



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA



**Equivalencia de métodos analíticos utilizados para cuantificar ácido
ascórbico en una matriz de uso farmacéutico.**

TESIS

Para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KARELYM ANGELLI QUINTANA ISLAS

DIRECTOR

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González

ASESOR

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Nezahualcóyotl, Estado de México

04 de Mayo de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue financiado en su totalidad con recursos de la Universidad Nacional Autónoma de México, otorgados a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE200815 “Mejora de la enseñanza y el aprendizaje de la validación de métodos analíticos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores”, por lo que se agradece su apoyo.

INTRODUCCIÓN

Un método analítico engloba tanto a las diferentes técnicas analíticas empleadas como las operaciones implicadas hasta la consecución del resultado final, por lo que para asegurar que cumple con el propósito para el cual fue diseñado debe ser validado. Sin embargo hay ocasiones en las que se desea saber si un método analítico produce resultados semejantes a otro método analítico diferente, lo cual se puede determinar mediante la evaluación de la equivalencia.

La equivalencia de métodos analíticos es usada para demostrar la similitud entre métodos y para probar que el método considerado como nuevo puede generar datos que continúan soportando las especificaciones establecidas previamente. Ya que el ácido ascórbico se ha encontrado en diferentes fuentes naturales y formas farmacéuticas se han diseñado distintos métodos analíticos para cuantificarlo, empleando diferentes técnicas analíticas, no obstante no se ha encontrado, hasta la fecha, documento alguno que indique pueden ser empleados indistintamente, motivo por el cual fue elegido como analito de interés en esta investigación.

Se emplearon técnicas ampliamente documentadas (espectrofotometría UV, cromatografía de líquidos y yodometría) para desarrollar métodos analíticos para cuantificar ácido ascórbico y analizar si entre estos se producían resultados equivalentes, encontrando que la alta sensibilidad de una técnica analítica no siempre es una ventaja y comprobando el por qué las técnicas más sencillas no han logrado ser desplazadas por las técnicas automatizadas y complejas.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1 MARCO TEÓRICO -----	5
1.1 EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	5
1.2 EQUIVALENCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	7
1.3 ÁCIDO ASCÓRBICO	10
1.3.1 USOS -----	10
1.3.2 CARACTERÍSTICAS-----	11
1.3.3 REACCIONES DE DEGRADACIÓN-----	11
1.3.4 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS -----	12
1.3.5 MÉTODOS PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO -----	13
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	14
3 OBJETIVOS -----	15
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
4 HIPÓTESIS -----	15
5 DIAGRAMA DE FLUJO -----	16
6 MATERIAL -----	17
7 METODOLOGÍA -----	19
8 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS -----	21
9 CONCLUSIONES -----	31
10 REFERENCIAS -----	32
ANEXO 1. PROTOCOLOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS -----	35
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	35
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN MÉTODO YODOMÉTRICO.....	39
ANEXO 2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS -----	43
RESULTADOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	43
RESULTADOS DE VALIDACIÓN MÉTODO YODOMÉTRICO.....	45

1 MARCO TEÓRICO

1.1 EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La técnica analítica es la materialización de un principio científico en un instrumento¹, siendo el medio utilizado para llevar a cabo el análisis químico, mientras que el método analítico es un concepto más amplio, pues no solo incluye a la o las técnicas analíticas empleadas en el análisis, sino todas las operaciones implicadas hasta la consecución del resultado final.² En el método analítico se describe la muestra, la sustancia de referencia y la preparación de reactivos, así como uso de equipos y fórmulas para realizar los cálculos, entre otras operaciones.³

Todo método analítico utilizado debe estar evaluado de tal forma se compruebe es apto para el propósito que fue diseñado, esto se logra mediante la validación. Existen varios documentos en los que se indican los parámetros a evaluar durante esta, en México se pueden encontrar en la Guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos o en la Guía técnica de validación de métodos del CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) y existen otros documentos internacionales como la Guía Q2A (R1) Validation of analytical procedures de la ICH (International Conference on Harmonisation). Cabe aclarar que estos documentos únicamente son guías, ya que los parámetros a evaluar durante la validación serán determinados por el objetivo del método analítico. Los parámetros comúnmente evaluados son mencionados a continuación, así como su definición y la comprobación estadística que pueden tener:

- **LINEALIDAD:** Indica la habilidad que tiene un método analítico, en un rango determinado, para obtener resultados (propiedad física o química) que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra³. Para demostrar estadísticamente la linealidad del método se requiere que el coeficiente de determinación (r^2) tenga un valor mayor a 0.98, la ordenada al origen (b) sea estadísticamente igual a cero⁴.

