. México , D.F. Fecha de publicación: 8 de marzo de 1996.
3. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.; FEUM, quinta edición, tomo 2, Secretaria de Salud, México, 1988, 1230 – 1232.
4. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.; FEUM, séptima edición, tomo 2, Secretaria de Salud, México, 2000, 1334 – 1336.
5. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.; FEUM, octava edición, tomo 2, Secretaria de Salud, México, 2004, 1731 – 1732.
6. British Pharmacopoeia commission.; British pharmacopoeia, volumen II, London, 1999, pp. 922 – 923.
7. United States Pharmacopeia Convention, The united states USP 23 NF 18, 1994, pp. 691 – 692.
8. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998.- Buenas prácticas de fabricación para fármacos. SSA. México , D.F. Fecha de publicación: 15 de noviembre de 2000.
9. Departamento de Farmacia.; Aspectos Fundamentales de las Formas Farmacéuticas Sólidas, UNAM. Facultad de Química, México 2003, pp. 5 – 10.
10. Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.; Métodos analíticos guía de validación, Edición 2002, pp. 4 – 32 , 57 – 70.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993.- Estabilidad de medicamentos. SSA México, D.F. Fecha de publicación: 8 de marzo de 1996.
12. Brescia Frank, et al; Fundamentos de Química, tercera reimpresión, Cia. Editorial Continental, S.A. de C. V., México 1983, pp.555 – 562.
13. Fessenden Ralph J. y Jaon S. Fessenden.; Química Orgánica, segunda impresión, grupo editorial Iberoamericana., México, 1983, pp. 924 – 937.
14. Day R.A. Jr.; Química Analítica Cuantitativa, quinta edición, Prentice – may Hispanoamericana, S.A., México, 1989, pp. 459 – 487.

15. Skoog Douglas A.; Fundamentos de Química Analítica, Volumen 2, Editorial Reverté,S.A., Barcelona, 1979,pp. 737 – 777.
16. Hawley.; Diccionario de Química y Productos Químicos, nueva edición, ediciones Omega, S.A., Barcelona,1993,pp. 478.
17. Moffat A.C.; Clarkes Isolation and identification of drugs, second edition, the farmaceutical press, London, pp. 1986, 633.
18. The Merck Index.; An enciclopedia of chemical, drugs, and biologicals, twelfth edition, Merck research laboratories división of Merck & Co.,Inc., White house Station, NJ, 1996, pp. 715.
19. Chang Raymond.; Química, sexta edición, McGraw – Hill interamericana de México, S.A. de C. V., México, 1999, pp. 646 – 647.
20. McKenzie Shirlyn B.; Hematología Clínica, segunda reimpresión, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C. V., México, 1988, pp. 176 – 179.
21. Bennington James L.; Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 1991, pp.20 – 21.
22. Thomson PLM.; Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, edición 48, ediciones PLM, S.A. de C. V .,México, 2002, pp. 7, 972 – 973.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995,- Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. SSA. México , D.F. Fecha de publicación: 1 de marzo de 1996.
24. <http://www.botanical.online.com/medicinalesacidofolicopropiedades.htm>
25. http://www.bvs.sld.cu/rvistas/far/vol34_2_00/far02200.htm
26. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a020.htm>
27. Volker Buhler.; Generic drug formulations, 1st edition, fine Chemicals BASF, 1997, sección 2.9.
28. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Alva_B_N/Aspect_fund.htm

ANEXOS.⁽¹⁰⁾

ANEXO 1.

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

FÓRMULAS.

Pendiente

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

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

Ordenada al origen

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

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para la pendiente.

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

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

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

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Solución	X (Concentración (%))	Y (Absorbencia)	XY
1	40	0.187	7.48
2	40	0.187	7.48
3	40	0.187	7.48
4	60	0.292	17.52
5	60	0.292	17.52
6	60	0.301	18.06
7	80	0.432	34.56
8	80	0.420	33.60
9	80	0.420	33.60
10	100	0.523	52.30
11	100	0.523	52.30
12	100	0.523	52.30
13	120	0.638	76.56
14	120	0.638	76.56
15	120	0.638	76.53
16	140	0.770	107.80
17	140	0.745	104.30
18	140	0.745	104.30
19	160	0.886	141.76
20	160	0.886	141.76
21	160	0.886	141.76

Calcular Σx , Σy , Σx^2 , Σy^2 , Σxy , determinar n:

$$\Sigma x = 40 + \dots + 160 = 2100$$

$$\Sigma y = 0.187 + \dots + 0.886 = 11.119$$

$$\Sigma x^2 = 40^2 + \dots + 160^2 = 243600$$

$$\Sigma y^2 = 0.187^2 + \dots + 0.886^2 = 7.005117$$

$$\Sigma xy = 1305.53$$

$$n = 21$$

Calcular b_1 , b_0 y r^2 .

