



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ÁCIDO
ASCÓRBICO EN TABLETAS ORALES POR
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA

P R E S E N T A:
ALMA DELIA RAMÍREZ RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Vocal: Maria del Socorro Alpizar Ramos

Secretario: Adolfo García Osuna.

1er. Suplente: Georgina Artemisa Duarte Lisci

2do. Suplente: Honoria Fuentes Sixtos

Lugar donde se realizó la investigación:

**Departamento de Química Analítica, Laboratorios anexos 3A y 3B,
Edificio A, Facultad de Química, UNAM.**

Asesora: Silvia de J Mendoza Arellano. _____

Supervisora Técnica: Ernestina Cervera Flores _____

Sustentante: Alma Delia Ramírez Ramírez. _____

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre Delia Ramírez Bautizta, por su incansable lucha en la vida, por su ejemplo de fortaleza, por su amor y apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mi abuela, nuestro ángel familiar.

A la memoria de mi padre y por enseñarme que la superación es la única llave.

A mis hermanos, el mejor ejemplo a seguir. Al Lic. Victor porque tu responsabilidad y afecto siempre me ayudo a seguir. Al M.M.C. Miguel si tu no hubieras estado a mi lado estoy segura mi vida no sería igual.

A la familia Aragón por su cariño y apoyo incondicional .

A la maestra Silvia Mendoza, el profesor Adolfo y la maestra Ernestina Cervera. Gracias por todo su apoyo, afecto, asesoría, consejos y la amistad recibida.

Gracias a las maestras Carmen Sansón, Socorro, Erika, Ale, Susy, Mine y Lilia del Carmen por su apoyo en este trabajo, asesoría y amistad .

A todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida. No saben lo importantes son para mi.

A la familia Ramírez y a la bella airosa por brindarme un segundo hogar.

A mi ángel por darle luz a mi vida.

A la UNAM, por permitirme ser orgullosamente parte de ella. POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU.

“No nos limitemos a andar por caminos ya trazados; abramos nuevas brechas porque serán las amplias avenidas del mañana”

Dr. José Dávalos

“Die fraude am denken” “El goze de pensar”

Albert Einstein

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
I. ANTECEDENTES	5
1.Ácido ascórbico.....	6
1.1Propiedades físicas y químicas.....	6
1.2 Estabilidad.....	7
1.3 Funciones fisiológicas de la vitamina C.....	8
1.4 Historia.....	9
1.5 Determinación de ácido ascórbico.....	10
2.Espectroscopia ultravioleta.....	11
2.1 Generalidades.....	11
2.2 Análisis cuantitativo.....	14
2.3 Características y aplicaciones de la espectroscopia ultravioleta.....	16
2.4 Variables que influyen en la absorbancia.....	16
2.5 Instrumentación.....	18
3. Validación de métodos analíticos.....	19
3.1 Linealidad del sistema.....	20
3.2 Precisión.....	23
3.2.1 Precisión del sistema.....	23
3.2.2 Precisión de método.....	24

3.2.2.1 Repetibilidad.....	25
3.2.2.2 Reproducibilidad.....	26
3.3 Recobro o recuperación.....	28
II DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
1. Reactivos y muestras.....	30
2. Equipo y material.....	30
3. Determinación cuantitativa del ácido ascórbico	31
3.1 Condiciones de trabajo / Estabilidad.....	31
3.2 Curvas Patrón.....	32
3.3 Extracción de ácido ascórbico: Agitación y Sonicación.....	36
4. Metodología propuesta para la determinación de ácido ascórbico por espectrofotometría UV en tabletas orales	39
III RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
1. Pruebas de validación.....	42
1.1 Linealidad del sistema.....	42
1.2 Precisión del sistema.....	47
1.3 Precisión del método.....	49
1.3.1 Repetibilidad.....	50
1.3.1 Reproducibilidad.....	52
1.4 Recobro o recuperación.....	55
IV APLICACIÓN DEL MÉTODO	58
1. Comparación de los resultados entre el método propuesto y el	

respectivo método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.....	59
---	----

CONCLUSIONES	65
---------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	68
---------------------	----

ANEXOS	72
Anexo I . Curvas patrón I, II, III.....	73
Anexo II Linealidad del sistema.....	77
Anexo III Precisión de Sistema.....	80
Anexo IV Precisión de Método. Repetibilidad.....	82
Anexo V Precisión de Método. Reproducibilidad.....	84
Anexo V Recobro.....	86
Anexo VII Comparación de Métodos.....	87

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN^{1, 2, 6, 7, 9, 10}

El ácido ascórbico o vitamina C tiene propiedades ácidas y fuertemente reductoras; posee actividad nutricional y participa en muchas de las reacciones biológicas del cuerpo.

La vitamina C corresponde al grupo de vitaminas hidrosolubles. Todos los animales necesitan vitamina C pero algunos mamíferos (incluyendo el hombre) no pueden sintetizarla. Se almacena en el cuerpo por cortos periodos de tiempo y se elimina a través de la orina, por este motivo, es importante su administración diaria. Esta vitamina es de gran interés en la industria farmacéutica y alimentaria; y su determinación analítica es de gran importancia.

Existen múltiples métodos para identificación y cuantificación de ácido ascórbico en diferentes tipos de muestras, la mayoría de los cuales se basan en las propiedades de oxidorreducción que posee la molécula. En general, estos métodos se dividen en:

- Métodos cromatográficos – con detector ultravioleta o con detección electroquímica utilizada para el análisis en fluidos biológicos.
- Métodos espectroscópicos – como espectrofotometría infrarroja, espectrofotometría ultravioleta para identificación (243nm); y espectrofotometría visible mediante formación complejos.^{3, 4, 8}
- Métodos electroquímicos – donde se pueden hacer las determinaciones por potenciometría, polarografía y coulombimetría. Miden la oxidación del ácido ascórbico.
- Métodos por titulación – métodos estándar en farmacopeas como lo es la titulación con 2,6 –diclorofenolindofenol y yodo. Con cloramina –T ,donde se utiliza KI y almidón.^{5, 11}
- Método enzimático – usando ácido ascórbico oxidasa, se utiliza en análisis clínicos y en alimentos obteniendo alta especificidad.

En las diferentes presentaciones farmacéuticas que contienen ácido ascórbico pueden estar presentes otras sustancias con propiedades redox, que interfieren en su cuantificación por la mayoría de los métodos anteriormente mencionados. En

esta tesis se propone una metodología que se podría utilizar en muestras más complejas que presenten compuestos con estas propiedades.

Actualmente en la FEUM se utiliza la espectrofotometría UV únicamente para identificación de ácido ascórbico. Sin embargo los métodos espectrofotométricos por ultravioleta son una buena alternativa para cuantificación de ácido ascórbico en medicamentos, teniendo en consideración que este método no se encuentra basado en las propiedades oxido reductoras de dicha vitamina.

El método propuesto para cuantificación de ácido ascórbico por espectrofotometría ultravioleta utiliza menores cantidades de reactivo, por lo que resulta ser de costo mas bajo, además que se realiza en un menor tiempo a comparación del método oficialmente propuesto por la secretaria de salud.

La valoración de la vitamina C en tabletas, según FEUM, se basa en una titulación directa con el indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol (DFI). El inconveniente que presenta esta técnica es la presencia de otras sustancias reductoras que podrían afectar la medición; además que esta prueba depende de la apreciación visual.

De acuerdo a la bibliografía⁷, el medio de disolución donde se conserva más estable el ácido ascórbico en condiciones ambientales es en ácido sulfúrico 0.1M burbujeado de 10 a 15 minutos en nitrógeno. Basándose en lo anterior, se establecen las mejores condiciones para la metodología que se propone en la cuantificación de vitamina C en tabletas orales.

OBJETIVO GENERAL

Obtener un método confiable, rápido, preciso, y de bajo costo para la cuantificación de ácido ascórbico en tabletas orales por espectrofotometría ultravioleta que facilite su análisis en la industria farmacéutica y establecer un protocolo para la futura determinación de ácido ascórbico en otras formas farmacéuticas conformadas por matrices más complejas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Optimizar el método de extracción del principio activo en el medicamento.
- b) Llevar a cabo la validación de la técnica y del método desarrollado con los parámetros de linealidad, precisión y recobro.
- c) Finalmente comparar los resultados de contenido de ácido ascórbico en tabletas orales obtenidos por espectrofotometría UV y con los obtenidos siguiendo lo que establece la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), octava edición.

I. ANTECEDENTES

1. ACIDO ASCÓRBICO

1.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS^{12, 13}

El ácido ascórbico se presenta como cristales o polvo blanco. Al exponerse a la luz se oscurece gradualmente. En estado seco es bastante estable al contacto con el aire, pero en solución se oxida rápidamente. Es muy soluble en disolventes polares.

Estructura:

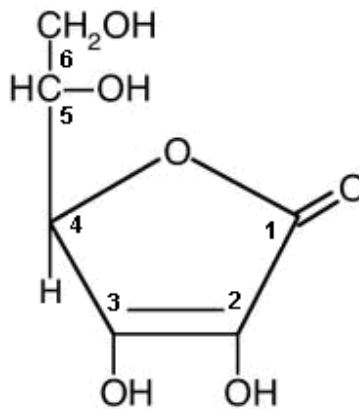


Figura 1. Ácido ascórbico

Nombre químico: ácido L-ascórbico, ácido L-*threo*-2,3,4,5,6-pentahidroxilhex-2-eno-4-lactona

Fórmula empírica: C₆H₈O₆

Peso Molecular : 176.13 g/mol

Temperatura de fusión: 190 -192°C

Densidad: 1.65 g/cm³

Potencial óxido reducción: E^o=+0.127V

pKa₁: 4.7 (C3-OH)

pKa₂: 11.57 (C2-OH)

Solubilidad (g/100cm³20°C): 33g en agua; 3g en etanol; 1g en glicerol; insoluble en cloroformo, éter o benceno.

Absorción en el UV (pH=2): 245nm

Absorción en el UV (pH=6-10): 265nm

Absorción en el UV (pH>10): 294nm

1.2 ESTABILIDAD^{12,14}

Debido a que se deriva de una hexosa, se puede considerar a la vitamina C como un hidrato de carbono (lactona). Se presenta en dos formas, ambas biológicamente activas: ácido ascórbico (forma reducida) y el ácido dehidroascórbico (forma oxidada) (figura 2). Estas sustancias se oxidan y reducen con facilidad en forma reversible, pero si el ácido dehidroascórbico se continua oxidando hasta ácido dicetogulónico, reacción que no es reversible, el compuesto pierde su actividad vitamínica.

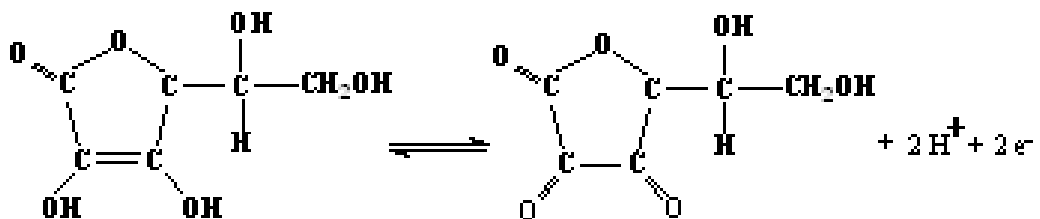


Figura 2. Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico

En la oxidación del ácido ascórbico influyen diferentes factores como: la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno, los metales de transición (sobre todo cobre y hierro), los azúcares reductores, algunas sales, los peróxidos, ciertas enzimas y la presencia de otras vitaminas.

El ácido ascórbico forma sales monobásicas con bases, las sales dibásicas son inestables. En el ascorbato de sodio (C₆H₇O₆Na) y ascorbato de calcio [(C₆H₇O₆)Ca.H₂O] el metal está asociado al átomo de O en la posición C3. Su

estabilidad se explica porque la carga negativa del monoanión está deslocalizada en un sistema p-enlace como se puede observar en la figura 3.

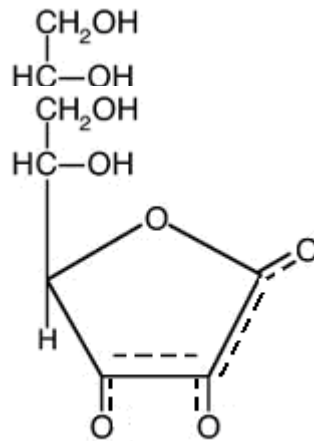


Figura 3. Ion ascorbato

1.3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA VITAMINA C ^{3, 4, 8, 10, 12, 14, 15}

La vitamina C tiene propiedades ácidas y fuertemente reductoras; posee actividad nutricional y participa en muchas de las reacciones biológicas del cuerpo.

Algunas de sus funciones en el organismo son:

- ◆ Transportador de hidrógeno.
- ◆ Se considera como un importante antioxidante celular.
- ◆ Contribuye a la regeneración de colágeno.
- ◆ Es esencial para la cicatrización de fracturas óseas (reposición de hueso).
- ◆ Participa en el metabolismo de ácido fólico y de los aminoácidos aromáticos.
- ◆ Está implicada en los niveles de lípidos y colesterol en la sangre.
- ◆ Participa en la absorción y transporte de hierro desde la sangre a los tejidos.
- ◆ Está implicada en la síntesis de esteroides.
- ◆ Un incremento en su ingesta (2-3g al día), aumenta la actividad de los leucocitos y estimula la formación de anticuerpos.
- ◆ Interviene en la síntesis de noradrenalina.

- ♦ Es necesaria para la formación de capilares sanguíneos, cartílagos y dentina de los dientes.
- ♦ Es necesaria para la prevención y la curación de la enfermedad por deficiencia de esta vitamina, el escorbuto.
- ♦ Se ha propuesto que su consumo ayuda en la prevención de cánceres de esófago, estómago y el cuello uterino.

La ingesta diaria recomendada de la vitamina C es de 60mg para adultos sanos, sin embargo, la ingesta recomendada se refiere simplemente a la prevención de los síntomas carenciales clásicos, pero no se tomaron en cuenta el papel de esta vitamina en el organismo.

Como se mencionó anteriormente, todos los animales necesitan de vitamina C, pero los simios, cobayos, algunas especies de murciélagos y el hombre no pueden sintetizarla y por lo tanto deben de obtenerla de los alimentos. Las mejores fuente son las frutas en general, la verdura y las patatas. Los cítricos, que son considerados generalmente como la mejor fuente de esta vitamina, sólo contienen 50mg/100g de pulpa. Los pimientos y muchas frutas tropicales contienen de 2 a 5 veces más vitamina C que los cítricos.

1.4 HISTORIA^{1, 10, 12, 16}

El escorbuto, provocado por la deficiencia de la vitamina C, se conoce desde la Edad Media y fue una enfermedad común en Europa, especialmente durante invierno y en las tripulaciones de barcos. Durante el siglo XVIII se observó que cuando las embarcaciones llevaban fruta fresca durante la navegación se evitaba el escorbuto. En 1907, Holst y Frolich detectaron un síndrome de tipo escorbuto en cobayos que era similar al escorbuto humano y se curaba cuando se alimentaba a los animales con frutos cítricos. Esto brindó un medio experimental para su estudio. La vitamina C fue sintetizada por primera vez en 1933. En 1937 Albert Szent-Györgyi, científico húngaro, le fue otorgado el premio Nobel de Medicina como reconocimiento de sus descubrimientos concernientes a los procesos de oxidación biológica con especial referencia a la vitamina C.

1.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

La valoración de la vitamina C en tabletas, según FEUM octava edición¹⁷, se basa en una titulación directa con el indicador redox 2,6- diclorofenol indofenol (DFI). El ácido ascórbico reduce el indicador DFI, que es inicialmente una solución color azul, y se oxida a ácido dehidroascórbico, cambiando el color de la solución a color rosa estando en medio con un pH de 2.

Para mantener el pH aproximado a 2 se utiliza una solución de ácido metafosfórico en ácido acético.

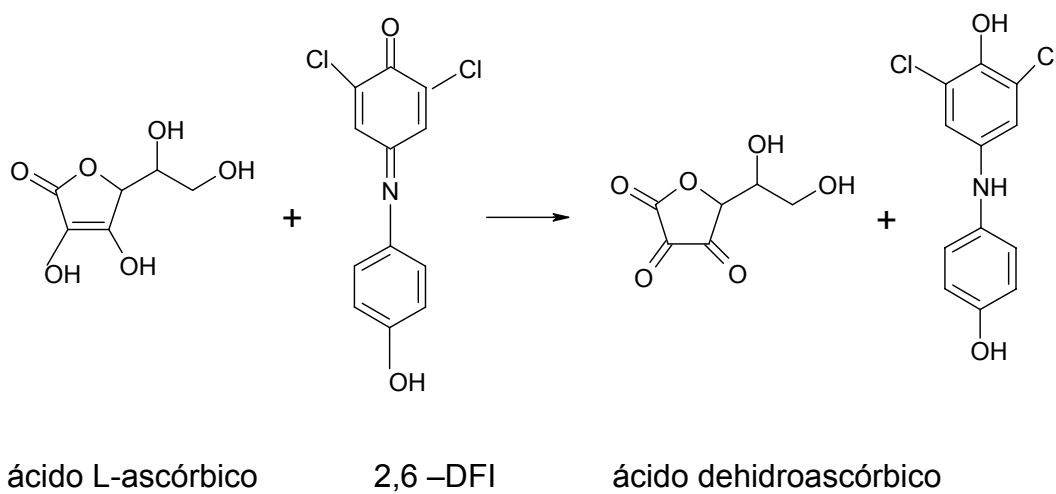


Figura 4. Reacción en la titulación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenolindofenol

2. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

2.1 GENERALIDADES^{18, 19, 20, 21}

La espectroscopia es un área de la ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la materia y la radiación electromagnética. Los métodos analíticos espectroscópicos miden la cantidad de radiación absorbida o emitida por las especies moleculares.