- **PRECISIÓN:** Es el grado de concordancia que hay entre mediciones individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición. Se expresa en términos de coeficiente de variación (c.v)⁴. Se recomienda un c.v menor o igual al 2%.
- **REPETIBILIDAD:** Expresa la precisión que existe bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo³. Se expresa mediante el coeficiente de variación (c.v) y se recomienda que el valor sea menor al 2%.
- **PRECISIÓN INTERMEDIA⁴:** Expresa las variaciones que existen intra-laboratorio como lo pueden ser: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos. Se evalúa construyendo una matriz de tratamiento con los factores evaluados y se plantea el modelo estadístico a emplear, para así elaborar una tabla de ANADEVA y realizar el análisis estadístico por medio del estadígrafo F.
- **EXACTITUD:** Se define como el grado de concordancia entre el valor que es aceptado como verdadero y el valor encontrado³. Se determina obteniendo el porcentaje recuperado en cada muestra esto mediante el cálculo de la concentración real, utilizando de la ecuación de la recta, y la concentración teórica⁴.
- **ESPECIFICIDAD:** Es la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes se espera estén presentes y así proveer un resultado certero que permita indicar el contenido del analito en la muestra³. Se demuestra preparando una muestra que contenga todos los componentes involucrados a excepción del analito de interés y realizando el mismo tratamiento indicado en el método. La respuesta analítica no debe ser igual o cercana a la de una muestra con analito presente.
- **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE ANÁLISIS⁴:** Consiste en determinar las condiciones en las cuales la propiedad medible de la muestra se mantiene constante con respecto al tiempo. Se determina que la muestra es estable si la valoración de las muestras analizadas es estadísticamente similar a la valoración inicial. Se puede determinar mediante la prueba t para dos medias.
- **ROBUSTEZ⁴:** Mide la capacidad del método analítico para permanecer sin alteraciones por efecto de variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los

parámetros del método. Así provee información sobre su confiabilidad durante su uso en condiciones normales. Por lo mencionado anteriormente no tiene un valor predeterminado y se sugiere utilizar modelos experimentales donde se consideren las variaciones planteadas.

El parámetro de robustez en algunas guías se considera dentro de las características a evaluar en la validación, sin embargo en la guía de la ICH no se enlista pero se recomienda sea considerado durante el desarrollo del método analítico.³

Cuando se realizan cambios en los métodos analíticos, se debe comprobar que se sigue cumpliendo con el propósito del diseño original, por lo que se debe validar el método de nuevo. Sin embargo, hay algunos cambios que pueden ser evaluados mediante el análisis de una serie de resultados específicos y así demostrar que el nuevo método produce resultados equivalentes a aquellos producidos por el anterior, denominándose equivalencia de métodos analíticos.

1.2 EQUIVALENCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La equivalencia entre métodos analíticos demuestra la similitud entre métodos, y es usada para probar que el método considerado como nuevo puede generar datos que continúan soportando las especificaciones establecidas previamente. Se debe tener claro no es lo mismo equivalencia analítica que comparación, para realizar la comparación se analizarían similitudes y diferencias, y se evaluaría el perfil completo del método y no sólo una serie de resultados como en la equivalencia analítica. Tampoco se debe asumir que la equivalencia analítica es igual a la validación; la validación determina la calidad de un solo método analítico, además no está diseñada para detectar si existen diferencias y la equivalencia analítica demuestra la similitud entre varios métodos analíticos. El estudio de equivalencia puede realizarse cuando se desea saber si hay un riesgo significativo de obtener resultados diferentes a partir de que se realizan modificaciones o alteraciones en un método analítico, algunos ejemplos de situaciones en las que se evalúa la equivalencia son: cuando la tendencia

en un proceso es importante, si se desea comparar métodos compendiales y más frecuentemente en la fase 3 durante el registro de un fármaco o después del registro, cuando es importante entender cómo los cambios analíticos pueden afectar los resultados.⁵ Este último caso se podría confundir con los parámetros de validación de robustez y tolerancia, sin embargo, estos parámetros son evaluados dentro de la validación y la equivalencia no es un parámetro de validación.

Cuando se evalúe la equivalencia entre métodos se debe realizar con una muestra homogénea, ya que de no ser así no se podría distinguir entre la variabilidad del método y la variabilidad de la muestra.⁵

No existe algún documento donde se indique exactamente los parámetros a evaluar durante la determinación de equivalencia analítica o los criterios de aceptación y rechazo de la misma, por lo que estos criterios se determinan de acuerdo con las necesidades del analista, ya que pueden ser tan estrechos o tan amplios de acuerdo con lo que se necesite o lo que se desee lograr.⁵ Se recomienda que antes de diseñar un estudio de equivalencia analítica se elija un criterio de aceptación adecuado entre el método original y el nuevo método a probar, establecer el valor de la diferencia de medias o la tendencia entre métodos que se consideran importantes y tomar en cuenta la proximidad del proceso a cualquier especificación relevante y cualquier riesgo de clasificación errónea que pueda alcanzar. Una vez establecido el criterio de aceptación se pueden diseñar los otros aspectos del estudio, tales como tamaño de muestra, materiales, la inclusión de cualquier factor que puede ser diferente en el método original y el nuevo método y factores que puedan causar ruido, con la finalidad de asegurar su efectividad. Tanto el criterio de aceptación como el diseño del estudio ayudarán a determinar el número de replicas requeridas para cada conjunto de datos.⁶

La demostración de la equivalencia analítica no debe comenzar hasta que la validez de los datos se ha confirmado, como la evaluación de los valores extremos, la normalidad y la comparación de varianzas.⁶

Existen diferentes modelos estadísticos que pueden emplearse para el análisis de la equivalencia analítica, entre ellos podemos encontrar: el estadígrafo de contraste t de student, intervalo de Westlake, modelo de Bland-Altman, estimación del error estándar, por mencionar algunos, escogiendo el que mejor se ajuste al modelo planteado.⁷

Otra posible alternativa para el análisis estadístico es la prueba bilateral de Schuirmann (Schuirmann's two one sided tests; en inglés ó TOST de Schuirmann, abreviado) el cual proporciona datos más sólidos para la determinación de equivalencia. Esta evaluación toma en cuenta tanto los aspectos estadísticos como los aspectos prácticos para establecer la equivalencia entre métodos.⁶

La prueba bilateral de Schuirmann ha sido utilizada para evaluar la equivalencia en diferentes situaciones como: la transferencia de un método analítico, para comparar un método de cuantificación histórico que se desea reemplazar por un nuevo método, y la implementación de un método por HPLC, comparándolo con el existente.⁶ En los diferentes casos el estadígrafo no tuvo limitaciones como las que presenta el estadígrafo de contraste T de student, el cual sirve para determinar si existe diferencia entre poblaciones y no si son similares⁵.