$$b_1 = \frac{(21 \cdot 1305.53) - (2100 \cdot 11.119)}{((21 \cdot 243600) - 2100^2)} = 0.005763$$

$$b_0 = \frac{11.119 - (0.005763 \cdot 2100)}{21} = -0.046824$$

$$r^2 = \frac{[(21*1305.53) - (2100*11.119)]^2}{(21*243600 - (2100)^2) * (21*7.005117 - (11.119)^2)} = 0.998192$$

Calcular $S_{y/x}$ y S_{b_1}

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{7.005117 - 0.005763*1305.53 - (-0.046824)*11.119}{21-2}} = 0.010218$$

$$S_{b_1} = 0.010218 \sqrt{\frac{1}{243600 - \frac{2100^2}{21}}} = 0.000056$$

Determinar en la tabla No.21 $t_{0.975, 21-2}$ y calcular IC (β_1)

$$t_{0.975, 21-2} = 2.093$$

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

$$IC(\beta_1) = 0.005763 \pm 2.093 * 0.000056 = 0.005646, 0.005880$$

ANEXO 2

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

FÓRMULAS

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de variación.

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

n = número de mediciones.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO.

Tabla de resultados donde se muestra las absorbencias de la solución de referencia.

Muestra	Absorbencia
1	0.553
2	0.569
3	0.569
4	0.569
5	0.569
6	0.569

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

$$\sum y = 0.553 + \dots + 0.569 = 3.398$$

$$\sum y^2 = 0.553^2 + \dots + 0.569^2 = 1.924614$$

$$n = 6$$

Calcular \bar{y} , S y CV.

$$\bar{y} = \frac{3.398}{6} = 0.5663$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 1.924614) - (3.398)^2}{6 * (6 - 1)}} = 0.006527$$

$$CV = \frac{0.006527}{0.566} * 100 = 1.1532\%$$

ANEXO 3

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

FÓRMULAS.

Pendiente

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

n = número de mediciones (cantidad adicionada – cantidad recuperada).

Ordenada al origen.

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

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para la pendiente.

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

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

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

$t_{0.975, n-2}$ Referirse la tabla No.21, para determinar el valor de la t de Student.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

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

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

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

Coefficiente de variación de regresión.

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

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

De la tabla de resultados No.7 Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$, determinar n:

$$\sum x = 23.520 + \dots + 35.280 = 265.776$$

$$\sum y = 23.045 + \dots + 35.190 = 265.014$$

$$\sum x^2 = 8056.29619$$

$$\sum y^2 = 8031.64595$$

$$\sum xy = 8043.12499$$

$$n = 9$$

Calcular b_1 , b_0 y r^2 .

$$b_1 = \frac{9*8043.1250 - 265.776*265.014}{9*8056.29619 - 265.776^2} = 1.04491$$

$$b_0 = \frac{265.014 - 1.04491*265.776}{9} = -1.41089$$

$$r^2 = \frac{(9*8043.1250 - 265.776*265.014)^2}{(9*8056.29619 - 265.776^2)*(9*8031.64595 - 265.014^2)} = 0.9947$$

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{8031.64595 - 1.04491 * 8043.1250 - (-1.41089) * 265.014}{9 - 2}} = 0.415728$$

$$S_{b1} = 0.415728 \sqrt{\frac{1}{8056.29619 - \frac{265.776^2}{9}}} = 0.028843$$

Determinar en la tabla No.21 $t_{0.975, n-2}$ y calcular IC (β_1)

$$t_{0.975, 9-2} = t_{0.975, 7} = 2.365$$

$$IC(\beta_1) = 1.04491 \pm 2.365 * 0.028843 \quad (2.365 * 0.028843) = 0.068214$$

$$IC(\beta_1) = 0.976696, 1.113124$$

Calcular \bar{x} y S_{b0}

$$\bar{x} = \frac{265.776}{9} = 29.53067$$

$$S_{b0} = 0.415728 \sqrt{\frac{1}{9} + \frac{29.53067^2}{8056.29619 - \frac{265.776^2}{9}}} = 0.862942$$

Calcular IC (β_0)

$$IC(\beta_0) = -1.41089 \pm 2.365 * 0.862942$$

$$IC(\beta_0) = -3.451748, 0.629968$$

Calcular el CV $V_{y/x}$

$$\bar{y} = \frac{265.014}{9} = 29.446$$

$$CV_{y/x} = \frac{0.415728}{29.446} * 100 = 1.412 \%$$

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PORCENTAJE DE RECOBRO.