La radiación electromagnética es una forma de energía con propiedades que se pueden describir como ondas de partículas o paquetes de energía llamados fotones. Estas dos maneras de descripción son complementarias.

En el espectro electromagnético la radiación ultravioleta se encuentra comprendida en la zona de 4 a 380nm. La región entre 200 a 380 nm se le conoce como ultravioleta cercano, y la región comprendida entre 4 a 200 nm se le conoce como ultravioleta lejano.

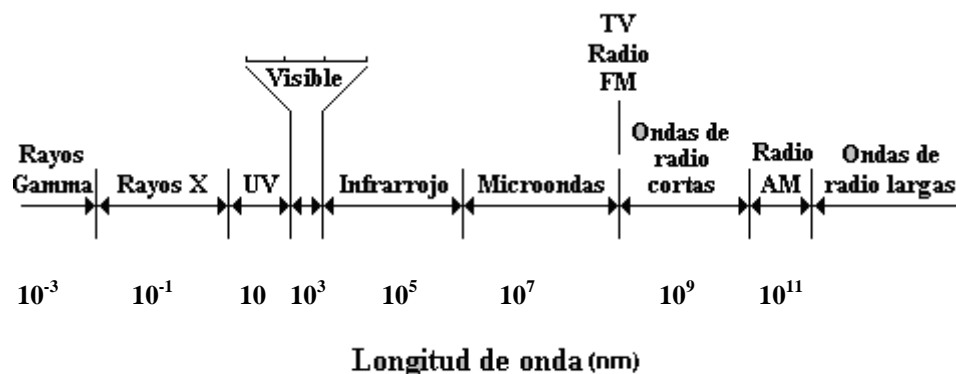


Figura 5. Espectro electromagnético de 10^{-3} a 10^{11} nanómetros

Para entender los fenómenos producidos por la radiación electromagnética la teoría ondulatoria plantea que tiene propiedades de onda como longitud de onda, frecuencia, velocidad, amplitud, etc. La longitud de onda (λ) es la distancia lineal entre dos puntos sucesivos de máximos o mínimos. La frecuencia (ν) es el número de ciclos que pasan por un punto por unidad de tiempo, expresada en ciclos por segundo o en Hertz. La velocidad de la onda esta dada por el producto de la frecuencia y la longitud de onda. Dicha propiedad depende del medio y de la frecuencia de la onda; en el vacío ésta es constante (3×10^{10} cm/seg).

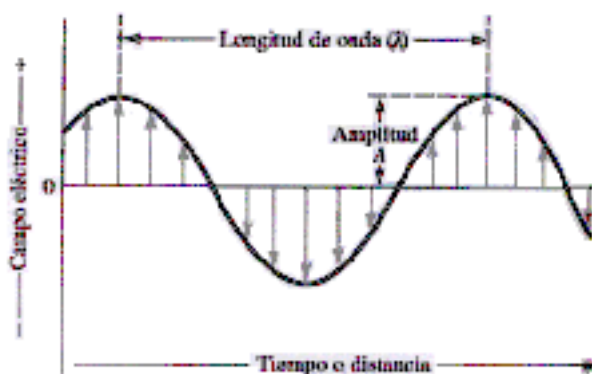


Figura 6. Propiedades de la radiación electromagnética

Una segunda teoría (corpúscular) explica que la radiación electromagnética se comporta en forma de paquetes de energía. Por lo que a absorción en la región ultravioleta y visible es dependiente de la estructura electrónica de las moléculas para los compuestos orgánicos.

La energía total de una molécula es la suma de su energía electrónica, su energía vibracional y su energía rotacional. La energía absorbida en la región ultravioleta produce un cambio en la energía electrónica de la molécula. Estas transiciones consisten en la excitación de un electrón de un orbital molecular ocupado a un orbital de mayor energía.

Las especies absorbentes son las que contienen electrones π , σ y n que se encuentran en moléculas orgánicas. Todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación electromagnética porque contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía superiores. La absorción de radiación visible y ultravioleta cercano está restringida a un número limitado de grupos funcionales (llamados cromóforos), que son especies orgánicas con enlaces no saturados.

Los orbitales moleculares asociados con enlaces sencillos, en las moléculas orgánicas, se designan como orbitales σ , y los electrones correspondientes son electrones σ . En cambio, el doble enlace contiene dos tipos de orbitales moleculares, un orbital sigma (σ) correspondiente a un par de electrones enlazantes y un orbital

molecular pi (π) asociado con el otro par. Los orbitales moleculares de antienlace σ y π se designan como σ^* y π^* , respectivamente.

Las transiciones electrónicas entre los distintos niveles de energía se pueden producir por absorción de radiación. Como se muestra en la figura 7 son posibles cuatro tipos de transiciones: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

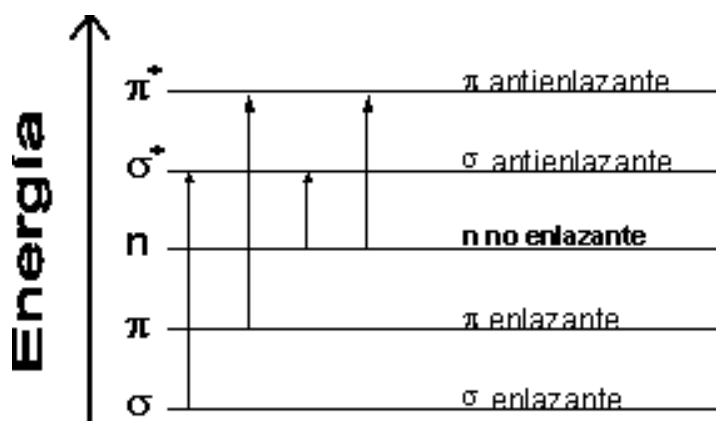


Figura 7. Transiciones electrónicas permitidas

Los electrones que contribuyen a la absorción por una molécula orgánica en UV cercano son:

- Los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces π .
- Los electrones externos no compartidos que se localizan principalmente en los átomos de oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

Para la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$, un electrón de un orbital σ absorbe radiación electromagnética y se excita pasando a un orbital σ de antienlace. Los máximos de absorción debidos a estas transiciones se observan en la región ultravioleta lejana.

En la transición $n \rightarrow \sigma^*$, los compuestos saturados que contienen pares de electrones no compartidos son capaces de sufrir este tipo de transiciones. Los electrones no

compartidos o electrones no enlazantes (n), se excitan pasando a un orbital σ de antienlace, requiriendo para llevar a cabo dicha transición una energía que corresponde a la longitud de onda comprendida entre los 150 y 250nm. Los máximos de absorción para estas transiciones se llegan a desplazar hacia longitudes de onda menores cuando se utilizan disolventes polares.

Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ producen picos de absorción dentro de la región del ultravioleta cercano y visible, en la cual es factible trabajar experimentalmente (200 a 700nm). Las especies con enlaces insaturados absorben en esta región del espectro. Estrictamente hablando, es a estos centros absorbentes no saturados a los que se les aplica el término de cromóforos. Cuando se tienen sistemas de electrones π , se requiere menor energía si el sistema está conjugado, por tanto los máximos de absorción se presentan a longitudes de onda mayores que los $\pi \rightarrow \pi^*$ aislados. A medida que aumenta la conjugación en un compuesto, la diferencia de energía en los niveles π y π^* se hace menor, debido a que los electrones están más deslocalizados.

2.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO^{19, 20, 22}

Para obtener información cuantitativa de una muestra problema se emplea el efecto de la interacción de la radiación con la materia. El analito que se encuentra en mayor parte en su estado de menor energía experimenta una transición a un estado de mayor energía o estado excitado. Se puede medir la radiación electromagnética, absorbida en las transiciones, o la emitida cuando regresa a su estado basal.

P_0 se le llama a la potencia de energía de la radiación que cruza inicialmente a una disolución absorbente en una longitud (b) y de concentración c , y P se le llama a la potencia de la energía de radiación que incide en el detector. La transmitancia T es la relación entre P y P_0 .

$$T = P / P_0$$

La ley de Lambert-Beer que establece la relación entre la transmitancia (T), la longitud y la concentración del analito. Esta relación se expresa de la siguiente manera:

$$\log (P_0 / P) = kcb = A$$

Considerando que A es absorbancia. Donde k es una constante de proporcionalidad, llamada coeficiente de absorptividad. Cuando c es expresada en moles por litro y b en cm la expresión es la siguiente:

$$A = \epsilon cb$$

Donde ϵ se le conoce como coeficiente de absorptividad molar.

Para poder llevar a cabo el análisis cuantitativo de un analito, utilizando la ley de Lambert-Beer, se tiene que construir una curva de calibración; que se realiza con un material de referencia o con un reactivo de alta pureza del analito que se desea cuantificar. Dicha curva requiere de la preparación de una serie de disoluciones provenientes de una disolución de concentración conocida (disolución madre). Se traza un gráfico de la respuesta (absorbancia) de las disoluciones en función de la concentración. Se debe de obtener una línea recta que pase por los puntos de las intersecciones y una ecuación de dicha recta.

Para cuantificar un analito en la espectroscopia UV se requiere obtener la absorbancia a un valor de λ máxima para que se tenga una alta sensibilidad.

2.3 CARACTERÍSTICAS Y APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Como ya se mencionó la espectroscopia UV tiene su principal aplicación en el análisis cuantitativo, el aspecto cualitativo sólo detecta los grupos cromóforos presentes en las moléculas.

Entre las principales características de la técnica de espectroscopia UV son:

- Aplicabilidad, muchas especies tanto orgánicas e inorgánicas absorben la radiación UV.
- Alta sensibilidad, los límites de detección para la espectroscopia UV están en el intervalo 10^{-4} y 10^{-5} M.
- Selectividad de moderada a alta.
- Buena precisión y exactitud.
- Facilidad y comodidad, la espectroscopia UV es una técnica sencilla de manejar, y más ahora debido a los instrumentos modernos y a la automatización de los equipos.

2.4 VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA ABSORBANCIA

a) Celdas. Cuando se tiene una solución y se incide sobre ella un haz de radiación, siempre se tienen pérdidas de la energía ya sea por dispersión o por reflexión debida a los recipientes (celdas) que contiene a la muestra. Debe tomarse en cuenta que existen celdas con diferentes materiales y espesores

b) Disolventes. Los disolventes que se utilizan en esta técnica no deben absorber en la región del espectro en la que absorbe el analito a cuantificar. El analito debe de ser muy soluble en el medio de disolución elegido para obtener espectros bien definidos. También, es necesario considerar las interacciones del disolvente y del analito.

Los disolventes polares; agua, alcoholes, ésteres y cetonas, por su interacción con la especie absorbente forman principalmente puentes de hidrógeno. Los disolventes

no polares; ciclohexano, benceno, entre otros, proporcionan espectros que son muy parecidos a los que se obtienen en fase gaseosa.

<i>Disolvente</i>	<i>Longitud de máxima absorción (nm)</i> λ_{max}
Cloroformo	240
Ciclohexano	195
Etanol	205
Metanol	205
Agua	190

Tabla 1. Longitud máxima de absorción de diferentes disolventes

En la tabla 1 se presentan las longitudes de máxima de absorción de los disolventes más utilizados en la espectroscopia UV.

c) Otros factores. La absorción de un analito puede ser afectada por otros factores como el pH, la temperatura y la composición de la matriz, ya que puede contener especies que son capaces de absorber también en la región de ultravioleta. Es necesario conocer los efectos que provocan cada una de estas variables para elegir las mejores condiciones para el análisis.

Por lo mencionado anteriormente, para la cuantificación de un analito se requiere utilizar un blanco para compensar las pérdidas que se pudieran tener debido a las celdas, al disolvente utilizado o a la matriz.

2.5 INSTRUMENTACIÓN^{19, 20}

Los instrumentos que se utilizan para medir la absorción de la radiación ultravioleta y visible tienen los siguientes componentes:

- Lámparas o fuentes. Los equipos de UV-Visible utilizan dos fuentes de radiación; para la región ultravioleta la lámpara de deuterio y para la región visible la lámpara de tungsteno.
- Sistema óptico. Está basado en un monocromador, compuesto por una rendija de entrada que proporciona una imagen óptica rectangular, un espejo que conduce un haz de luz paralelo de radiación, una rejilla de dispersión o espejo holográfico que dispersa la radiación en sus diferentes longitudes de onda individuales y un elemento focalizador que forma de nuevo la imagen de la rendija de entrada y la enfoca en una superficie plana denominada plano focal. Si el instrumento es automatizado un motor mueve un sistema de espejos a la lámpara elegida bajo el control del programa acoplado al equipo. Existen espectrofotómetros de un solo haz y de doble haz.
- Detectores. Existen dos tipos de detectores, de fotodiodos y con fotomultiplicador. Los detectores de fotodiodos están formados por una unión polarizada inversamente montada en un “chip” de silicio, cuando la radiación incide sobre el detector de electrones, se mueven a través del dispositivo dando lugar a una corriente que es proporcional a la potencia radiante.

En el fotomultiplicador los fotones pasan al fotocátodo el cual emite un número de electrones por cada fotón, estos electrones son dirigidos al ánodo y amplificados en un pre-amplificador.

3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS^{22, 24}

Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para lograr confiabilidad, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin es la validación; por el cual se demuestra, experimentalmente, que el método cumple con su propósito.

Las autoridades regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas como se indican en la NOM-059-SSA1²⁵, NOM-164-SSA1²⁶, NOM-073-SSA1²⁷, y en otros lineamientos regulatorios internacionales mencionan la validación como uno de los requisitos técnicos para que los resultados de los laboratorios sean válidos.

La tabla 2 indica los parámetros de desempeño a estudiar según la Guía de Validación de Métodos Analíticos.²²

Parámetro de desempeño	Valoración / Potencia
Precisión / Adecuabilidad del sistema	SI*
Linealidad del sistema	SI*
Especificidad	SI
Exactitud y Repetibilidad*	SI
Linealidad del Método	SI
Precisión del Método	SI*
Estabilidad Analítica	Dependiendo de la naturaleza del método
Límite de Detección	NO
Límite de Cuantificación	NO
Robustez y Tolerancia	Dependiendo de la naturaleza del método

*Nota: Parámetros que se llevaron a cabo en el presente trabajo.

Tabla 2. Parámetros de desempeño

3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA^{22, 24, 28}

La linealidad se define como la habilidad del sistema (o técnica) para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por transformación matemática definida sean resultados proporcionales a la concentración del analito en la prueba. Dicha relación no debe ser absolutamente lineal pero si debe demostrarse que tiende a una línea recta en un intervalo dado, aplicando una regresión lineal. Los cálculos de regresión lineal en si mismos son insuficientes para demostrar la linealidad, conviene además una inspección visual de la gráfica obtenida. A esa gráfica se le llama curva de calibración; en tanto en la regresión lineal se debe probar que la variable independiente es directamente proporcional a la variable dependiente. En el caso de la linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del analito.

La curva de calibración debe hacerse por lo menos con cinco niveles de concentraciones distribuidas en un intervalo, que debe abarcar entre un 50 a 100% de la posible concentración del analito por determinar; a partir de una solución de referencia por dilución. A continuación se debe medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones, reportar la relación respuesta analítica contra concentración. Calcular el valor de la pendiente (**m**), la ordenada en el origen (**b**), el intervalo de confianza para la pendiente (**IC**) y coeficiente de determinación (**r²**). Donde el criterio de aceptación es el siguiente:

$$r^2 \geq 0.98 \text{ ó } r \geq 0.98$$

Se realiza una prueba de hipótesis a la ordenada al origen para demostrar si cumple o no la ecuación lineal planteada, y posteriormente se calcula el intervalo de confianza (I.C.) para la ordenada y la pendiente obtenidas.

Para comprobar si los resultados obtenidos experimentalmente se ajustan a una línea recta con ordenada al origen igual a cero o no, se realiza una prueba de hipótesis, basada en la ecuación:

$$Y = mX + \beta$$

Estableciendo lo siguiente:

$H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$ (Hipótesis nula)

$H_1: b \neq \beta$ (Hipótesis alterna)

Se utiliza el estadístico de la "t de student": Se realiza el siguiente cálculo experimental de "t":

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{X})^2}}$$

donde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta=0$).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{x} = Media experimental.