El cálculo se realiza mediante la construcción de un intervalo de confianza mostrándose a continuación⁸:

$$TL = \frac{(\bar{x} - \bar{y}) - \theta_L}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}\right)}} \quad TU = \frac{(\bar{x} - \bar{y}) - \theta_U}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}\right)}}$$

Ecuación 1 y2. Cálculo de los valores de TL y TU para establecer los límites de la equivalencia.

Donde T_L y T_U representa el valor obtenido para el límite inferior y superior de la prueba unilateral, \bar{x} , \bar{y} expresa el valor de las medias para cada muestra, n_x y n_y representa el tamaño de cada una de las muestras y S_p expresa la desviación con respecto a los valores promedio, la cual se obtiene su valor de la siguiente forma⁹:

$$S_p = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2 + \sum(y - \bar{y})^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Ecuación 3. Cálculo de la desviación con respecto a los valores promedio.

El ácido ascórbico es un principio activo encontrado en diferentes formas farmacéuticas y fuentes naturales, por tal motivo se han diseñado distintos métodos con diferentes técnicas analíticas para cuantificarlo, sin embargo no se ha encontrado alguna investigación donde se analice si entre los diferentes métodos se producen resultados equivalentes, por este motivo se evaluará la equivalencia entre algunos de los métodos encontrados. Debido a que es el fármaco de interés se deben conocer sus propiedades físicas y químicas, mencionándose a continuación.

1.3 ÁCIDO ASCÓRBICO

1.3.1 USOS

El ácido ascórbico se utiliza para prevenir el escorbuto, una enfermedad provocada por falta de vitamina C (ácido ascórbico) en el organismo, la cual se caracteriza por debilidad, anemia, ulceración de encías y hemorragia en la piel y las mucosas. Puede emplearse para complementar la dieta de personas que necesitan más vitamina C de lo normal, como mujeres embarazadas, niños en etapa de crecimiento y personas que fuman o han sufrido quemaduras, infecciones, enfermedades del intestino u otros tipos de estrés.¹⁰

El ácido ascórbico desempeña varias funciones críticas en la curación de heridas. Estimula la respuesta inflamatoria y mejora la resistencia a la infección al aumentar la actividad de los leucocitos. Tiene un papel en la hidroxilación de los aminoácidos esenciales prolina y lisina, necesarios en la síntesis de colágeno, el cual llena la herida.¹¹

1.3.2 CARACTERÍSTICAS

El ácido ascórbico es una cetolactona de seis carbonos, que está relacionada estructuralmente con la glucosa y otras hexosas. Contiene, además, un átomo de carbono asimétrico, lo que da lugar a la existencia de dos formas ópticamente activas, de las cuales sólo el isómero L tiene actividad biológica en el organismo. Debido a la presencia de un agrupamiento endólico, se oxida de forma reversible a ácido dehidroascórbico, el cual posee actividad completa de vitamina C.¹²

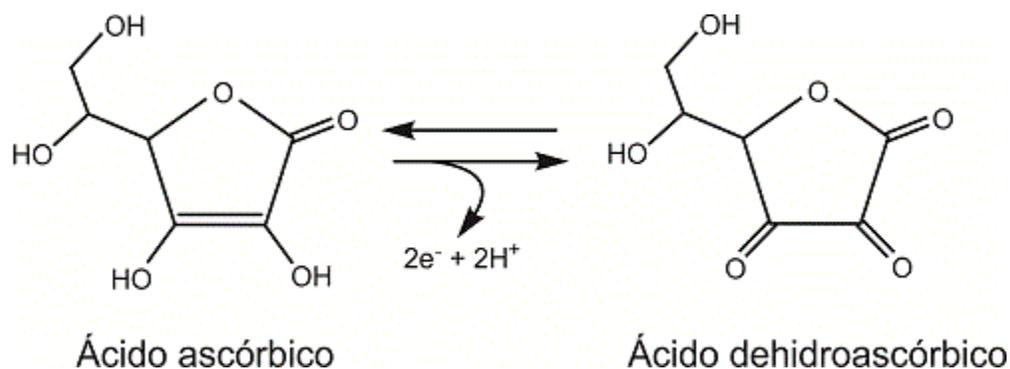


Imagen 1. Estructura de ácido ascórbico¹².