FÓRMULAS.

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de variación.

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

Intervalo de confianza para la media poblacional.

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

$t_{0.975, n-1}$ Referirse en la tabla No.21, para determinar el valor de la t de Student

n = número de recobros.

De los datos que se muestran en la tabla de resultados No. 7

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

$$\Sigma y = 896.29$$

$$\Sigma y^2 = 89276.9725$$

$$n = 9$$

Calcular \bar{y} , S y C V.

$$\bar{y} = \frac{896.29}{9} = 99.58778$$

$$S = \sqrt{\frac{9 * 89276.9725 - 896.29^2}{9 * (9 - 1)}} = 1.4766$$

$$C V = \frac{1.4766}{99.58778} * 100 = 1.4827 \%$$

Determinar en la tabla No.21 $t_{0.975, n-1}$ y calcular I C (μ)

$$t_{0.975, 9-1} = t_{0.975, 8} = 2.306$$

$$I C (\mu) = 99.58778 \pm 2.306 * \left(\frac{1.4766}{\sqrt{9}} \right)$$

$$I C (\mu) = 98.4528, 100.7228$$

ANEXO 4

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

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de variación.

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

Intervalo de confianza para la media poblacional.

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

$t_{0.975, n-1}$ Referirse a la tabla No.21, para determinar el valor de la t de Student

n = número de recobros.

De los datos que se muestran en la tabla de resultados No. 10 Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.

$$\sum y = 99.13 + \dots + 101.92 = 597.57$$

$$\sum y^2 = 99.13^2 + \dots + 101.92^2 = 59521.4709$$

$$n = 6$$

Calcular \bar{y} , S y CV.

$$S = \sqrt{\frac{6*59521.4709 - 597.57^2}{6*(6-1)}} = 1.1390$$

$$\bar{y} = \frac{597.57}{6} = 99.595$$

$$CV = \frac{1.1390}{99.595} * 100 = 1.1436 \%$$

Determinar en la tabla No.21 $t_{0.975, n-1}$ y calcular $IC(\mu)$

$$t_{0.975, 6-1} = t_{0.975, 5} = 2.571$$

$$IC(\mu) = 99.595 \pm 2.571 * \left(\frac{1.1390}{\sqrt{6}} \right)$$

$$IC(\mu) = 98.3995, 100.7905$$

ANEXO 5

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

FÓRMULAS.

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de variación.

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

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

De los datos que se muestran en la tabla de resultados No.12 Calcular $\sum y$, $\sum y^2$, determinar n.

$$\sum y = 28.18 + \dots + 28.43 = 343.64$$

$$\sum y^2 = 28.18^2 + \dots + 28.43^2 = 9841.7294$$

$$n = 12$$

Calcular \bar{y} , S y CV.

$$\bar{y} = \frac{343.64}{12} = 28.64$$

$$S = \sqrt{\frac{12 * 9841.7294 - 343.64^2}{12 * (12 - 1)}} = 0.3053$$

$$CV = \frac{0.3053}{28.64} * 100 = 1.066 \%$$

ANEXO 6

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

Media aritmética del análisis inicial.

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

n_0 = número de muestras del análisis inicial

Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje.

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

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

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

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

Ejemplo de calculo para la tabla No. 14 de resultados referente a la condición de almacenaje oscuridad.

Calcular $\sum y_0$, $\sum y_1$, $\sum y_2$ y determinar n_0 , n_1 , n_2 .

$$\sum y_0 = 98.57 + \dots + 98.47 = 886.53$$

$$\Sigma y_1 = 98.57 + \dots + 98.47 = 886.53$$

$$\Sigma y_2 = 95.78 + \dots + 95.82 = 862.26$$

$$n_0 = 9$$

$$n_1 = 9$$

$$n_2 = 9$$

Calcular $\bar{y}_0, \bar{y}_1, \bar{y}_2$

$$\bar{y}_0 = \frac{886.53}{9} = 98.50$$

$$\bar{y}_1 = \frac{886.53}{9} = 98.50$$

$$\bar{y}_2 = \frac{862.26}{9} = 95.8066 \approx 95.81$$

Calcular $|d_i|$:

$$|d_1| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0| = |98.50 - 98.50| = 0$$

$$|d_2| = |\bar{y}_2 - \bar{y}_0| = |95.81 - 98.50| = 2.69 \%$$

Tabla No.21. 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