Al tratarse de un ensayo de dos colas y tomando un nivel de significancia del 95%, es decir un $\alpha=0.05$ (5%), el cual corresponde a un valor a nivel internacional para la mayoría de las metodologías analíticas que se empiezan a desarrollar. Además considerando n-2 grados de libertad, el error típico de estimación se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}}$$

siendo:

$$Sxx = n \sum_{t=1}^n X_t^2 - \left[\sum_{t=1}^n X_t \right]^2$$

$$Syy = n \sum_{t=1}^n Y_t^2 - \left[\sum_{t=1}^n Y_t \right]^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{t=1}^n X_t Y_t - \left[\sum_{t=1}^n X_t \right] \left[\sum_{t=1}^n Y_t \right]$$

el criterio que se toma para rechazar la hipótesis nula (H_0) es:

$$t_{\text{cal}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal}} > t_{\alpha/2}$$

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada y la pendiente con el mismo nivel de significancia se utilizan las siguientes ecuaciones:

-para la ordenada al origen:

$$I.C. = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (nX)^2}{nS_{xx}}}$$

-para la pendiente:

$$I.C. = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

3.2 PRECISIÓN^{22, 24}

La precisión es la proximidad de la concordancia que se tiene entre un número finito de ensayos independientes de una misma propiedad, cuyos resultados son obtenidos por mediciones repetidas de una magnitud bajo las mismas condiciones.

La precisión se expresa numéricamente por medidas como la desviación estándar, la varianza o como la desviación estándar relativa también llamada coeficiente de variación. Así, por lo tanto, a una mayor desviación estándar se tiene una menor precisión.

3.2.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema se define como el grado de concordancia de diferentes resultados de mediciones realizadas de varias soluciones de un analito que provienen de una misma solución madre; cada solución y medición se lleva a cabo bajo las mismas condiciones de trabajo en el sistema o técnica que se utiliza.

Para este ensayo se realizan pruebas de hipótesis sobre la varianza, con los datos experimentales obtenidos. Planteando lo siguiente:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde σ_0^2 es la varianza contra la que se va a comparar (tomando como mínimo 5% del C.V.).

$H_1: s^2 > \sigma_0^2$

Ya que se trata de muestras aleatorias que derivan de una población normal de varianza σ_0^2 se utiliza la prueba estadística de χ^2 con n-1 grados de libertad, por lo que se realiza el cálculo de χ^2 experimental con la siguiente ecuación:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

siendo:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar muestral (experimental).

σ_0^2 = Varianza máxima aceptada, es decir, contra la que se va a comparar (máximo 5% del C.V.)

El criterio para rechazar la H_0 es:

$$\chi^2_{\text{cal}} > \chi^2_{\alpha}$$

Por lo que se comparará la χ^2 experimental con la obtenida en tablas para su rechazo o no.

También se puede realizar el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar aplicando la siguiente ecuación:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}}$$

3.2.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Las dos medidas de precisión de un método analítico más comunes son la repetibilidad y la reproducibilidad.

La repetibilidad proporciona una idea de la clase de variabilidad en los resultados de un analista en un método, dando idea de la variabilidad de resultados de una muestra que se trabaja con dicho método en varias repeticiones de éste; por lo que es la precisión máxima esperada.

La reproducibilidad en este trabajo será el grado de concordancia de los resultados obtenidos por diferentes analistas aplicando un mismo método a una misma muestra. Se debe de tomar en cuenta que los resultados de este ensayo implican el efecto de varios aspectos, como la habilidad del analista, volúmenes medidos, etc.

3.2.2.1 Repetibilidad

En este caso el proceso estadístico es semejante al que se realiza para precisión de sistema.

Por lo que se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde σ_0^2 es la varianza contra la que se va a comparar (tomando como mínimo 5% del C.V.)

$H_1: s^2 > \sigma_0^2$

Ya que se trata de muestras aleatorias que derivan de una población normal de varianza σ_0^2 se utiliza la prueba estadística de χ^2 con n-1 grados de libertad, por lo que se realiza el cálculo de χ^2 experimental con la siguiente ecuación:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

siendo:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar muestral (experimental).

σ_0^2 = Varianza máxima aceptada, es decir, contra la que se va a comparar (máximo 5% del C.V.)

El criterio para rechazar la H_0 es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha}$$

Por lo que se comparará la χ^2 experimental con la obtenida en tablas para su rechazo o no.

También se puede realizar el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar aplicando la siguiente ecuación:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{(1-\alpha/2)}^2}}$$

3.2.2.2 Reproducibilidad

Para el estudio de reproducibilidad se realiza un estudio estadístico a las varianzas primero y a las medias posteriormente dependiendo la manera de realizar esta última de lo que se encuentre de la prueba de varianzas.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas es:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de poblaciones iguales, para la comparación de varianzas se utiliza el estadístico F de Snedecor. Por lo que primero se calcula la F_{cal} con los datos experimentales obtenidos con la siguiente ecuación:

$$F_{cal} = s_1^2 / s_2^2$$

donde:

s_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad.

s_2^2 = es la varianza muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad.

y se rechaza la H_0 si al comparar la F_{cal} con la de tablas se obtiene que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}, \text{ con grados de libertad } n_M - 1, n_m - 1$$

Según el resultado obtenido sobre las varianzas se procede a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias que se establece como:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir } \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Para esto se realiza el estadístico de prueba “t de student” pero dependiendo del resultado de la prueba de las varianzas cambia la forma de realizar el cálculo.

-Cuando las varianzas son semejantes el cálculo de t_{cal} se realiza con la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

con $(n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad.

Y se rechaza la hipótesis nula si:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

-En el caso de que las varianzas no son semejantes, es decir los analistas no tuvieran la misma precisión, el cálculo de t_{cal} se realiza con la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

con \emptyset grados de libertad, calculando éstos con la ecuación:

$$\emptyset = \frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_{M-1}} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_{m-1}}} = \text{g.l.}$$

La hipótesis nula también se rechaza si:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

3.3 RECOBRO O RECUPERACIÓN^{22, 24}

El término recobro se refiere a la cantidad de analito (expresada en porcentaje) determinada en una muestra sintética empleando el método analítico establecido. El cálculo es simplemente el cociente entre la cantidad de analito que se ha cuantificado por el método y la concentración “real” del analito en la muestra en porcentaje. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{[Concentración]_{obtenida}}{[Concentración]_{teórica}} \times 100$$

Este proceso se puede realizar ya sea fabricando una muestra sintética lo más parecida a la muestra que se va a trabajar en la que se le adicionaron cantidades conocidas y precisas del o los analitos a analizar y a la que se le aplicará la metodología desarrollada; o adicionando cantidades conocidas y precisas del o los analitos que se están analizando a una muestra previamente analizada.

II. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

II. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

TÉCNICA EMPLEADA

Espectrofotometría UV

1. REACTIVOS Y MUESTRAS

- L -ácido ascórbico Mallinckrodt lote:4407 NO9474
- Ácido sulfúrico 95-97% Merck 7664-93-9
- Tanque de nitrógeno de alta pureza 99.997% Infra
- Tabletas orales de 500mg de ácido ascórbico de BAYER de lote: 06060611, caducidad: jun/08
- Tabletas orales de 500mg de ácido ascórbico de BAYER de lote: 06092606, caducidad: sep/08
- Tabletas masticables de Cevalin de 500mg de ácido ascórbico de BAYER de lote:06011809, con fecha de caducidad de 08 de enero de 2008.

2. EQUIPO Y MATERIAL

-Espectrofotómetro UV-Visible, marca UNICAM, modelo UV 500 THERMO SPECTRONIC (doble haz), con programa Vision 32.

-Balanza analítica, marca Sartorius, modelo CP1245 de 120g y sensibilidad = 0.1mg.

-Balanza granataria, marca EMettler Zürich, modelo Tipo H5 de Cap160g y sensibilidad = 0.5mg.

-Pipetas volumétricas tipo "A".

-Matraces volumétricos tipo "A".

-Matraces Erlenmeyer.

-Vasos de precipitados.

-Mortero de porcelana con pistilo.

-Parrilla eléctrica, marca *Thermolyne Cinarec*.

-Sonicador, marca *Ultrasonic Cleaner de Branson*.

-Micropipeta de 100 a 1000 μ L, marca *Hamilton*.

3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ÁCIDO ASCÓRBICO

3.1. CONDICIONES DE TRABAJO / ESTABILIDAD DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISOLUCIÓN

Se prepara como medio de disolución: ácido sulfúrico 0.1M y se burbujea por 15 minutos en nitrógeno.⁷ El estándar de ácido ascórbico se disuelve en este medio.

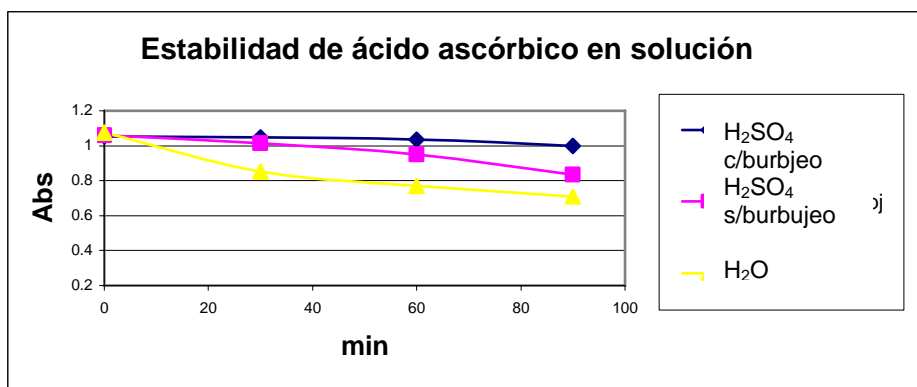
Se realizó la experiencia de estabilidad del ácido ascórbico en agua destilada y en ácido sulfúrico con previo burbujeo con nitrógeno y sin burbujeo.

Para esto, se preparó una solución madre de ácido ascórbico de concentración 0.165mg/mL en los tres medios de disolución mencionados. Se tomó una alícuota de 3mL y fue llevada a un volumen de 25mL. Estas disoluciones fueron monitoreadas cada 30 minutos en una hora y media.

	H ₂ SO ₄ c/b 15min	H ₂ SO ₄ s/burbujeo	H ₂ O s/burbujeo
Tiempo(min)	Abs	Abs	Abs
0	1.055	1.059	1.074
30	1.048	1.014	0.851
60	1.034	0.949	0.769
90	0.999	0.833	0.710

Tabla 3. Estabilidad de ácido ascórbico en diferentes medios de disolución

Se comprobó que el ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujeado con N₂ permite un menor grado de oxidación de ácido ascórbico en periodos mayores de tiempo; por lo que el medio de disolución mencionado al principio de 3.1 se utilizará para todas las soluciones que a continuación se describen en este trabajo aunque sólo se mencione el ácido sulfúrico sin mencionar el burbujeo con N₂.



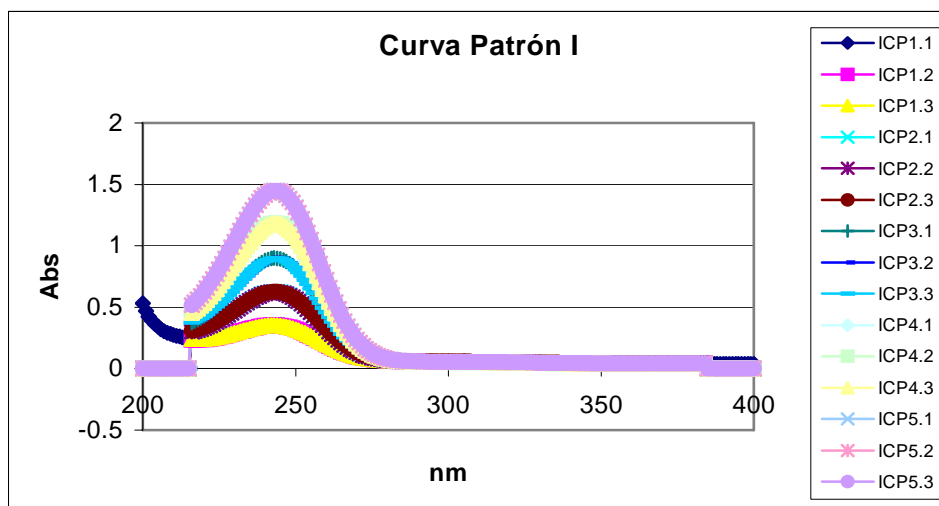
Gráfica 1. Estabilidad de ácido ascórbico en diferentes medios de disolución

3.2 CURVAS PATRÓN

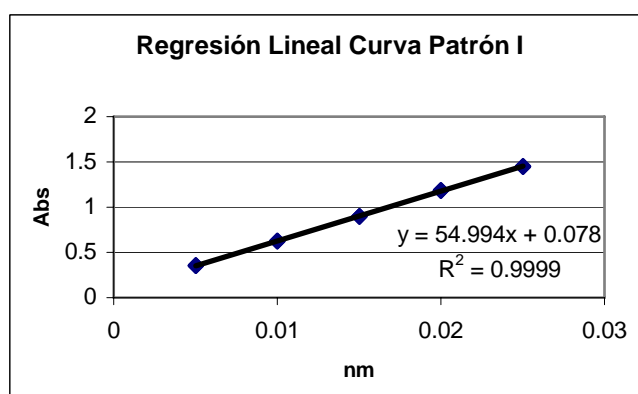
Se realizó una serie de curvas patrón solamente para verificar que se cumpliera la ley de Lambert-Beer del ácido ascórbico en un intervalo de concentración, considerando el contenido de la vitamina en las tabletas y las diluciones convenientes. La comprobación de la linealidad del sistema se encuentra en el siguiente capítulo.

Se llevó a cabo el estudio de ácido ascórbico por espectroscopia UV en la longitud de onda máxima de 243nm en base a lo reportado. Las curvas patrón se registraron en absorbancia fueron en concentraciones entre 0.005mg/mL a 0.0338mg/mL, cada estándar se leyó por triplicado. Consultar Anexo I.

Para la primera curva patrón se pesaron 12.5mg de ácido ascórbico y se aforaron en un matraz de 100mL con medio de disolución H₂SO₄ 0.1M, obteniéndose una solución madre de 0.125mg/mL. De ésta se tomaron cinco alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5mL y fueron llevadas a un volumen de 25mL; obteniendo las siguientes concentraciones en las disoluciones estándar 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025mg/mL.

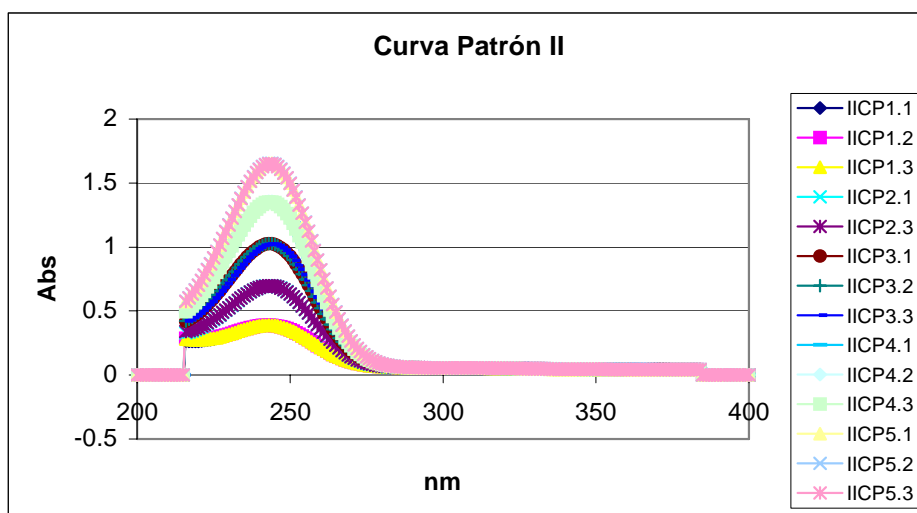


Espectro 1. Curva patrón I de ácido ascórbico en disolución de ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado

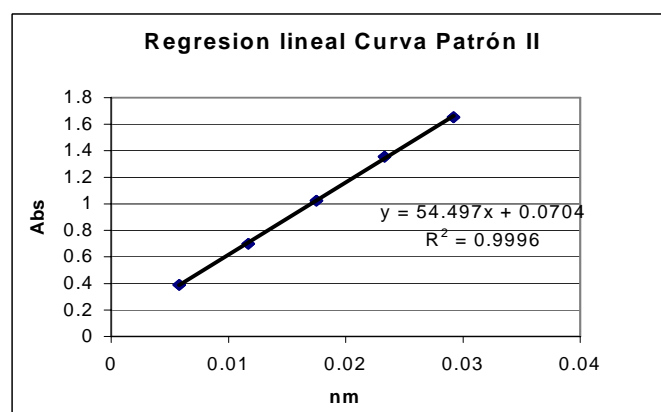


Gráfica 2. Regresión lineal de la curva patrón I

Para la segunda curva patrón se pesaron 14.6mg de ácido ascórbico y se aforaron en un matraz de 100mL con medio de disolución H_2SO_4 0.1M, obteniéndose una solución madre de 0.146mg/mL. De ésta se tomaron cinco alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5mL y fueron llevadas a un volumen de 25mL; obteniendo las siguientes concentraciones en las disoluciones estándar 0.0058, 0.0117, 0.0175, 0.0233, 0.0292mg/mL.