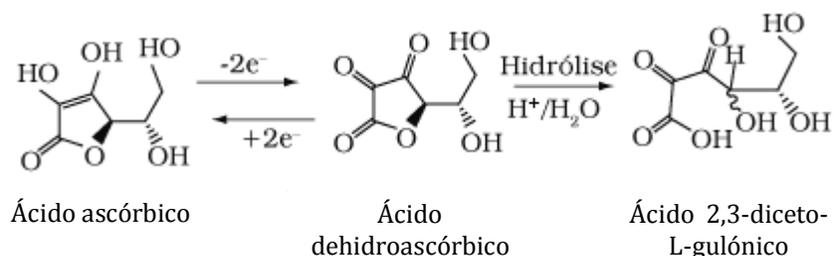
1.3.3 REACCIONES DE DEGRADACIÓN ¹³

El ácido ascórbico es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, la oxidación es dependiente del pH ya que la forma ionizada es más sensible que la no ionizada, el dianión es aún más sensible pero para que se forme en cantidades significativas requiere un pH alcalino.

Inicialmente en la oxidación pasa de ascorbato a dehidroascorbato, en una reacción que es reversible, por lo que el dehidroascorbato mantiene el valor de vitamina C. Sin embargo, la lactona correspondiente al dehidroascorbato es mucho menos estable que la del ascorbato, por lo que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3-dicetogulónico, que posteriormente puede degradarse por descarboxilación. Ni el ácido 2,3-dicetogulónico ni sus productos de degradación tienen ya actividad como

vitamina C. También se puede oxidar en presencia de metales como el hierro o el cobre, que actúan como catalizadores.

El ácido ascórbico puede romperse también en reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido por apertura del anillo lactónico y posterior descarboxilación.



**Imagen 2. Reacciones de degradación del ácido ascórbico.

1.3.4 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS¹⁴

Sinónimos: ácido L-ascórbico, vitamina C, ácido cevitámico.

Fórmula condensada: C₆H₈O₆

Peso molecular: 176.12g/mol

Apariencia: cristales incoloros o blancos o polvo cristalino amarillo pálido. Estable en el aire cuando está seco. En estado impuro y en algunos productos naturales se oxida en exposición al aire y a la luz.

Punto de fusión: 190°-192°, con cierta descomposición.

pK₁=4.17 pK₂=11.57

UVmax= 245nm (solución ácida) UVmax= 265nm (solución neutra)

Solubilidad: 1g se disuelve en 3mL de agua, en 30mL de etanol, 10mL de metanol, y en 20mL de propilenglicol; soluble en acetona, insoluble en benceno, cloroformo, éter, éter de petróleo, aceites, grasas y solventes grasos.

**Imagen extraída de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0101-20612007000400025&script=sci_arttext

1.3.5 MÉTODOS PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico se encuentra en diferentes fuentes, tanto naturales como sintéticas. Pueden encontrarse diferentes formas farmacéuticas como solución inyectable, cápsulas, tabletas, jarabe, tabletas masticables, tabletas efervescentes y gotas de uso oral.⁸ En fuentes naturales; en diferentes concentraciones, como maíz, lechuga, zanahoria, toronja, ajo, lima, papa, plátano, pimienta verde, guayaba, pimienta roja, mango, papaya, tomate, col, zapote.¹⁵

Debido a la diversidad de sus presentaciones varios métodos han sido empleados para cuantificarlo, dentro de las cuales puede mencionarse volumetría de pulso diferencial¹⁶, valoración yodométrica¹⁷, valoración con cloruro férrico¹⁸, espectrometría de infrarrojo cercano (NIR) ¹⁹, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) por fase reversa y par iónico²⁰ y espectrofotometría usando 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol²¹. Cada uno de los métodos mencionados fueron diseñados para cuantificar ácido ascórbico en diferentes matrices, tanto de fuentes naturales como frutas, sumos de frutas e incluso fluidos biológicos, así como formas farmacéuticas, sin embargo hasta el día de hoy no se ha encontrado investigación alguna en la que se indique que los métodos pueden ser empleados de manera indistinta, sin importar la matriz en la que se esté cuantificando.

Realizando un análisis de la aplicabilidad, en este proyecto se emplearon algunas de las técnicas analíticas antes mencionadas para determinar la equivalencia entre métodos analíticos, como cromatografía de líquidos de alta resolución, debido a que hoy día es una técnica ampliamente usada, valoración yodométrica, ya que a pesar de ser una técnica sencilla aún se sigue empleando y evidencia de eso es el hecho de aun ser utilizada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en el control de calidad del ácido ascórbico como materia prima, y espectrofotometría UV, debido a que es una técnica sencilla y de fácil manipulación.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ácido ascórbico es un principio activo encontrado en diferentes formas farmacéuticas y fuentes naturales, por tal motivo se han diseñado distintos métodos con diferentes técnicas analíticas para cuantificarlo, sin embargo algunas de ellas son costosas, complejas y difíciles de manipular. En esta investigación se desarrollaron tres métodos analíticos para cuantificar ácido ascórbico en un gel, utilizando tres técnicas analíticas diferentes (espectrofotometría UV, cromatografía de líquidos de alta resolución-CLAR y volumetría de óxido-reducción) con la finalidad de determinar si existían semejanzas entre los resultados obtenidos a partir de ellos, y en caso de que existieran, asegurar si es que se producían resultados equivalentes, para así tener opciones de elección al momento de realizar el análisis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar si existe equivalencia entre los resultados analíticos obtenidos a partir de la aplicación de tres métodos analíticos; cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría UV y volumetría, utilizados para cuantificar ácido ascórbico en un gel.

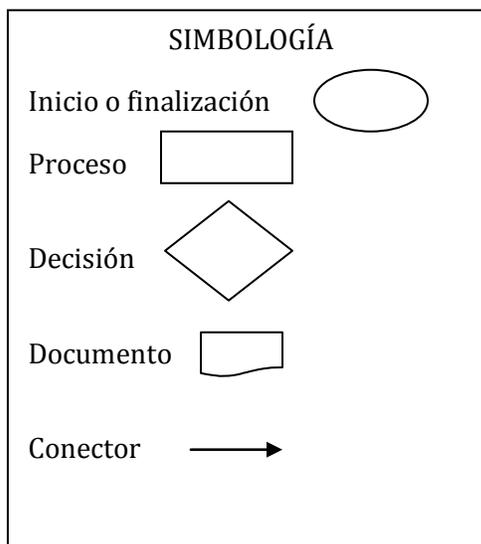
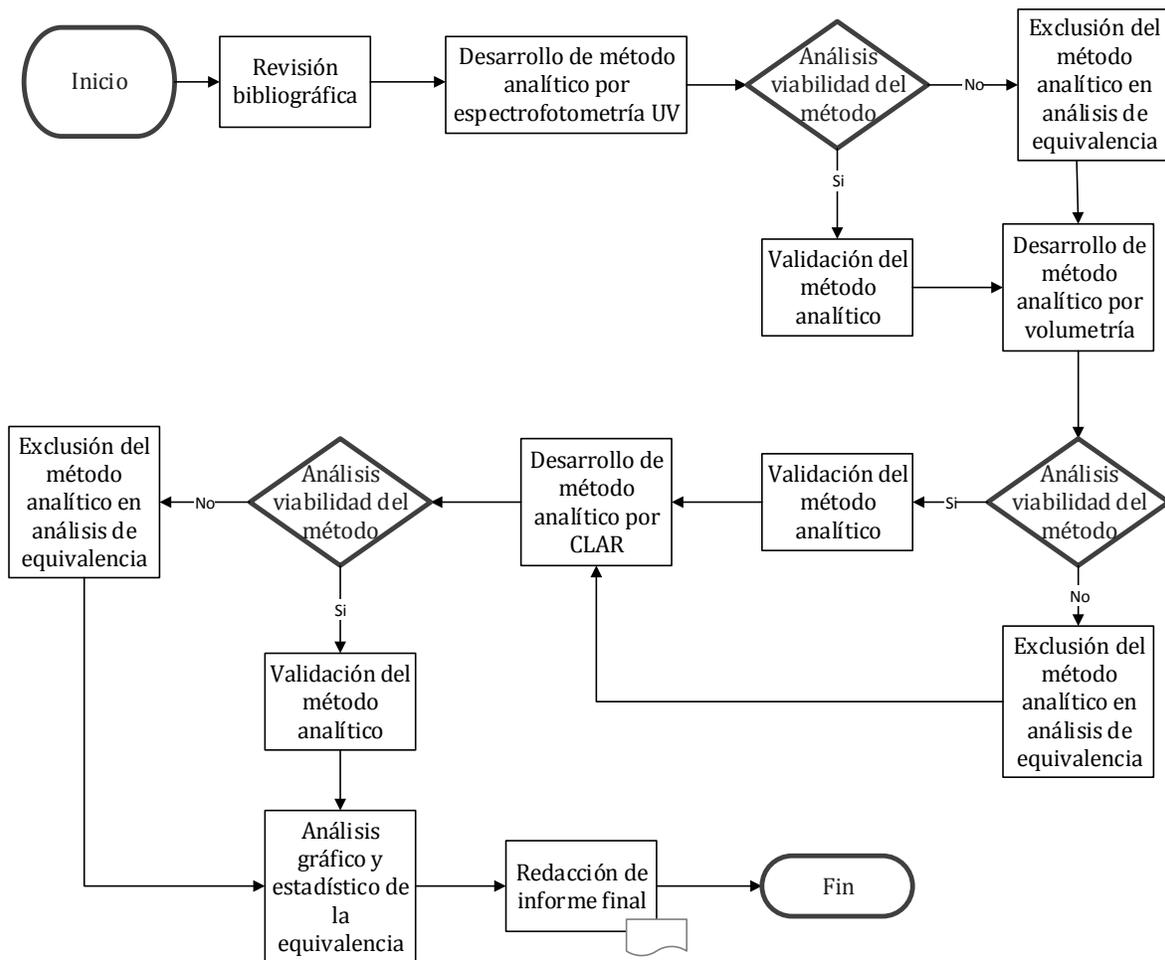
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y validar un método analítico volumétrico para la cuantificación de ácido ascórbico en un gel.
- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico por HPLC en un gel.
- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico por espectrofotometría UV en un gel.
- Analizar los métodos analíticos a partir de los porcentajes de ácido ascórbico contenidos en la matriz.

4 HIPÓTESIS

Los resultados del porcentaje de ácido ascórbico en matriz de gel serán equivalentes entre los tres métodos analíticos aplicados.