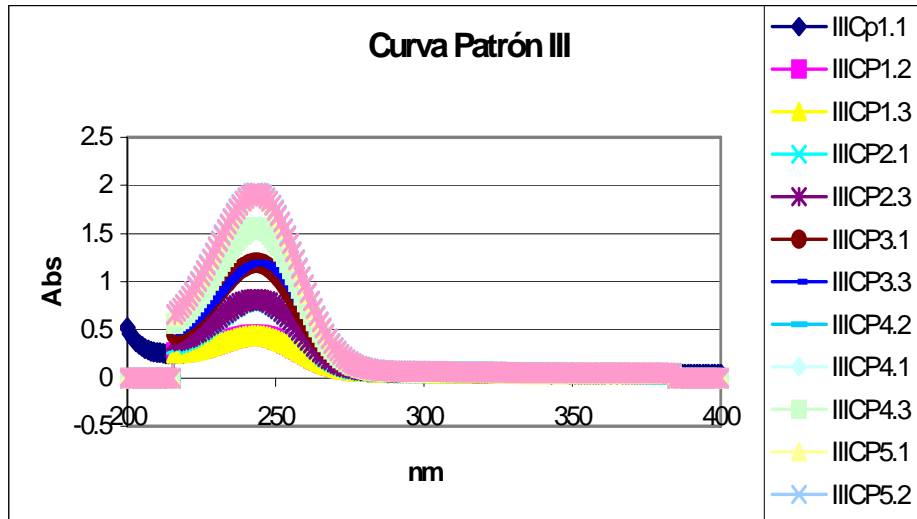


Espectro 2. Curva patrón II de ácido ascórbico en disolución ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado

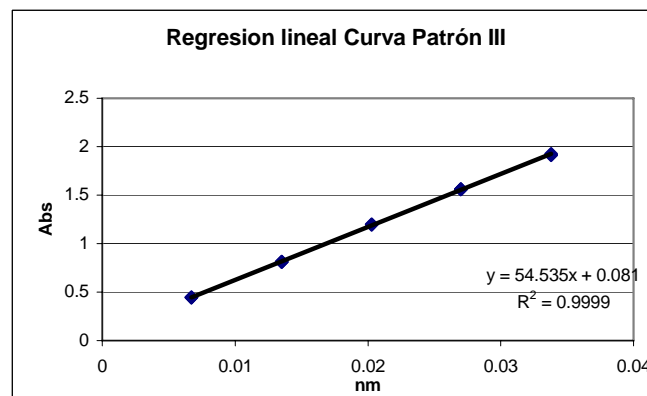


Gráfica 3. Regresión lineal de la curva patrón II

Para la tercera curva patrón se pesaron 16.9mg de ácido ascórbico y se aforaron en un matraz de 100mL con medio de disolución H_2SO_4 0.1M, obteniéndose una solución madre de 0.169mg/mL. De ésta se tomaron cinco alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL y fueron llevadas a un volumen de 25mL; obteniendo las siguientes concentraciones en las disoluciones estándar de 0.0067, 0.0135, 0.0203, 0.027, 0.0338 mg/mL.



Espectro 3. Curva patrón III de ácido ascórbico en disolución de ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado



Gráfica 4. Regresión lineal de la curva patrón III

Las pendientes calculadas de las curvas I, II y III fueron promediadas para obtener el valor del coeficiente de absortividad) (k), en la fórmula de $Y = m \cdot X + b$, dando la siguiente ecuación:

$$A = 54.675 \cdot [C] + 0.076$$

3.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO CON AGITACIÓN O SONICACIÓN

A continuación se llevó a cabo el estudio para la extracción del ácido ascórbico en las tabletas, a diferentes tiempos por sonicación y agitación mecánica, para seleccionar el más conveniente para su cuantificación por espectrofotometría UV.

Para la extracción de ácido ascórbico por sonicación se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se pesaron diez tabletas de Cevalin de 500mg de ácido ascórbico de BAYER (# de lote: 06060611). Se calculó el peso promedio de una tableta.
- 2) Las tabletas fueron pulverizadas en un mortero.
- 3) Se colocó aproximadamente el peso promedio de una tableta en un matraz aforado de 100mL, se le adicionó una cantidad suficiente de la disolución de H_2SO_4 0.1M.
- 4) La disolución anterior fue sometida a sonicación durante cinco minutos.
- 5) Después de este tiempo se llevó al aforo del matraz de 100mL y se filtró.
- 6) Se tomó una alícuota de 0.015mL y se llevó al aforo de un matraz de 50mL.
- 7) Se registró el espectro por triplicado a 243nm.

Se repitió el procedimiento cinco veces más a la misma muestra, sometiendo a sonicación (paso 4 del procedimiento) a la disolución durante 0, 10, 15, 20 y 25 minutos respectivamente.

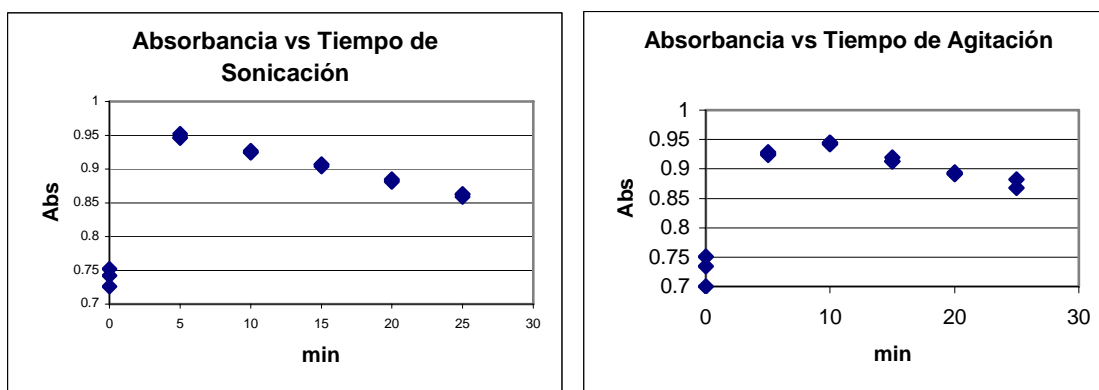
Para la extracción de ácido ascórbico por agitación magnética se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) Se pesaron diez tabletas de Cevalin de 500mg de ácido ascórbico de BAYER de lote: 06060611.
- 2) Las tabletas fueron pulverizada en un mortero.
- 3) Se colocó el peso promedio de una tableta en un matraz aforado de 100mL con suficiente disolución de H_2SO_4 0.1M.

- 4) La disolución fue sometida a agitación durante cinco minutos.
- 5) Después de este tiempo se llevó al aforo del matraz de 100mL y se filtró.
- 6) Se tomó una alícuota de 0.015mL y se llevó al aforo de un matraz de 50mL.
- 7) Se registró el espectro por triplicado a 243nm.

Se repitió el procedimiento cinco veces más a la misma muestra, sometiendo a agitación magnética (paso 4 del procedimiento) a la disolución durante 0, 10, 15, 20 y 25 minutos respectivamente.

Se obtuvieron los siguientes resultados.



Gráfica 5 y 6. Absorbancia contra tiempo de sonicación y absorbancia contra tiempo de agitación magnética, respectivamente

Se puede observar que en ambos métodos se obtienen resultados similares, sin embargo se decidió tomar como método de extracción más conveniente el de cinco minutos por sonicación, por ser más sencillo el procedimiento y obtenerse la mayor absorbancia (0.950) en el menor tiempo posible. Se debe notar que se tomaron las lecturas por triplicado y se tomaron 2 lecturas a tiempos menores de 5 minutos en sonicación buscando disminuir el tiempo de sonicación, tomando en cuenta que la vitamina C es muy soluble en el medio utilizado. Después de diez minutos, por ambos métodos las absorbancias, comienzan a descender, ya que, como se mencionó anteriormente el ácido ascórbico en solución se oxida en ácido dehidroascórbico. Como puede notarse, el método desarrollado es muy sensible; por lo que se debe ser muy cuidadoso en los tiempos de extracción del principio activo.

Los excipientes no intervienen en la determinación de ácido ascórbico en tabletas orales, esto se menciona en el punto 1.4 del capítulo III.

Otros medicamentos que se probaron fueron las tabletas masticables de Cevalin de Bayer® que tienen un color rosa y sabor fresa por lo que se decidió utilizar la eliminación de los excipientes por medio de un cartucho de extracción en fase sólida (cartucho C₁₈), para eliminar el color. En la bibliografía consultada¹⁰ hay un ensayo que comprueba que este cartucho no retiene al ácido ascórbico. En la figura 8 se muestra la separación del color de la muestra. También se hizo el ensayo de la extracción sólo, utilizando la filtración por gravedad. No se aprecia una gran diferencia en la cuantificación de ácido ascórbico en tabletas masticables con eliminación de excipientes por filtración o por filtración por cartucho.

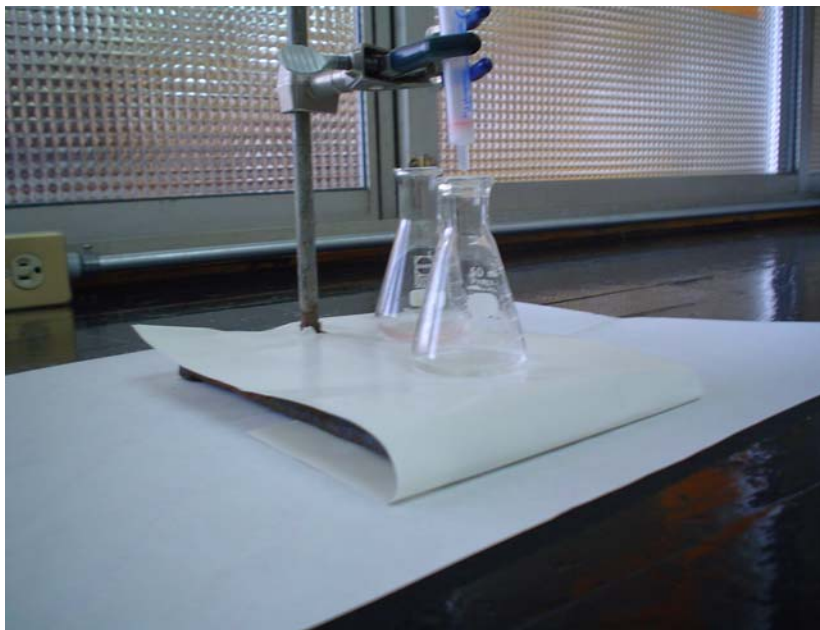


Figura 8. Limpieza por cartucho de tabletas masticables de Cevalin sabor fresa en H_2SO_4 0.1M como medio de disolución

4. METODOLOGÍA PROPUESTA PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR ESPECTOFOTOMETRÍA UV EN TABLETAS ORALES

Después de las diferentes pruebas realizadas se plantea la siguiente metodología:

- 1) Pesar diez tabletas orales y masticables de Cevalin, obtener el peso promedio de una tableta.
- 2) Triturarlas en un mortero.
- 3) Pesar el peso promedio de una tableta e introducirlo en un matraz aforado de 100mL.
- 4) Agregar suficiente solución de ácido sulfúrico 0.1M sin aforar, previamente burbujeado durante 15 minutos con nitrógeno.
- 5) Someter a sonicación cinco minutos, aforar y filtrar por gravedad.
- 6) De este filtrado tomar una alícuota de 0.10mL con una micropipeta y llevarla a un matraz aforado de 25mL y aforar con la solución de H₂SO₄ 0.1M.
- 7) Registrar el espectro por triplicado a una longitud de onda de 243nm.

Se trabajó en un intervalo de concentración de 0.005mg/mL a 0.033mg/mL (que daba un intervalo de 0.35 a 1.9 de absorbancia) para disminuir la cantidad de diluciones en la metodología aplicada a presentaciones farmacéuticas de concentraciones similares; y por lo tanto, evitar el aumento de errores.

A continuación se presenta la metodología planteada en forma de diagrama de flujo.

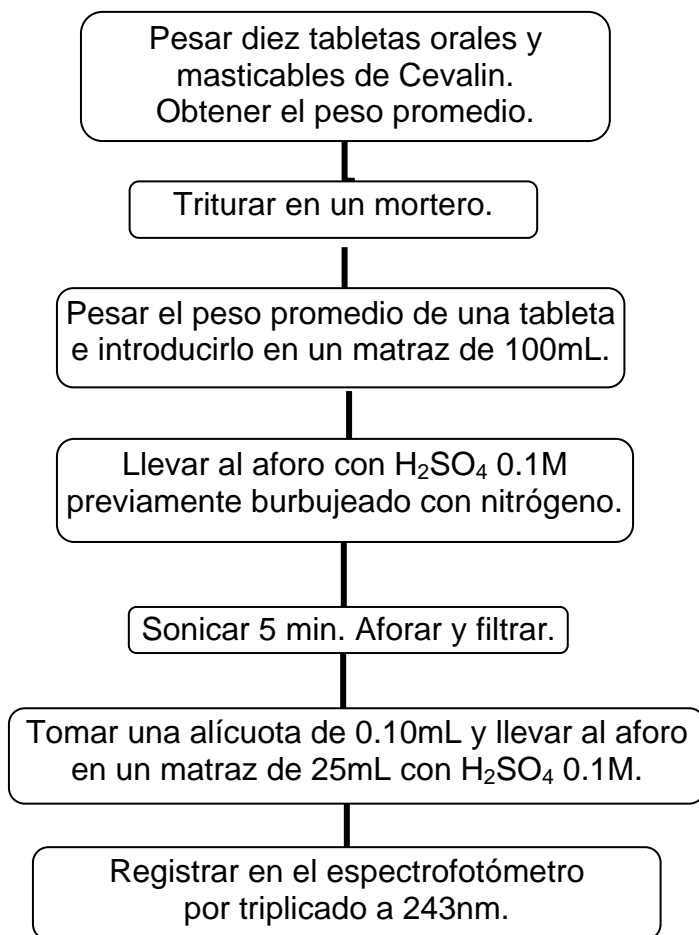


Diagrama 1. Metodología propuesta para la determinación de ácido ascórbico por espectrofotometría UV en tabletas orales y masticables

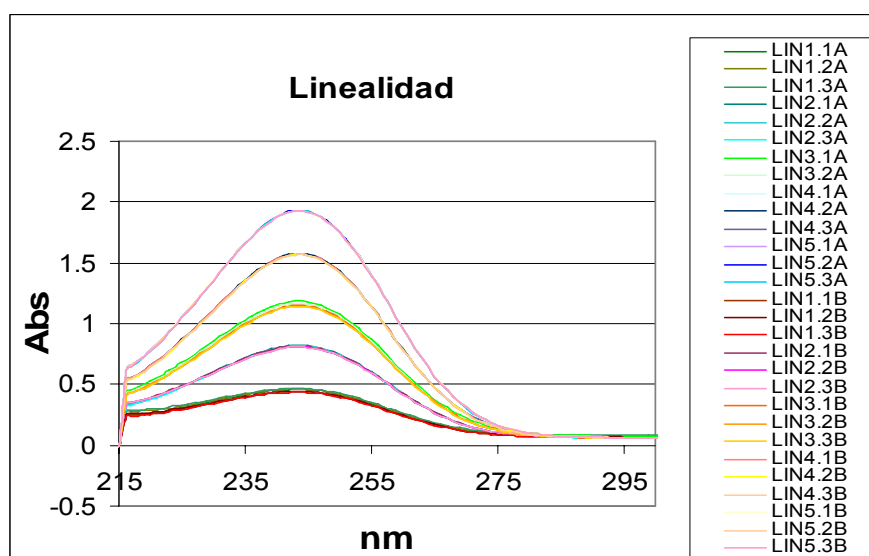
III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. PRUEBAS DE VALIDACIÓN

1.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Al realizar la prueba de la linealidad del sistema se quiere probar que el sistema que se está utilizando sea capaz de relacionar directamente la absorbancia con la concentración de ácido ascórbico, de tal manera que al graficar los valores de la respuesta obtenida, de las disoluciones de diferentes concentraciones se obtenga una línea recta con coeficiente de correlación lineal mayor a 0.98 que es el valor planteado por la industria farmacéutica.

Para esto, se preparó una solución madre de ácido ascórbico de concentración 0.174mg/mL. Se realizaron cinco diluciones por duplicado (A y B) de 1, 2, 3, 4 y 5mL llevadas a un volumen de 25mL; obteniendo las siguientes concentraciones en las disoluciones estándar 0.00696, 0.01392, 0.02088, 0.02784, 0.03480mg/mL, como se puede ver en la tabla 3A y 3B. Las disoluciones se leyeron por triplicado obteniéndose la curva patrón enseñada en la gráfica 7, la cual se sometió a pruebas estadísticas para comprobar que presenta linealidad y tiende al origen.



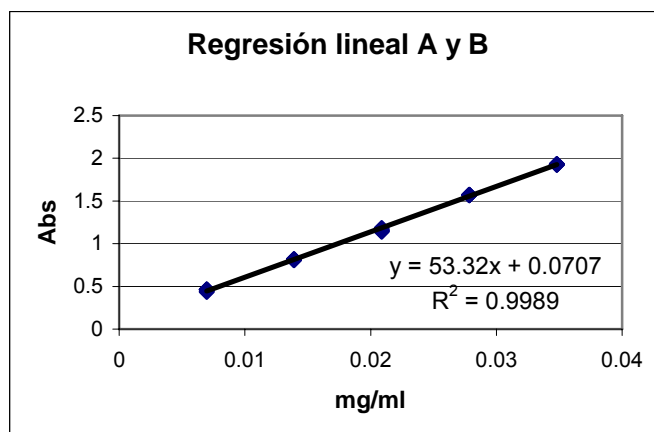
Espectro 4. Espectro de linealidad del sistema de ácido ascórbico

[C] (mg/mL)	Abs $\lambda=243\text{nm}$	Muestra	Nombre de muestra
0.00696	0.4606	LIN1.1 A	Linealidad I, dilución 1, alícuota 1(A), lectura 1
0.00696	0.4614	LIN1.2 A	Linealidad I, dilución 1, alícuota 1(A), lectura 2
0.00696	0.4664	LIN1.3 A	Linealidad I, dilución 1, alícuota 1(A), lectura 3
0.01392	0.8221	LIN2.1 A	Linealidad I, dilución 2, alícuota 1(A), lectura 1
0.01392	0.8172	LIN2.2 A	Linealidad I, dilución 2, alícuota 1(A), lectura 2
0.01392	0.8138	LIN2.3 A	Linealidad I, dilución 2, alícuota 1(A), lectura 3
0.02088	1.1855	LIN3.1 A	Linealidad I, dilución 3, alícuota 1(A), lectura 1
0.02088	1.1638	LIN3.2 A	Linealidad I, dilución 3, alícuota 1(A), lectura 2
0.02088	1.1584	LIN3.3 A	Linealidad I, dilución 3, alícuota 1(A), lectura 3
0.02784	1.5703	LIN4.1 A	Linealidad I, dilución 4, alícuota 1(A), lectura 1
0.02784	1.5752	LIN4.2 A	Linealidad I, dilución 4, alícuota 1(A), lectura 2
0.02784	1.5711	LIN4.3 A	Linealidad I, dilución 4, alícuota 1(A), lectura 3
0.0348	1.9281	LIN5.1 A	Linealidad I, dilución 5, alícuota 1(A), lectura 1
0.0348	1.9331	LIN5.2 A	Linealidad I, dilución 5, alícuota 1(A), lectura 2
0.0348	1.9304	LIN5.3 A	Linealidad I, dilución 5, alícuota 1(A), lectura 3

Tabla 4A. Concentración, absorbancia, número y nombre de la muestra de ácido ascórbico para alícuota A para linealidad del sistema

[C] (mg/mL)	Abs $\lambda=243\text{nm}$	Muestra	Nombre de muestra
0.00696	0.4425	LIN1.1 B	Linealidad I, dilución 1, alícuota 2(B), lectura 1
0.00696	0.4401	LIN1.2 B	Linealidad I, dilución 1, alícuota 2(B), lectura 2
0.00696	0.4353	LIN1.3 B	Linealidad I, dilución 1, alícuota 2(B), lectura 3
0.01392	0.8137	LIN2.1 B	Linealidad I, dilución 2, alícuota 2(B), lectura 1
0.01392	0.8083	LIN2.2 B	Linealidad I, dilución 2, alícuota 2(B), lectura 2
0.01392	0.8067	LIN2.3 B	Linealidad I, dilución 2, alícuota 2(B), lectura 3
0.02088	1.15	LIN3.1 B	Linealidad I, dilución 3, alícuota 2(B), lectura 1
0.02088	1.1455	LIN3.2 B	Linealidad I, dilución 3, alícuota 2(B), lectura 2
0.02088	1.14	LIN3.3 B	Linealidad I, dilución 3, alícuota 2(B), lectura 3
0.02784	1.5712	LIN4.1 B	Linealidad I, dilución 4, alícuota 2(B), lectura 1
0.02784	1.5683	LIN4.2 B	Linealidad I, dilución 4, alícuota 2(B), lectura 2
0.02784	1.5654	LIN4.3 B	Linealidad I, dilución 4, alícuota 2(B), lectura 3
0.0348	1.9288	LIN5.1 B	Linealidad I, dilución 5, alícuota 2(B), lectura 1
0.0348	1.9267	LIN5.2 B	Linealidad I, dilución 5, alícuota 2(B), lectura 2
0.0348	1.9235	LIN5.3 B	Linealidad I, dilución 5, alícuota 2(B), lectura 3

Tabla 4B. Concentración, absorbancia, número y nombre de la muestra de ácido ascórbico para alícuota B para linealidad del sistema



Gráfica 7. Regresión lineal de los puntos A y B

De la gráfica se obtiene:

Ordenada al origen: 0.0707

Pendiente: 53.32mL/mg*cm

Coefficiente de correlación: 0.9989

Para confirmar que realmente se tiene una tendencia al origen de la ecuación obtenida en la gráfica 7, se procede a realizar una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen.

$H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$

$H_1: b \neq \beta$

Se utilizó el estadístico “t de student” para realizar esta prueba, fijando como nivel de significancia 95% ($\alpha = 0.05$) y teniendo 28 grados de libertad (n-2).

Se calcula t experimental:

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = 10.1095$$

donde:

$$b = 0.0707$$

$$n = 30$$

$$\bar{X} = 0.01898$$

$$S_{xx} = n \sum_{l=1}^n X_l^2 - \left[\sum_{l=1}^n X_l \right]^2 = 0.0872$$

$$S_{yy} = n \sum_{l=1}^n Y_l^2 - \left[\sum_{l=1}^n Y_l \right]^2 = 248.1997.$$

$$S_{xy} = n \sum_{l=1}^n X_l Y_l - \left[\sum_{l=1}^n X_l \right] \left[\sum_{l=1}^n Y_l \right] = 4.6496$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 1.76 \times 10^{-2}$$

De tablas se obtiene que:

$$t_{\alpha/2} (0.025, 28) = 2.3684$$

El criterio para rechazar la H_0 es que:

$$t_{cal} > t_{\alpha/2} \quad \text{ó} \quad t_{cal} < -t_{\alpha/2}$$

En este caso $t_{\alpha/2}$ es menor que t_{cal} por lo que se rechaza la H_0 , y por lo tanto la regresión lineal no tiende al origen, de esta manera se toma la ecuación de la recta tomando en cuenta el valor de la ordenada que se obtiene al realizar la regresión lineal sin tomar en cuenta el origen, por lo que la ecuación para cuantificar será la de:

$$A = 53.324 [C] + 0.0707$$

Posteriormente se calcula el intervalo de confianza (I.C.) al 95% de nivel de significancia para la ordenada y la pendiente, obteniéndose los siguientes resultados:

Ordenada: 0.0707

Intervalo superior de confianza

$$I.C. = b + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (nX)^2}{nS_{xx}}} = 0.08726$$

Intervalo inferior de confianza

$$I.C. = b - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (nX)^2}{nS_{xx}}} = 0.05414$$

Pendiente: 53.324

Intervalo superior de confianza

$$I.C. = m + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} = 54.0946$$

Intervalo inferior de confianza

$$I.C. = m - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} = 52.5454$$

Llevando a cabo el tratamiento estadístico a la linealidad del sistema se tiene que:

- El método es lineal con $r^2=0.9989$, pendiente = 53.324mL/mg*cm y ordenada al origen = 0.0707.
- La linealidad del sistema no tiende al origen, por lo que se debe de tomar en cuenta la ordenada matemática para el cálculo de concentraciones usando, por lo tanto, la ecuación: $y=mx+b$.
- El intervalo de confianza para b es **0.05414 < 0.0707 < 0.08726**
- El intervalo de confianza para m es **52.5454 < 53.324 < 54.0946 mL/mg*cm.**
- Se llevó a cabo el estudio de linealidad en el intervalo que se trabajarán las muestras en la metodología establecida.

Para los cálculos en hoja de excel obsérvese Anexo II.

1.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

A continuación se llevó el estudio para observar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por el sistema bajo las mismas condiciones de trabajo.

La precisión del sistema se determinó con siete disoluciones de la misma concentración preparadas a partir de una solución madre de 0.169mg/mL. De esta solución se tomaron siete alícuotas de 3mL llevándolas al aforo en un matraz de 25mL con ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujeado con nitrógeno. Las disoluciones se sometieron a sonicación durante 5 minutos y se leyeron por quintuplicado a 243nm. Dando como resultado lo siguiente:

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$
1.1	1.1725
1.2	1.1732
1.3	1.1738
1.4	1.1739
1.5	1.1728
2.1	1.1682
2.2	1.1746
2.3	1.1669
2.4	1.1732
2.5	1.1697
3.1	1.1682
3.2	1.1651
3.3	1.1677
3.4	1.1625
3.5	1.1702
4.1	1.1695
4.2	1.1682
4.3	1.1671

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$
4.4	1.1693
4.5	1.1701
5.1	1.1656
5.2	1.1659
5.3	1.1679
5.4	1.1681
5.5	1.1673
6.1	1.1701
6.2	1.1704
6.3	1.1695
6.4	1.1702
6.5	1.1699
7.1	1.1727
7.2	1.1751
7.3	1.1687
7.4	1.1721
7.5	1.1691

Tabla 5. Resultados para prueba de precisión de sistema

n	35
Media	1.1697
s exp.	0.00291
s ² exp	8.4835E-06
% CV exp.	0.2490
% CV teórico	5
s teórica	0.05848
s ² teórica	0.00342

n	35
Media	1.1697
s exp.	0.00291
s ² exp.	8.4835E-06
% CV exp.	0.2490
% CV teórico	1
s teórica	0.01170
s ² teórica	0.00014

Tabla 6. Valores estadísticos para la prueba de precisión de sistema

Para conocer si la precisión del sistema es mayor al 95% se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

H₀: s² = σ₀², donde σ₀² = tomando en cuenta el 5% del C.V. de los datos es

$$0.00342$$

H₁: s² > σ₀²

Donde el estadístico de prueba a utilizar es la prueba a utilizar es χ² por lo que se procede a calcular la χ²_{cal}:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 0.08432$$

donde:

n = número de determinaciones = 35

s² = varianza experimental = 0.0000084

σ₀² = 0.00342

El criterio para rechazar la H₀ es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha, n-1},$$

De tablas se obtiene que:

$$\chi^2_{\alpha, n-1} = \chi^2_{0.05, 34} = 48.6023$$

Por lo tanto como $\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{(0.05,34)}$ se puede concluir que acepta H_0 , y la precisión del sistema es mayor al 95%.

En el Anexo III se tiene la página excel de estos cálculos y se tiene además el cálculo para una precisión mayor al 99% que como se verá también se cumple.

El cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar de los datos, a un nivel de significancia del 95%, es:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}}$$

Intervalo inferior = 0.00236

Intervalo superior= 0.00382

Después de haber llevado a cabo el tratamiento estadístico de la precisión del sistema se obtuvo que:

- El sistema es preciso con error menor al 5%. Inclusive es menor al 1% cumpliendo lo planteado por la industria farmacéutica para una técnica espectroscópica UV-Vis que es del 3%.
- El intervalo de confianza para la desviación estándar es **0.00235 < 0.00291 < 0.00381**

1.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Las mediciones se llevarán a cabo en el intervalo de concentración en el que se trabaja la metodología propuesta (diagrama 1). La repetibilidad y reproducibilidad son mediciones de precisión del método realizadas en condiciones preestablecidas.

1.3.1 REPETIBILIDAD

En este trabajo la repetibilidad dará la idea de la variabilidad de los resultados obtenidos por el analista al aplicar la metodología establecida a muestras (reales o sintéticas) en el mismo espectrofotómetro.

Se llevó a cabo este estudio siguiendo la metodología establecida en el capítulo II, con las tabletas orales de 500mg de ácido ascórbico de BAYER de # de lote: 06060611.

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$
1.1	1.2326
1.2	1.2394
1.3	1.2394
2.1	1.2221
2.2	1.2135
2.3	1.2197
3.1	1.2527
3.2	1.2541
3.3	1.2575
4.1	1.2159
4.2	1.2208
4.3	1.224
5.1	1.2108
5.2	1.2073
5.3	1.2083

Tabla 7. Lecturas de muestras para prueba de precisión de método

n	15
Media	542.4980
s exp.	7.9728
s ² exp.	63.5657
% CV exp.	1.4696
% CV teórico	5
s teórica =	27.126
s ² teórica =	735.8197

n =	15
Media =	542.4980
s exp =	7.9728
s ² exp =	63.5657
% CV exp =	1.4696
% CV teórico	1
s teórica =	5.42498
s ² teórica =	29.4304

Tabla 8. Valores estadísticos para la prueba de precisión del método

Para conocer si la repetibilidad es mayor al 95% se utiliza una prueba de hipótesis relativa a la varianza, la prueba de hipótesis se plantea de la siguiente manera:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde $\sigma_0^2 = 735.28$

$H_1: s^2 > \sigma_0^2$

Se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad. Para calcular la χ^2_{cal} se usa la siguiente ecuación:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 1.2095$$

dónde:

n = número de determinaciones = 15

s^2 = varianza experimental = 63.76

σ_0^2 = varianza contra la que vamos a comparar = 735.28

El criterio para rechazar la H_0 es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha, n-1}$$

De tablas se obtiene que:

$$\chi^2_{(\alpha, n-1)} = \chi^2_{(0.05, 14)} = 23.68$$

Como para este caso $1.209 < 23.68$ se acepta la H_0 , y decimos que el método tiene una repetibilidad mayor al 95%, es decir que se tiene una repetibilidad con un error máximo del 5%.

En el Anexo IV se tiene la página excel de estos cálculos y se tiene además el cálculo para una repetibilidad mayor al 98% que como se verá también se cumple.

Después se calculó el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Intervalo inferior = 5.8371

Intervalo superior = 12.5739

Después de haber llevado a cabo el tratamiento estadístico de la repetibilidad del método se obtuvo que:

- El método planteado es repetible con error menor al 5%. Inclusive es menor al 2% cumpliendo lo planteado por la industria farmacéutica para una metodología que aplica la técnica espectroscópica UV-Vis que es del 3%.
- El intervalo de confianza para la desviación estándar es **5.8371 < 7.9728 < 12.5739**

1.3.2 REPRODUCIBILIDAD

Para evaluar la reproducibilidad se llevó a cabo la metodología establecida por el analista 1 (A.D.Ramírez) y un segundo analista (L.C.López) el mismo día, partiendo del mismo lote de tabletas orales de Cevalin.

Para llevar a cabo este estudio cada uno de los analistas siguió la metodología establecida en el capítulo II con las tabletas orales de 500mg de ácido ascórbico de BAYER del lote: 06092606.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Absorbancia $\lambda=243\text{nm}$	Absorbancia $\lambda=243\text{nm}$	mg/tableta	mg/tableta
Número de Muestra	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
1.1	1.1611	1.0547	511.21	461.33
1.2	1.1565	1.055	509.06	461.47
1.3	1.155	1.0551	508.35	461.52
2.1	1.0923	1.006	478.96	438.50
2.2	1.0956	1.0037	480.51	437.42
2.3	1.0952	1.002	480.32	436.62
3.1	1.0338	1.0001	451.53	435.73
3.2	1.0302	0.9978	449.84	434.65
3.3	1.0312	0.9985	450.31	434.98
4.1	1.1405	1.0754	501.56	471.04
4.2	1.1405	1.075	501.56	470.85
4.3	1.1407	1.0741	501.65	470.43
5.1	1.0068	1.0075	438.87	439.20
5.2	1.0102	1.0054	440.47	438.22
5.3	1.0063	1.0059	438.64	438.45
	Media =		476.19	448.69
	s =		28.50	15.08
	CV =		5.98	3.36

Tabla 9. Absorbancia y contenido de ácido ascórbico por tableta para prueba de precisión de método

Las pruebas estadísticas completas de los cálculos en hoja excel se encuentran en el Anexo V.