5 DIAGRAMA DE FLUJO



6.3 MATERIAL DE VIDRIO

MATERIAL	CAPACIDAD
• Bureta	25ml
• Matraz volumétrico	100ml, 50ml, 25ml, 10ml
• Matraz Erlenmeyer	125ml
• Vaso de precipitados	4000ml, 1000ml, 500ml, 250ml, 150ml
• Pipeta volumétrica	5ml, 4ml, 3ml, 2ml, 1ml
• Pipeta graduada	10ml, 2ml
• Pinzas dobles de presión	n/a
• Soporte universal	n/a

Tabla 3. Lista de material con capacidad empleada. *n/a: no aplica

6.4 COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

MÉTODO ANALÍTICO	Volumetría	Espectrofotometría UV	CLAR
FUNDAMENTO	El ácido ascórbico reacciona con el yodo, cediendo sus electrones al yodo presente formando ácido dehidroascórbico. ²¹	La radiación ultravioleta provoca la excitación de electrones a niveles de energía superior, con lo cual permite relacionar la cantidad del analito presente con la cantidad de radiación absorbida. ²⁰	Es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de ambas fases, móvil y estacionaria.
VARIABLE DE RESPUESTA ANALIZADA	Porcentaje de ácido ascórbico presente en la matriz.		

Tabla 4. Comparativo del fundamento de cada método analítico empleado y la variable de respuesta analizada.

7 METODOLOGÍA ^{3,4}

7.1 Preparación de muestra (gel de ácido ascórbico al 20%).

Se pesaron 50g de matriz, gel, y se le adicionaron 10g de ácido ascórbico, se mezcló hasta observar una mezcla homogénea.

7.2 Desarrollo de método analítico por espectrofotometría UV.

7.2.1 Construcción de la curva patrón

Se preparó una curva patrón con cinco niveles diferentes de concentración, los cuales incluían dos niveles por arriba y dos niveles por debajo de lo considerado el cien por ciento de la concentración. Estos niveles tuvieron concentraciones de 4, 6, 8, 10 y 12µg/ml.

7.2.2 Preparación y análisis de la muestra analítica.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.1 Validación del sistema de método analítico espectrofotométrico.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.2 Validación del método analítico espectrofotométrico.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.3 Desarrollo de método analítico por volumetría.

7.3.1 Construcción de la curva patrón.

Se preparó una curva patrón con cinco niveles de concentración, los cuales tuvieron concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5mg/ml.

7.3.2 Preparación y análisis de la muestra analítica.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.4 Validación del sistema del método analítico volumétrico.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.5 Validación del método de método analítico volumétrico.

Ver ANEXO 1. Protocolos de validación de métodos analíticos.

7.6 Desarrollo de método analítico por HPLC.

7.6.1 Construcción de la curva patrón.

Se preparó una curva con cinco niveles de concentración, teniendo concentraciones de 4, 6, 8, 10 y 12µg/ml.

7.6.2 Se realizaron mediciones con muestras de gel de ácido ascórbico.

7.7 Análisis de los datos ^{5,8}.

7.7.1 Análisis gráfico de diagrama de caja.

Se realizó el análisis de la dispersión de los datos, la variación del método y la distribución de las observaciones, para determinar si existían semejanzas gráficamente.

7.7.2 Análisis de gráfico de tendencia central.

Se analizó la tendencia de los datos haciendo énfasis en el punto de convergencia de ambas poblaciones y así determinar la existencia de semejanzas.

7.7.3 Análisis estadístico.

7.7.3.1 Determinación del estadígrafo a emplear, prueba bilateral de Schuirmann.

7.7.3.2 Planteamiento de hipótesis.

$$H_0: \mu_x - \mu_y \leq \theta_L \text{ ó } \mu_x - \mu_y \geq \theta_U$$

$$H_a: \theta_L < \mu_x - \mu_y < \theta_U$$

Donde θ_L y θ_U representan el valor predefinido para los límites superior e inferior para la equivalencia y $(\mu_x - \mu_y)$ expresa la diferencia de las medias muestrales.

7.7.3.3 Establecimiento de límites de aceptación de la equivalencia.

Se establecieron los límites de acuerdo al objetivo de aplicación de los métodos analíticos diseñados (espectrofotometría UV y yodometría) el cual es ser empleados en control de calidad. El valor establecido fue $\theta = \pm 2\%$.

7.7.3.4 Construcción de intervalo de confianza.

7.7.3.5 Determinación de la equivalencia.

Con los límites determinados y los valores obtenidos para el intervalo de confianza se realizó el análisis para determinar la equivalencia entre los métodos.

8 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se desarrolló un método analítico espectrofotométrico fundamentado en la capacidad del analito, ácido ascórbico, para absorber energía, la cual provoca excitación de los electrones para llevarlos a niveles de energía superior²². Inicialmente se propuso la preparación de las muestras analíticas utilizando como disolvente agua desionizada, sin embargo se observó la falta de precisión en los niveles de concentración planteados (4 a 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$), por lo que se procedió a monitorear la estabilidad de la muestra analítica, enfatizándose la disminución de la precisión en los niveles una hora después de la preparación de la muestra, reflejándose en el aumento del valor del coeficiente de variación, el cual es un estimador de la medida de dispersión de los datos, que ayuda a analizar la precisión.

Transcurridas 24h desde la preparación se realizó un barrido a la muestra de mayor concentración, mostrando la falta de señales por encima del umbral, asumiendo que el analito de interés tuvo una alteración en su estructura, motivo por el cual perdió la característica en la que se fundamenta la espectrofotometría.

Con la información obtenida se planteó emplear ácido clorhídrico 0.1N como disolvente en la preparación de la muestra analítica, preparando una muestra con concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a la cual se le realizó un barrido para determinar la longitud de onda de máxima absorción la cual tuvo un valor de 243nm, siendo próxima a la reportada en la literatura de 245nm¹⁴, y con la finalidad de asegurar la estabilidad de la muestra, al menos durante el tiempo de análisis, se realizó un monitoreo durante 100min observando precisión en las diferentes mediciones realizadas. El método se diseñó planteando concentraciones de 4, 6, 8, 10 y 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el uso de ácido clorhídrico como disolvente. Las concentraciones se establecieron de acuerdo al cumplimiento de la ley de Beer.