Se realizó primero la prueba de hipótesis sobre las varianzas para comparar las precisiones de los analistas, por lo que se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Se aplica la prueba estadística F de Snedecor. Por lo que se calcula la F experimental de la siguiente manera:

$$F_{\text{cal}} = s_1^2 / s_2^2 = 3.570$$

donde:

$$s_1^2 = 812.21$$

$$s_2^2 = 227.50$$

El valor de la F de tablas para 14 grados de libertad para los 2 analistas es de:

$$F_{\alpha/2} = 2.484$$

y se rechaza la H_0 si al comparar la F_{cal} con la de tablas se obtiene que:

$$F_{\text{cal}} > F_{\alpha/2}, \text{ con grados de libertad } n_{M-1}, n_{m-1}$$

Debido a que $F_{\text{cal}} > F_{\alpha/2}$ se rechaza la hipótesis nula H_0 por lo que se concluye que los analistas no tuvieron la misma precisión, y por lo tanto se va a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias tomando en cuenta que las varianzas son diferentes

La prueba de hipótesis sobre las medias es:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir } \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

La "t" experimental se calcula de la siguiente manera:

$$t_{\text{cal}} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = 3.3$$

Se obtiene la $t_{\alpha/2}$ de tablas:

$$t_{\alpha/2} = 2.41$$

para los siguientes grados de libertad calculados de la siguiente manera:

$$\emptyset = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_{M-1}} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_{m-1}}} = 21$$

Se rechaza la hipótesis nula si:

$$t_{\text{cal}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal}} > t_{\alpha/2}$$

Por lo tanto $3.3 > 2.41$, la H_0 se rechaza por lo que los datos no pertenecen a la misma población lo que me indica que la metodología no fue reproducible.

Después de haber llevado a cabo el tratamiento estadístico de la reproducibilidad del método se obtuvo que:

- El método no fue reproducible por parte del analista 2. Lo anterior indica que el método requiere de pericia y rapidez por parte del analista que lo trabaje.

1.4 RECOBRO

El recobro es un factor importante para corregir los cálculos cuantitativos que se realicen sobre las muestras.

Primero, se corroboró que los excipientes no intervienen en la determinación de ácido ascórbico. Se analizó un blanco de reactivos fabricando placebos con cada uno de los excipientes mencionados en el Anexo VI y se les aplicó la metodología planteada en este trabajo para la determinación de ácido ascórbico. De esta manera se comprobó que la matriz (disolvente y excipientes no eliminados en la extracción), no absorben a la longitud de onda de 243nm.

La prueba de recobro se realizó fabricando una muestra sintética que se buscó fuera lo más parecida a las muestras reales utilizadas en este trabajo, y cuya composición teórica y porcentajes se mencionan en el anexo VI.

Se pesaron porciones equivalentes a diez tabletas para fabricar muestra sintética. Se pesaron 4.9970g de ácido ascórbico y 3.7915 de excipiente. Teniendo como concentración 499.53 mg/tableta.

De la muestra sintética anterior se cuantificaron siete porciones de muestra tomadas. Los pesos de las siete muestras fueron los siguientes:

Número de muestra	Peso (gramos)
1	0.9025
2	0.881
3	0.8755
4	0.888
5	0.8845
6	0.8875
7	0.8815

Tabla 10. Peso de las muestras para la prueba de recobro

Se siguió la metodología propuesta del capítulo II de este trabajo. Para la columna de miligramos de ácido ascórbico por tableta simulada por el placebo (mg/tableta) se aplicaron el factor de dilución y la ecuación dada en linealidad de sistema (punto 1.1 del capítulo III). Para determinar el porcentaje de recobro, se usó la siguiente ecuación:

$$\% R = \frac{[Concentración]_{obtenida}}{[Concentración]_{teórica}} \times 100$$

Número de muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$	(mg/tableta)	%Recobro
1.1	1.2495	538.0653	104.8635
1.2	1.2498	538.2022	104.8902
1.3	1.2501	538.3392	104.9169
2.1	1.2041	529.9831	105.8104
2.2	1.2044	530.1234	105.8384
2.3	1.2012	528.6271	105.5397
3.1	1.2225	541.9380	108.8776
3.2	1.2198	540.6677	108.6223
3.3	1.2135	537.7034	108.0268
4.1	1.2266	536.2260	106.2170
4.2	1.2291	537.3858	106.4467
4.3	1.2350	540.1228	106.9889
5.1	1.2231	536.7265	106.7390
5.2	1.2247	537.4717	106.8872
5.3	1.2328	541.2443	107.6375
6.1	1.2055	526.7503	104.4021
6.2	1.2038	525.9612	104.2457
6.3	1.2020	525.1257	104.0801
7.1	1.1990	527.2828	105.2146
7.2	1.1995	527.5165	105.2612
7.3	1.1986	527.0959	105.1773
		Media =	106.0325
		s =	1.4073
		CV =	1.3272

Tabla 11. Resultados de recobro

Después de haber llevado a cabo el estudio del recobro del método se obtuvo que:

- Se corroboró que los excipientes no interfieren en la determinación de ácido ascórbico.
- El porcentaje de recobro promedio determinado es de 106.03%.

IV. APLICACIÓN DEL MÉTODO

IV APLICACIÓN DEL MÉTODO

1. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN TABLETAS ORALES POR EL MÉTODO PUBLICADO EN LA FARMACOEPA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS (FEUM) Y EL MÉTODO PROPUESTO POR ESPECTOFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

A continuación se muestran los resultados de la comparación del método propuesto en este trabajo con el oficialmente establecido por la FEUM. El método oficial de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos octava edición¹⁷ maneja una titulación volumétrica directa con 2,6 – diclorofenolindofenol. Se debe de tomar en cuenta que, para llevar a cabo esta valoración se tiene menor práctica que en el método desarrollado y que esta técnica presenta algunos puntos difíciles de cumplir por cualquier laboratorio; como lo son el uso de microbureta y el volumen de reactivos a utilizar.

Para el método oficial, las especificaciones, fundamento, reactivos, determinación y metodología, son los siguientes:

Especificaciones: La tableta debe de contener no menos del 90% y no más del 110% de la cantidad de ácido ascórbico indicada en el marbete.

Fundamento: El ácido ascórbico reduce el indicador 2,6 - diclorofenolindofenol (DFI), que es inicialmente una solución color azul, y se oxida a ácido dehidroascórbico, cambiando el color de la solución a color rosa estando en medio ácido. Para mantener el pH bajo se utiliza una solución de ácido metafosfórico en ácido acético. Los reactivos DFI y ácido metafosfórico son higroscópicos y en solución se descomponen; por lo que ambas soluciones se deben de usar dentro de un periodo no mayor a dos días después de su preparación.

Reactivos:

Solución de Referencia (SR) de 2,6 – diclorofenolindofenol: Disolver 50.0mg de sal de sodio de DFI en 100mL de agua y filtrar. Para su valoración; disolver 20.0mg de ácido ascórbico en 10mL de una solución recién preparada de ácido metafosfórico

de 200g/L y completar hasta 250mL con agua. Valorar rápidamente 5.0mL de esta solución con la solución patrón de DFI, añadida por medio de una microbureta en centésimas de mililitro, hasta coloración rosa persistente durante 10s.

Solución de Referencia (SR) de ácido metafosfórico en ácido acético Disolver 15g de ácido metafosfórico en 40mL de ácido acético glacial y suficiente agua, hasta tener un volumen de 500mL.

Determinación: Se llevó a cabo la comparación de ambos métodos (FEUM y el propuesto por espectrofotometría UV), tratando con la misma matriz (tabletas orales de Cevalin de # de lote 06092606), los mismos tiempos (considerando su degradación) y ahorrando la mayor cantidad posible de reactivos.

Blanco: Para este procedimiento se efectúa una prueba en blanco en una mezcla de 5.5mL de SR de ácido metafosfórico en ácido acético y 15mL de agua para corregir el volumen de la SR de DFI consumido.

A continuación se presentan los diagramas de flujo de las metodologías FEUM y la desarrollada en este trabajo.

Metodología según FEUM

Metodología propuesta por UV

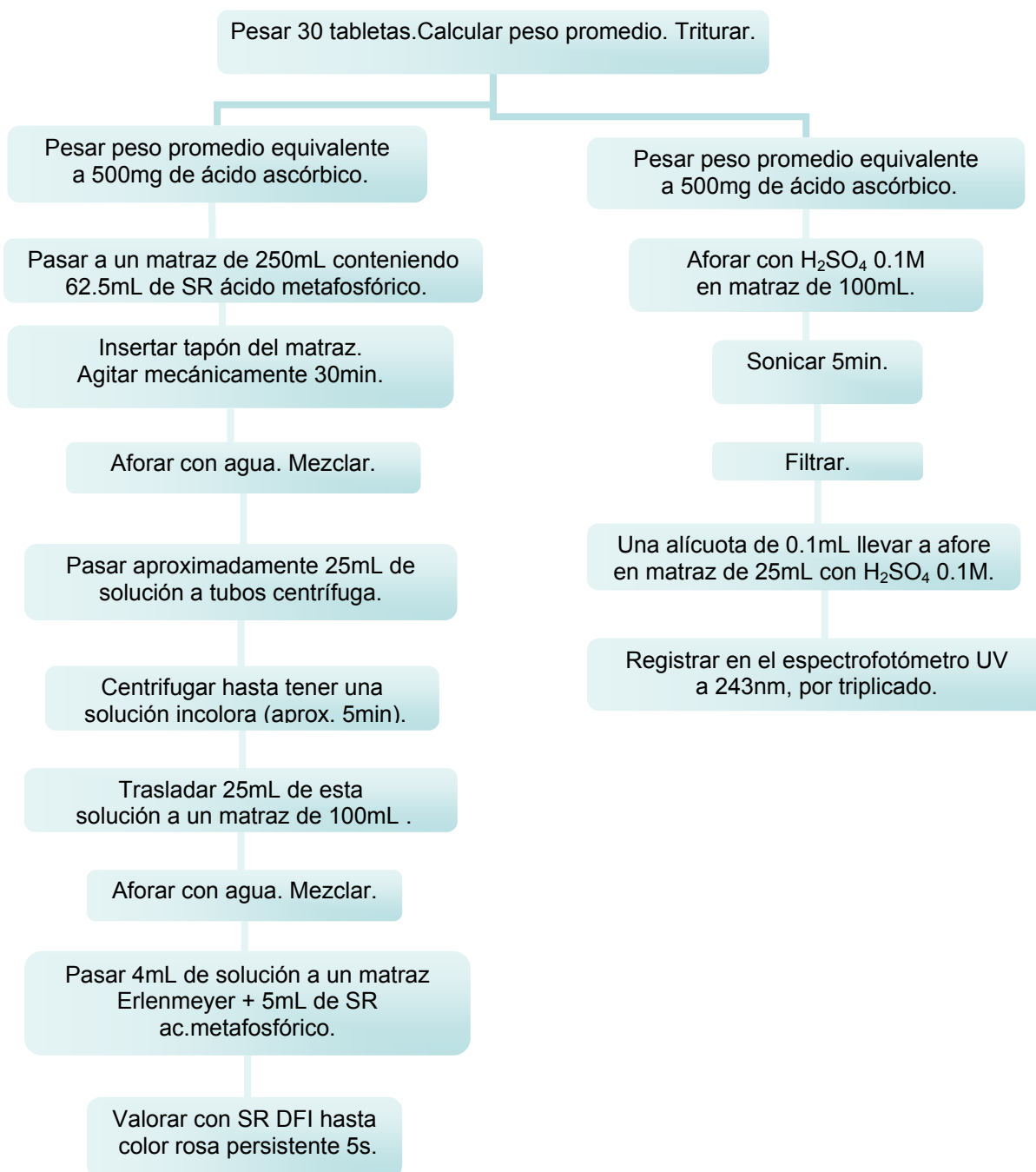


Diagrama 2. Metodología propuesta por espectrofotometría UV y metodología propuesta por la FEUM para la determinación de ácido ascórbico en tabletas orales. Se calculó el contenido de ácido ascórbico por tableta a partir del equivalente de ácido ascórbico de la SR de DFI, o en el otro caso, a partir de su absorbancia, y sus respectivos factores de dilución.

FEUM		
No Mstra	mg/tab	%ac.ascórb.
1F	521.7531	104.3501
2F	520.1465	104.0293
3F	523.4677	104.6935
4F	453.6046	90.7209
5F	444.3882	88.8776
6F	450.6591	90.1318
7F	452.7006	90.5401
8F	451.3150	90.2630
9F	502.4619	100.4923
10F	504.9272	100.9854

Promedio=	482.54
CV=	7.14%

UV		
No Mstra	mg/tab	%ác.ascorb.
1N	503.7865	100.7573
2N	527.5405	105.5081
3N	516.7823	103.3564
4N	559.8373	111.9674
5N	567.3084	113.4616
6N	487.4539	97.4907
7N	485.9189	97.1837
8N	566.1381	113.2276
9N	504.0072	100.8014
10N	479.7213	95.9442

Promedio=	519.85
CV=	6.53%

Tabla 12. Resultados de ambos métodos. Cuantificación de ácido ascórbico por titulación de 2,6- diclorofenol indofenol (izquierda) y por espectrofotometría ultravioleta (derecha)

Para hacer el estudio de la comparación de los resultados obtenidos por las 2 metodologías se realizan las mismas pruebas estadísticas que se realizaron en el estudio de repetibilidad, por lo que primero se realiza un estudio estadístico para las varianzas para ver la precisión de ambos métodos y dependiendo del resultado de ésta se le realiza la prueba estadística a las medias.

Por lo que se realiza el análisis estadístico sobre las varianzas planteando la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Se calcula la F experimental:

$$F_{cal} = s_1^2 / s_2^2 = 1.031$$

donde:

$$s_1^2 = 1187.03$$

$$s_2^2 = 1153.62$$

La F de tablas obtenida para 9 grados de libertad para ambas metodologías es:

$$F_{\alpha/2} = 3.179$$

y se rechaza la H_0 si al comparar la F_{cal} con la de tablas se obtiene que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}, \text{ con grados de libertad } n_M - 1, n_m - 1$$

Se acepta la hipótesis nula H_0 ya que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, por lo que las 2 metodologías presentaron la misma precisión, y se realiza la prueba estadística a las medias considerando varianzas semejantes.

Por lo tanto la prueba de hipótesis para las medias fue:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir } \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Por obtenerse varianzas iguales se realizó el cálculo de la "t" experimental con la ecuación:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

obteniéndose un valor de:

$$t_{cal} = -2.43$$

Se obtiene la "t" de tablas con $(n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad es decir 18, dando un valor de:

$$t_{\alpha/2} = 2.69$$

Se rechaza la hipótesis nula si :

$$t_{\text{cal}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal}} > t_{\alpha/2}$$

Como $-2.43 > -2.69$ la H_0 se acepta y esto indica que las muestras analizadas por cada metodología pertenecen a la misma población por lo que las dos metodologías son comparables estadísticamente.

Los cálculos completos de esta prueba estadística en hoja excel se encuentra en el Anexo VII.

Después de haber llevado a cabo el estudio estadístico de comparación de la 2 metodologías se obtuvo que:

- Para la determinación de ácido ascórbico en tabletas orales y masticables, la metodología establecida por la FEUM octava edición¹⁷ y la metodología propuesta en este trabajo son comparables estadísticamente y por lo tanto la metodología desarrollada es comparable en su validación con la de la FEUM.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo desarrollado en este trabajo y de lo reportado en bibliografía se ha llegado a las siguientes conclusiones:

I.- Se corroboró, de acuerdo a la bibliografía⁷, la estabilidad de ácido ascórbico en un medio ácido sin oxígeno; disolviéndolo en H₂SO₄ 0.1M previamente burbujeado con N₂ durante 15 minutos.

II.- La cuantificación directa de ácido ascórbico en tabletas orales y tabletas masticables es posible por espectrofotometría UV.

III.- Se comprobó que no hay interferencias por parte de los excipientes en el recobro que se llevó a cabo.

IV.- Se comprobó que la técnica por filtración es igual de efectiva que la de extracción en fase sólida usando cartuchos C₁₈, por lo cuál, se seleccionó la extracción con filtración por gravedad para el método propuesto por ser más simple su manipulación.

V.- Se estableció que la mejor técnica de extracción del principio activo es por sonicación, y que además es más sencillo su manipulación a comparación con el de agitación magnética, además se obtiene la mejor absorbancia en el menor tiempo posible.

VI.- El intervalo de concentraciones de 0.005mg/mL a 0.04mg/mL para las disoluciones de ácido ascórbico presenta una buena linealidad ($r > 0.98$) para su cuantificación por el método espectrofotométrico UV.

VII.- Para cuantificar vitamina C en tabletas por espectroscopia UV se obtuvo que se tiene que aplicar la ecuación de la recta sin tendencia al origen.

VIII.- La ecuación determinada en el intervalo de concentración 0.0069 a 0.0348mg/mL es $A = 53.324*[C] + 0.0707$. Siendo el intervalo de confianza para la

ordenada de **0.05414 < 0.0707 < 0.08726** y el intervalo de confianza para la pendiente de **52.5454 < 53.324 < 54.0946**.

IX.- El sistema presento una precisión con un error menor al 5%.

X.- Se obtuvo que el método desarrollado para la cuantificación de vitamina C por espectrofotometría UV es repetible con una precisión mayor al 95%.

XI.- Sobre el estudio de reproducibilidad se obtuvo que el segundo analista no pudo reproducir la metodología ya que se requiere de un entrenamiento exhaustivo en la manipulación de esta metodología antes de comenzar a dar resultados. Además de que requiere de rapidez y capacitación constante del analista.

XII.- Al hacer la comparación del contenido de ácido ascórbico en tabletas orales por el método publicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y el método propuesto por espectrofotometría se obtuvo que los métodos son comparables estadísticamente y por lo tanto la metodología desarrollada es válida para la cuantificación de vitamina C en tabletas.

Hay que considerar además que la metodología por titulación con DFI presenta el inconveniente de que si existen otras sustancias reductoras se consume una mayor cantidad de solución titulante y el contenido aparente de la vitamina C es mayor del real. Además que depende de la apreciación visual de la persona que realiza la titulación.

XII.- Por lo anterior se cumplió con el objetivo de obtener un método confiable, rápido, preciso y de bajo costo para la cuantificación de vitamina C en tabletas orales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Davies, Michael B.; J.Austin y D.A.Ptridge. ***Vitamin C. Its chemistry and biochemistry.*** London, 1991.
2. Fennema, O. ***Química de Alimentos.*** España, Acribia, 1993.
3. Güçlü, Kubilay; K. Sözgen, E. Tütem, et.al., *Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II) – neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals*, **Talanta**, Vol. 65, pp1226 – 1232, marzo 2005.
4. Janghel E.K., V.K. Gupta and J.K. Rai, *Micro determination of ascorbic acid using methyl viologen*, **Talanta**, Vol. 72 (3), pp 1013-1026, enero 2007.
5. Lenghor, Narong, J. Jakmunee, M. Vilen, et.al. , *Sequential injection redox or acid-base determination of ascorbic acid or acetic acid*, **Talanta**, Vol.58, pp1139 – 1144, diciembre 2002.
6. Pérez H., María L e I. Ponce, ***Métodos analíticos para determinación de ácido ascórbico.*** Facultad de Química, UNAM, 1994. (Trabajo monográfico de actualización mancomunado de Química Farmacéutica Biológica).
7. Ramírez Maya, Erika M. ***Nuevo método por espectrometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados.*** Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2002. (Tesis de licenciatura de Química de Alimentos).
8. Rocha R.P. Fabio; O. Fatibrillo y B.F. Reis. *A multicommuted flow system for sequential spectrophotometric determination of hidrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations.* **Talanta**. Vol.59 pp191-200, enero 2003.
9. Sigmann, Samuela and D.E. Wheeler, *Quantitative determination of citric and ascorbic acid in powdered drink mixes*, **Journal of Chemical Education**, Vol.81 (10), pp1479 – 1481, octubre 2004.
10. Tolonen M., ***Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición***, Acribia, 1ra edición, España.
11. Verdini, Roxana and C.M. Lagier, *Studying current – potential curves using a bipotentiometric iodometric back titration for the determination of ascorbic acid in fruits and vegetables*, **Journal of Chemical Education**, Vol.81 (10), pp1482 – 1482 – 1485, octubre 2004.
12. Genaro, Alfonso. ***Remingtons Pharmaceutical Sciences.*** Pennsylvania, Merck, 1990.

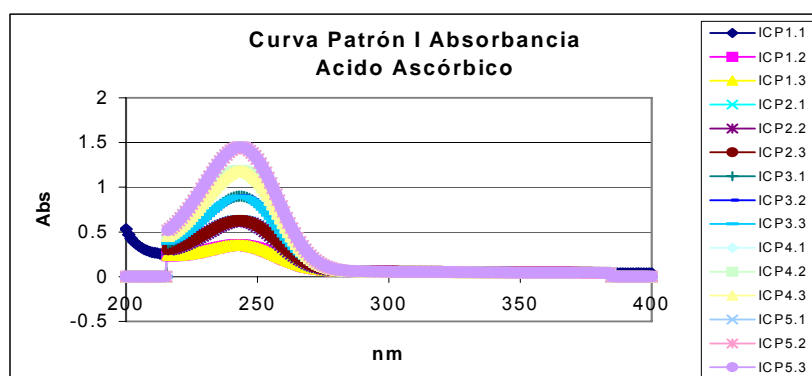
13. **The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.** 14a ed., New Jersey, Merck, 2006.
14. Wong Dominic, **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**, Acribia, España, 1989.
15. Badui D. Salvador, **Química de los alimentos**, Alhambra Mexicana, México, 1995.
16. May, James M. y N. Smirnoff. **Vitamin C, Function and biochemistry in animals and plants**, London, BIOS Scientific Publishers, 2004.
17. Secretaria de Salud. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.**, 8a ed., México, 2004.
18. Chang Raymond, **Química**, sexta ed., Mc Graw Hill, México, 1998.²
19. Silverstein, R.M. y B.C. Clayton , **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 5a ed., Jhon Wily & Sons, USA, 1991.
20. Skoog, Douglas A.; D. M. West y F. J. Holler, **Química Analítica**, 7ª ed., Mc Graw Hill, México, 2001.
21. Skoog, Douglas A.; D. M. West y F. J. Holler. **Principios de análisis instrumental.** 5ª ed., España, Mc Graw Hill, 2001.
22. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. **Guía de validación de métodos analítico.** México, 2002.
23. **Vision 32 software operating manual**, New Cork, ThermoSpectronic, 2000.
24. Hernández Hernández, Angelica C. **Validación de metodologías instrumentales.** México, UNAM, Facultad de Química, 2005. (Trabajo escrito vía cursos de educación continua de Química).
25. **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, 1998.
26. **Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modificada la NOM-073-SSA1-1993, estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996)**, SSA, 2006.
27. **Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, buenas prácticas de fabricación para fármacos**, SSA, 2000.
28. Miller J. N., Millar J.C., **Estadística y quimiometría para química analítica**, 4ta Ed., Prentice Hall, España, 2002.
29. **Vademecum Farmacéutico.** 10a ed., México, Thomson, 2001.

30. Velasco Lozano, Susana. ***Optimización del método para la determinación de ácido ascórbico en jugos procesados utilizando espectrofotometría UV con segunda derivada y su comparación con el método oficial (AOAC).*** México, UNAM, Facultad de Química, 2006. (Tesis de Licenciatura de Química de Alimentos).

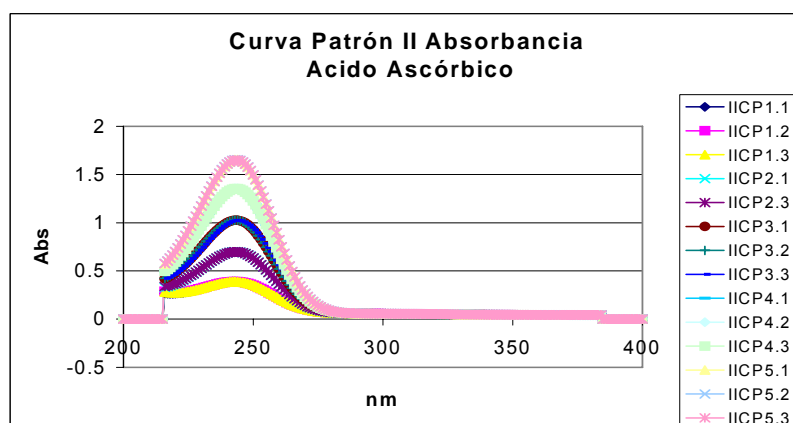
ANEXOS

ANEXO I

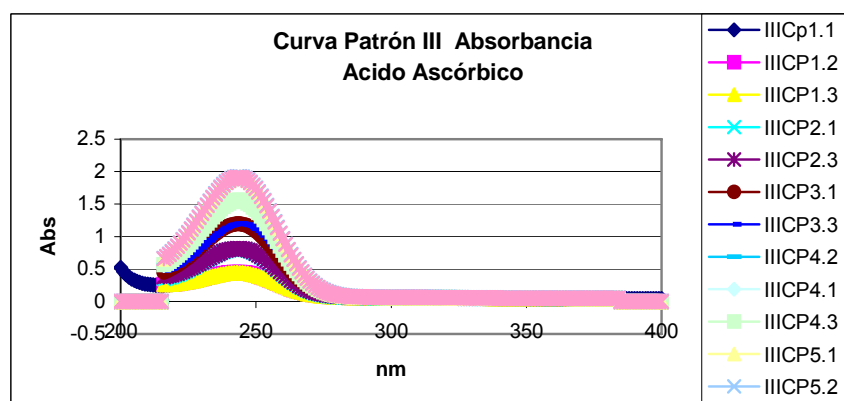
CURVAS PATRÓN I, II, III. Espectros, datos y regresiones lineales.



Espectro I.a Curva patrón I de ácido ascórbico en ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado en nitrógeno por 15 minutos



Espectro I.b Curva patrón II de ácido ascórbico en ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado en nitrógeno por 15 minutos



Espectro I.c Curva patrón III de ácido ascórbico en ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujado en nitrógeno por 15 minutos

[C] (mg/mL)	Abs $\lambda=243\text{nm}$	Muestra	Nombre de muestra
0.005	0.3594	I CP 1.1	Curva Patrón I, dilución 1(0.005mg/mL), lectura 1
0.005	0.3527	I CP 1.2	Curva Patrón I, dilución 1(0.005mg/mL), lectura 2
0.005	0.3539	I CP 1.3	Curva Patrón I, dilución 1(0.005mg/mL), lectura 3
0.01	0.6261	I CP 2.1	Curva Patrón I, dilución 2(0.01mg/mL), lectura 1
0.01	0.6237	I CP 2.2	Curva Patrón I, dilución 2(0.01mg/mL), lectura 2
0.01	0.6266	I CP 2.3	Curva Patrón I, dilución 2(0.01mg/mL), lectura 3
0.015	0.8993	I CP 3.1	Curva Patrón I, dilución 3 0.015mg/mL), lectura 1
0.015	0.8995	I CP 3.2	Curva Patrón I, dilución 3(0.015mg/mL), lectura 2
0.015	0.8964	I CP 3.3	Curva Patrón I, dilución 3(0.015mg/mL), lectura 3
0.02	1.1881	I CP 4.1	Curva Patrón I, dilución 4(0.02mg/mL), lectura 1
0.02	1.1841	I CP 4.2	Curva Patrón I, dilución 4(0.02mg/mL), lectura 2
0.02	1.1837	I CP 4.3	Curva Patrón I, dilución 4(0.02mg/mL), lectura 3
0.025	1.4517	I CP 5.1	Curva Patrón I, dilución 5(0.025mg/mL), lectura 1
0.025	1.45	I CP 5.2	Curva Patrón I, dilución 5(0.025mg/mL), lectura 2
0.025	1.4491	I CP 5.3	Curva Patrón I, dilución 5(0.025mg/mL), lectura 3

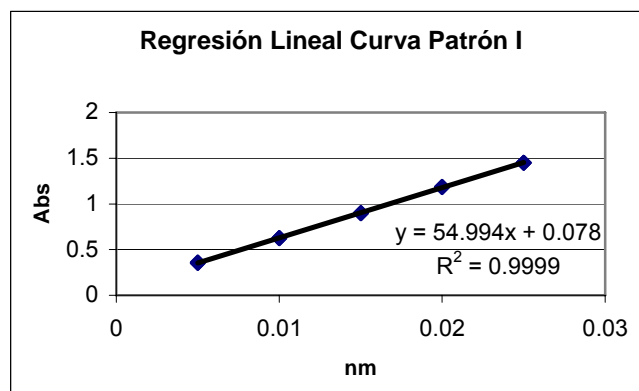
Tabla I.a Concentración, absorbancia, número y nombre de la muestra de ácido ascórbico para Curva Patrón I de ácido ascórbico

[C] (mg/mL)	Abs $\lambda=243\text{nm}$	muestra	Nombre de muestra
0.0058	0.3895	II CP 1.1	Curva Patrón II, dilución 1(0.0058mg/mL), lectura 1
0.0058	0.3888	II CP 1.2	Curva Patrón II, dilución 1(0.0058mg/mL), lectura 2
0.0058	0.3894	II CP 1.3	Curva Patrón II, dilución 1(0.0058mg/mL), lectura 3
0.0117	0.6998	II CP 2.1	Curva Patrón II, dilución 2(0.0117mg/mL), lectura 1
0.0117	0.6991	II CP 2.2	Curva Patrón II, dilución 2(0.0117mg/mL), lectura 2
0.0117	0.6986	II CP 2.3	Curva Patrón II, dilución 2(0.0117mg/mL), lectura 3
0.0175	1.0254	II CP 3.1	Curva Patrón II, dilución 3 0.0175mg/mL), lectura 1
0.0175	1.0253	II CP 3.2	Curva Patrón II, dilución 3(0.0175mg/mL), lectura 2
0.0175	1.023	II CP 3.3	Curva Patrón II, dilución 3(0.0175mg/mL), lectura 3
0.0233	1.3563	II CP 4.1	Curva Patrón II, dilución 4(0.023mg/mL), lectura 1
0.0233	1.3559	II CP 4.2	Curva Patrón II, dilución 4(0.023mg/mL), lectura 2
0.0233	1.3523	II CP 4.3	Curva Patrón II, dilución 4(0.023mg/mL), lectura 3
0.0292	1.6544	II CP 5.1	Curva Patrón II, dilución 5(0.029mg/mL), lectura 1
0.0292	1.6533	II CP 5.2	Curva Patrón II, dilución 5(0.029mg/mL), lectura 2
0.0292	1.6507	II CP 5.3	Curva Patrón III, dilución 5(0.029mg/mL), lectura 3

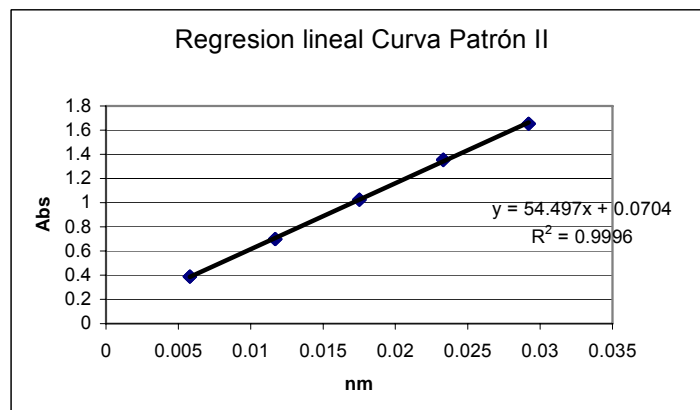
Tabla I.b Concentración, absorbancia, número y nombre de la muestra de ácido ascórbico para Curva Patrón II de ácido ascórbico

[C] (mg/mL)	Abs $\lambda=243\text{nm}$	Muestra	Nombre de muestra
0.0067	0.4453	III CP 1.1	Curva Patrón III, dilución 1(0.0067mg/mL), lectura 1
0.0067	0.4466	III CP 1.2	Curva Patrón III, dilución 1(0.0067mg/mL), lectura 2
0.0067	0.4438	III CP 1.3	Curva Patrón III, dilución 1(0.0067mg/mL), lectura 3
0.0135	0.8109	III CP 2.1	Curva Patrón III, dilución 2(0.0135mg/mL), lectura 1
0.0135	0.8103	III CP 2.2	Curva Patrón III, dilución 2(0.0135mg/mL), lectura 2
0.0135	0.8171	III CP 2.3	Curva Patrón III, dilución 2(0.0135mg/mL), lectura 3
0.0203	1.195	III CP 3.1	Curva Patrón III, dilución 3(0.0203mg/mL), lectura 1
0.0203	1.199	III CP 3.2	Curva Patrón III, dilución 3(0.0203mg/mL), lectura 2
0.0203	1.1996	III CP 3.3	Curva Patrón III, dilución 3(0.0203mg/mL), lectura 3
0.027	1.5589	III CP 4.1	Curva Patrón III, dilución 4(0.027mg/mL), lectura 1
0.027	1.5592	III CP 4.2	Curva Patrón III, dilución 4(0.027mg/mL), lectura 2
0.027	1.5588	III CP 4.3	Curva Patrón III, dilución 4(0.027mg/mL), lectura 3
0.0338	1.9157	III CP 5.1	Curva Patrón III, dilución 5(0.0338mg/mL), lectura 1
0.0338	1.9247	III CP 5.2	Curva Patrón III, dilución 5(0.0338mg/mL), lectura 2
0.0338	1.914	III CP 5.3	Curva Patrón III, dilución 5(0.0338mg/mL), lectura 3

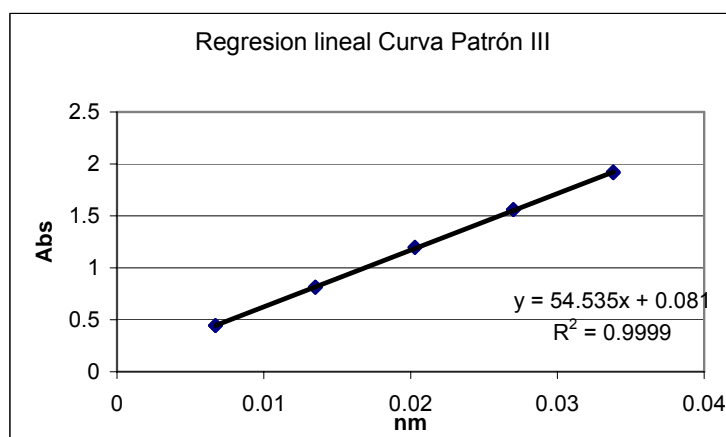
Tabla I.c Concentración, absorbancia, número y nombre de la muestra de ácido ascórbico para Curva Patrón III de ácido ascórbico



Gráfica I.a Regresión lineal de la curva patrón I



Gráfica I.b Regresión lineal de la curva patrón II



Gráfica I.c Regresión lineal de la curva patrón III

ANEXO II

LINEALIDAD DEL SISTEMA. Datos estadísticos.