Para asegurar que el método establecido cumpliera con el propósito para el cual fue diseñado, el cual es cuantificar ácido ascórbico en un gel, se procedió a realizar

la validación del método analítico en los niveles de sistema y método, determinando los parámetros a evaluar de acuerdo con la Guía Q2A (R1) Validation of analytical procedures de la ICH³, diseñando un protocolo de validación mostrándose en el ANEXO 1 y los resultados obtenidos se pueden observar en el ANEXO 2.

Otro de los métodos desarrollados fundamentado en la capacidad del ácido ascórbico como agente reductor ²³, fue volumetría de óxido-reducción, empleando como agente oxidante al yodo, siendo un método yodométrico, además que esta técnica analítica es referenciada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en el control de calidad para el ácido ascórbico como materia prima¹⁷.

Mencionado anteriormente, la finalidad de la equivalencia entre métodos analíticos es demostrar la producción de resultados similares entre diferentes métodos⁴, sin que existan cambios en la muestra analítica. Fundamentado en esto la muestra se preparó de igual manera que para el método espectrofotométrico, utilizando ácido clorhídrico 0.1N. Los niveles de concentración empleados fueron de 1, 2, 3, 4 y 5mg/ml ya que el método yodométrico es un método con menor sensibilidad, en comparación con el método espectrofotométrico. El método yodométrico fue validado de igual manera que el método espectrofotométrico, mostrándose el protocolo de validación en el ANEXO 1 y los resultados obtenidos en el ANEXO 2.

El tercer método desarrollado fue por medio de cromatografía de líquidos en fase reversa, la cual se fundamenta principalmente en la polaridad. Se desarrolló empleando una fase móvil de ácido fosfórico 10⁻³M: metanol (70:30), un flujo de 2ml/min, $\lambda=215\text{nm}$ y una columna phenomenex luna C18 150 x 4.60mm. Debido a que es un método con alta sensibilidad se observó similitud de los tiempos de retención del analito de interés y de la matriz farmacéutica, lo cual se puede observar claramente en los cromatogramas de cada uno de estos (imagen 2 y 3).

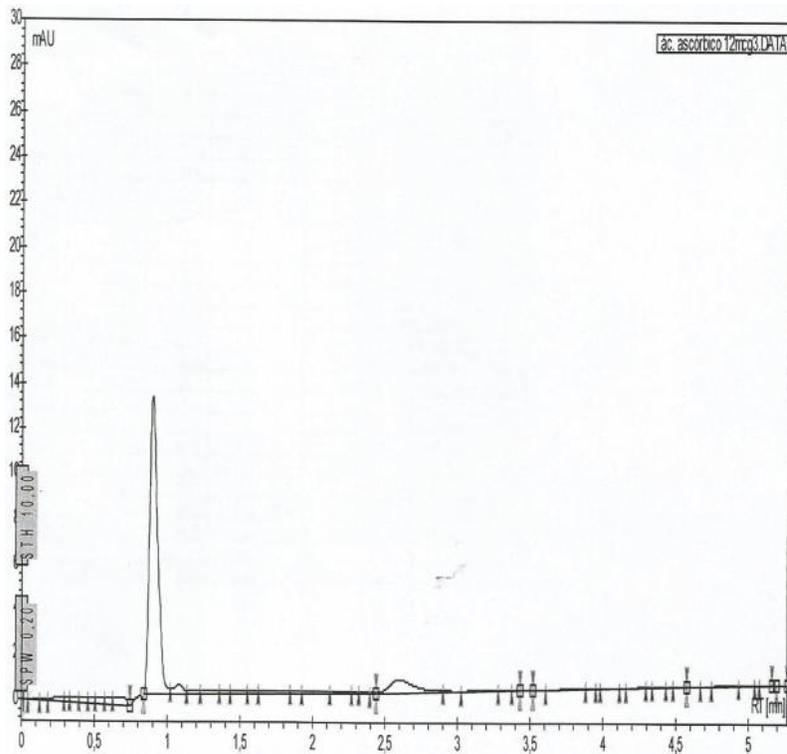


Imagen2. Cromatograma de ácido ascórbico 12µg/ml.