Xi = Conc. (mg/mL)	Yi = Abs SD	Xi²	Yi²	Xi*Yi
0	0	0.0000E+00	0.0000E+00	0.0000E+00
0	0	0.0000E+00	0.0000E+00	0.0000E+00
0	0	0.0000E+00	0.0000E+00	0.0000E+00
0.00696	0.4606	4.8442E-05	2.1215E-01	3.2058E-03
0.00696	0.4614	4.8442E-05	2.1289E-01	3.2113E-03
0.00696	0.4664	4.8442E-05	2.1753E-01	3.2461E-03
0.00696	0.4425	4.8442E-05	1.9581E-01	3.0798E-03
0.00696	0.4401	4.8442E-05	1.9369E-01	3.0631E-03
0.00696	0.4353	4.8442E-05	1.8949E-01	3.0297E-03
0.01392	0.8221	1.9377E-04	6.7585E-01	1.1444E-02
0.01392	0.8172	1.9377E-04	6.6782E-01	1.1375E-02
0.01392	0.8138	1.9377E-04	6.6227E-01	1.1328E-02
0.01392	0.8137	1.9377E-04	6.6211E-01	1.1327E-02
0.01392	0.8083	1.9377E-04	6.5335E-01	1.1252E-02
0.01392	0.8067	1.9377E-04	6.5076E-01	1.1229E-02
0.02088	1.1855	4.3597E-04	1.4054E+00	2.4753E-02
0.02088	1.1638	4.3597E-04	1.3544E+00	2.4300E-02
0.02088	1.1584	4.3597E-04	1.3419E+00	2.4187E-02
0.02088	1.15	4.3597E-04	1.3225E+00	2.4012E-02
0.02088	1.1455	4.3597E-04	1.3122E+00	2.3918E-02
0.02088	1.14	4.3597E-04	1.2996E+00	2.3803E-02
0.02784	1.5703	7.7507E-04	2.4658E+00	4.3717E-02
0.02784	1.5752	7.7507E-04	2.4813E+00	4.3854E-02
0.02784	1.5711	7.7507E-04	2.4684E+00	4.3739E-02
0.02784	1.5712	7.7507E-04	2.4687E+00	4.3742E-02
0.02784	1.5683	7.7507E-04	2.4596E+00	4.3661E-02
0.02784	1.5654	7.7507E-04	2.4505E+00	4.3581E-02
0.0348	1.9281	1.2110E-03	3.7176E+00	6.7098E-02
0.0348	1.9331	1.2110E-03	3.7369E+00	6.7272E-02
0.0348	1.9304	1.2110E-03	3.7264E+00	6.7178E-02
0.0348	1.9288	1.2110E-03	3.7203E+00	6.7122E-02
0.0348	1.9267	1.2110E-03	3.7122E+00	6.7049E-02
0.0348	1.9235	1.2110E-03	3.6999E+00	6.6938E-02

Tabla II.a Datos y resultados estadísticos para linealidad de sistema

	B =	0.0002
Ho -->	B = β ,	Donde $\beta = 0$
H1 -->	B diferente β	

Suma Xi =	0.62640
Suma Yi =	35.52340
Suma (Xi ²) =	0.01599
Suma (Yi ²) =	50.33706
Suma(Xi*Yi)=	0.89672
(Suma Xi) ² =	0.39238
(Suma Yi) ² =	1261.91195
media Xi =	0.01898
n =	30
g.l. =	28
(n-2)*n =	840
N*media =	0.56945
(n*media) ² =	3.2428E-01
t tablas =	2.36845
Sxx =	0.08719
Syy =	248.19976
Sxy =	4.64962
Se =	1.7633E-02
t calculada =	10.1095
Ordenada =	0.0707
Pendiente =	53.32

Conclusión =	0
0 =	RechazoHo
1 =	Acepto Ho

I.C. para b al 95% significancia

I. Superior de confianza =	0.08726
I. Inferior de confianza =	0.05414

95%

I.C. para la pendiente al significancia

I. Superior de confianza =	54.0946
I. Inferior de confianza =	52.5454

1	2	3	4	5	6	7
ttablas * Se	(n*media) ²	Sxx+2	n*Sxx	3entre 4	raíz 5	6*Se
4.1763E-02	0.32427848	0.41147	2.6158464	0.15730028	0.39661099	6.9934E-03

8	9	10
7*ttablas	8+ord	8-ord
1.6564E-02	0.08726	-0.05414

Tabla II.b Datos y resultados estadísticos para linealidad de sistema

ANEXO III

PRECISIÓN DE SISTEMA. Datos estadísticos.

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$
1.1	1.1725
1.2	1.1732
1.3	1.1738
1.4	1.1739
1.5	1.1728
2.1	1.1682
2.2	1.1746
2.3	1.1669
2.4	1.1732
2.5	1.1697
3.1	1.1682
3.2	1.1651
3.3	1.1677
3.4	1.1625
3.5	1.1702
4.1	1.1695
4.2	1.1682
4.3	1.1671

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$
4.4	1.1693
4.5	1.1701
5.1	1.1656
5.2	1.1659
5.3	1.1679
5.4	1.1681
5.5	1.1673
6.1	1.1701
6.2	1.1704
6.3	1.1695
6.4	1.1702
6.5	1.1699
7.1	1.1727
7.2	1.1751
7.3	1.1687
7.4	1.1721
7.5	1.1691

Tabla III.a Resultados para prueba de precisión de sistema

n =	35
Media =	1.16969429
s exp =	0.00291264
s ² exp =	8.4835E-06
% CV exp =	0.24900901
% CV teórico =	5
s teórica =	0.05848471
s ² teórica =	0.00342046

n =	35
Media =	1.16969429
s exp =	0.00291264
s ² exp =	8.4835E-06
% CV exp =	0.24900901
% CV teórico =	1
s teórica =	0.01169694
s ² teórica =	0.00013682

Tabla III.b Valores estadísticos para la prueba de precisión de sistema

Ho -->	$s^2 = s^2$	donde s^2 (5% del C.V)
Hi -->	s^2 diferente de s^2	

$\chi^2(0.05, n-1)$	
=	48.6023563
χ^2 cal =	0.08432746

Conclusión =	1
--------------	---

1 =	Aceptar Ho
0 =	RechazoHo

I.C. para s^2 al 95% significancia	
I. Superior de confianza =	5.55×10^{-6}
I. Inferior de confianza =	1.46×10^{-5}

I.C. para s al 95% significancia	
I. Superior de confianza =	2.35×10^{-3}
I. Inferior de confianza =	3.81×10^{-3}

Tabla III.c Valores estadísticos para la prueba de precisión de sistema

Ho -->	$s_2 = s_2$	donde s^2 (1% del C.V)
Hi -->	s_2 diferente de s_2	

$\chi^2(0.01, n-1)$	
=	51.1072656
χ^2 cal =	2.10818651

Conclusión=	1
-------------	---

1 =	Aceptar Ho
0 =	RechazoHo

Tabla III.d Valores estadísticos para la prueba de precisión de sistema

$$H_0 \rightarrow s^2 = s_0^2 \quad \text{donde } s_0^2 \text{ (5\% del C.V.)}$$

ANEXO IV

PRECISIÓN DE MÉTODO. REPETIBILIDAD. Resultados y datos estadísticos.

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$	mg/tableta
1.1	1.2326	542.0314
1.2	1.2394	545.2036
1.3	1.2394	545.2036
2.1	1.2221	539.4515
2.2	1.2135	535.4222
2.3	1.2197	538.3270
3.1	1.2527	547.8762
3.2	1.2541	548.5251
3.3	1.2575	550.1011
4.1	1.2159	536.8515
4.2	1.2208	539.1486
4.3	1.224	540.6487
5.1	1.2108	534.5822
5.2	1.2073	532.9411
5.3	1.2083	533.4100

Tabla IV.a Contenido de ácido ascórbico por tableta para prueba de precisión de método. Repetibilidad

N =	15
Media =	542.498062
s exp =	7.97281286
s ² exp =	63.5657449
% CV exp =	1.46964817
% CV teóri =	5
s teórica =	27.1249031
s ² teórica =	735.760369

n =	15
Media =	542.498062
s exp =	7.97281286
s ² exp =	63.5657449
% CV exp =	1.46964817
% CV teóri =	1
s teórica =	5.42498062
s ² teórica =	29.4304147

Tabla IV.b Valores estadísticos para la prueba de precisión del método

Hi -->	s^2 diferente de s^2
--------	--------------------------

χ^2 (0.05,n-1)	
=	23.6847
χ^2 cal =	1.2095

Conclusión =	1
--------------	---

1 =	Aceptar Ho
	Rechazar
0 =	Ho

Tabla IV.c Valores estadísticos para la prueba de precisión del método

χ^2 (0.025,n-1) =	26.1189349
χ^2 (0.975,n-1) =	5.6287238

I. Inferior de confianza =	5.83710972
I. Superior de confianza =	12.5739179

		<σ^2<	
I.C. =	3.41E+01	6.36E+01	1.58E+02

		<S<	
I.C. =	5.83710972	7.97281286	12.5739179

Tabla IV.d Valores estadísticos para la prueba de precisión del método

Ho -->	$s^2 = s^2$	donde s_2 (1% del C.V)
Hi -->	s^2 diferente de s^2	

χ^2 (0.05,n-1)	
=	29.1411
χ^2 cal =	27.0815

Conclusión =	0
--------------	---

1 =	Aceptar Ho
	Rechazar
0 =	Ho

Tabla IV.e Valores estadísticos para la prueba de precisión del método

ANEXO V

PRECISIÓN DE MÉTODO. REPRODUCIBILIDAD. Resultados y datos estadísticos.

Número de Muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$	Abs $\lambda=243\text{nm}$	mg/tabl	mg/tabl
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
1.1	1.1611	1.0547	511.21	461.33
1.2	1.1565	1.055	509.06	461.47
1.3	1.155	1.0551	508.35	461.52
2.1	1.0923	1.006	478.96	438.50
2.2	1.0956	1.0037	480.51	437.42
2.3	1.0952	1.002	480.32	436.62
3.1	1.0338	1.0001	451.53	435.73
3.2	1.0302	0.9978	449.84	434.65
3.3	1.0312	0.9985	450.31	434.98
4.1	1.1405	1.0754	501.56	471.04
4.2	1.1405	1.075	501.56	470.85
4.3	1.1407	1.0741	501.65	470.43
5.1	1.0068	1.0075	438.87	439.20
5.2	1.0102	1.0054	440.47	438.22
5.3	1.0063	1.0059	438.64	438.45

Tabla V.a Absorbancia y contenido de ácido ascórbico por tableta para prueba de precisión de método

REPRODUCIBILIDAD	
ANALISTA 1 y 2	
n1	15
n2	15
n_M (grados de libertad)	14
n_m (grados de libertad)	14
C.V.	5%
MEDIA ANALISTA 1	476.189
MEDIA ANALISTA 2	448.694
VARIANZA ANALISTA 1	812.21
VARIANZA ANALISTA 2	227.50
Fcal	3.570
F tablas	2.484
CONCLUSIÓN	
Fcal > Ftablas por lo que H_0 se rechaza y concluimos	
que la varianza entre el analista 1 y 2 no son iguales	

Tabla V.b Datos Estadístico para reproducibilidad de método sobre las absorbancia dadas por analista 1 y analista 2 Prueba sobre las varianzas

LA PRUEBA DE HIPÓTESIS SOBRE LAS MEDIAS	
n1	15
n2	15
nM	14
Nm	14
C.V.	5%
MEDIA ANALISTA 1	476.189
MEDIA ANALISTA 2	448.694
DESVIACIÓN ESTANDAR ANALISTA 1	28.50
DESVIACIÓN ESTANDAR ANALISTA 2	15.08
tcal	3.30
g.l.(Φ)	21.00
t tablas	2.41
CONCLUSIÓN	
tcal > ttablas, Ho se rechaza por lo tanto las muestras no pertenecen a la misma población	

Tabla V.c Datos Estadístico para reproducibilidad de método sobre las a

ANEXO VI

RECOBRO

Principio activo o excipiente	Porcentaje
Ácido ascórbico	56.8%
Excipiente	c.b.p.

Tabla VI.a Porcentajes de principio activo y excipientes para placebo para recobro

Promedio %Recobro

ecuación: $y = 53.32x + 0.0707$

Número de muestra	Abs $\lambda=243\text{nm}$	(mg/tableta)	%Recobro
1.1	1.2495	538.0653	104.8635
1.2	1.2498	538.2022	104.8902
1.3	1.2501	538.3392	104.9169
2.1	1.2041	529.9831	105.8104
2.2	1.2044	530.1234	105.8384
2.3	1.2012	528.6271	105.5397
3.1	1.2225	541.9380	108.8776
3.2	1.2198	540.6677	108.6223
3.3	1.2135	537.7034	108.0268
4.1	1.2266	536.2260	106.2170
4.2	1.2291	537.3858	106.4467
4.3	1.235	540.1228	106.9889
5.1	1.2231	536.7265	106.7390
5.2	1.2247	537.4717	106.8872
5.3	1.2328	541.2443	107.6375
6.1	1.2055	526.7503	104.4021
6.2	1.2038	525.9612	104.2457
6.3	1.202	525.1257	104.0801
7.1	1.199	527.2828	105.2146
7.2	1.1995	527.5165	105.2612
7.3	1.1986	527.0959	105.1773

Tabla VI.b Cálculo del porcentaje de recobro en tabletas orales de Cevalin

ANEXO VII

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

FEUM		
Número de Muestra	Mg/tab	%ac.ascórb.
1F	521.7531	104.35062
2F	520.146596	104.029319
3F	523.467791	104.693558
4F	453.604656	90.7209312
5F	444.388248	88.8776495
6F	450.659171	90.1318343
7F	452.700663	90.5401325
8F	451.315008	90.2630017
9F	502.461906	100.492381
10F	504.927212	100.985442

Promedio=	482.54
CV=	7.14%

UV		
No Mstra	mg/tab	%ác.ascorb.
1N	503.786549	100.75731
2N	527.540578	105.508116
3N	516.782329	103.356466
4N	559.83738	111.967476
5N	567.308478	113.461696
6N	487.453968	97.4907936
7N	485.91896	97.1837919
8N	566.138194	113.227639
9N	504.007281	100.801456
10N	479.721381	95.9442761

Promedio=	519.85
CV=	6.53%

Tabla VII.a Resultados de ambos métodos. Cuantificación de ácido ascórbico por titulación de 2,6- diclorofenol indofenol (izquierda) y por espectrofotometría ultravioleta (derecha)

COMPARACIÓN MÉTODOS	
FEUM Y UV	
n1	10
n2	10
nM	9
Nm	9
C.V.	5%
MEDIA ANALISTA 1	482.542
MEDIA ANALISTA 2	519.850
VARIANZA ANALISTA 1	1187.03
VARIANZA ANALISTA 2	1153.62
Fcal	1.031
F tablas	3.179
CONCLUSIÓN	
Fcal < Ftablas por lo que Ho se acepta y concluimos que la varianza entre metodologías no son iguales	

Tabla VII.b Datos Estadístico para la comparación de métodos

LA PRUEBA DE HIPÓTESIS SOBRE LAS MEDIAS QUEDARÍA	
n1	10
n2	10
Nm	9
Nm	9
C.V.	5%
MEDIA ANALISTA 1	482.542
MEDIA ANALISTA 2	519.850
DESVIACIÓN ESTÁNDAR ANALISTA 1	34.48
DESVIACIÓN ESTÁNDAR ANALISTA 2	33.96
tcal	-2.43
g.l.(Φ)	9.00
t tablas	2.69
CONCLUSIÓN	
tcal < ttablas, Ho se acepta por lo tanto las muestras pertenecen a la misma población	

Tabla VII.c Datos Estadístico para la comparación de métodos