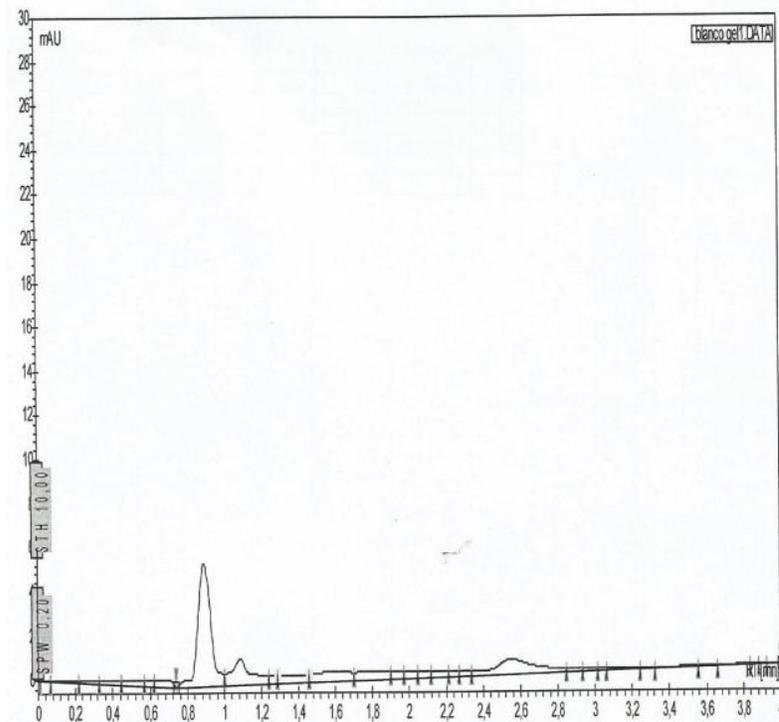


Imagen3. Cromatograma de matriz farmacéutica.

Tras realizar distintas modificaciones tanto en la proporción de la fase móvil como en la velocidad de flujo, se continuó observando interferencia de la matriz, por lo que el método cromatográfico se descartó para formar parte del estudio de equivalencia y únicamente se analizaron el método yodométrico y espectrofotométrico.

El análisis se realizó empleando los porcentajes de recobro obtenidos para cada método, en el nivel considerado el cien por ciento. Con la finalidad de tener una representación gráfica y así analizar visualmente si existen semejanzas o diferencias entre las diferentes muestras ²⁴, se empleó el diagrama de caja y bigote y el gráfico de frecuencia.

MÉTODO 1 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	MÉTODO 2 MÉTODO YODOMÉTRICO
107.50	100.22
109.11	100.22
105.84	104.62
105.38	104.62
106.61	103.52
105.38	103.52

Tabla 5. Porcentajes de recobro para método yodométrico y espectrofotométrico, para el nivel de 100% de concentración.

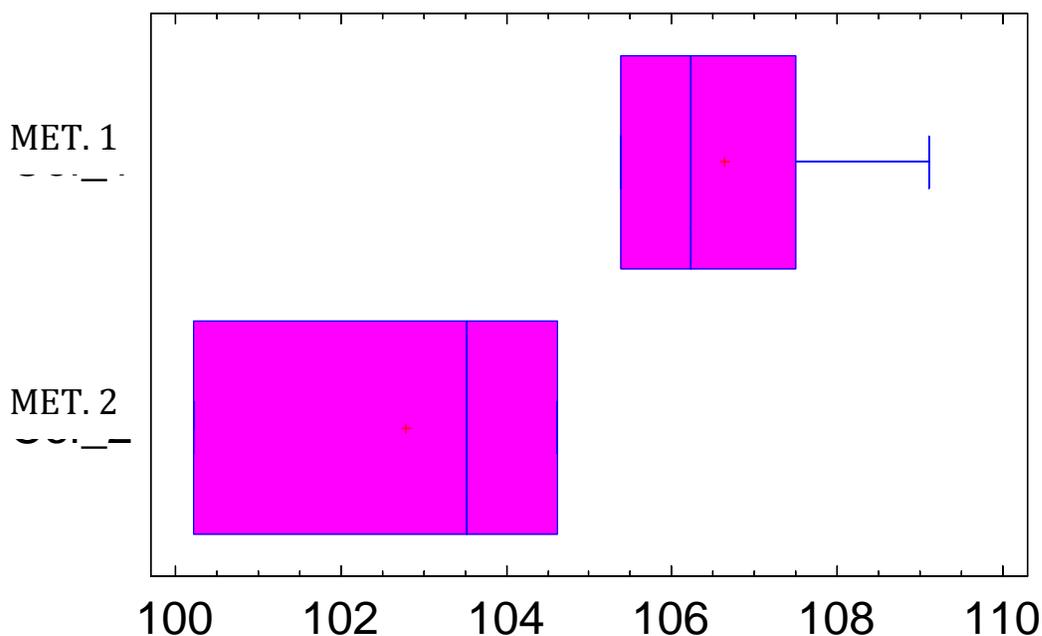


Imagen 4. Diagrama de caja y bigote para método1 (MET.1) y método 2(MET. 2).

Los diagramas de caja obtenidos para cada método (imagen 4) muestran que las cajas, las cuales representan la dispersión de los datos, se encuentran lejanas entre si y tienen distribuciones diferentes, por lo que visualmente no hay semejanzas entre los métodos. En el diagrama de caja obtenido para el método espectrofotométrico (método1) se observa que el porcentaje de recobro de la población entre el 50% y 75% presenta una mayor dispersión, comparado con el segmento que describe al 25% y 50%. El tamaño del bigote nos indica la variación que existe en el método, por lo que la ausencia de bigote en el límite inferior indica que no hay variación en el 25% de las mediciones que se encuentran por debajo de la mediana, a diferencia de las mediciones que se encuentran por arriba del valor de la mediana, donde existe una variación mayor.

En contraste, en el diagrama de caja obtenido para el método yodométrico (método2) se observa una mayor dispersión de los datos obtenidos entre el 25% y 50% de las mediciones, en comparación con la población encontrada en el 50% y 75%. En el diagrama no se observan, en ninguno de los extremos, las líneas que simulan el bigote, por lo que no hay variación en el 25% de la población que se encuentra por debajo de la mediana, ni en el 25% de la población encontrada por arriba del valor de la mediana.

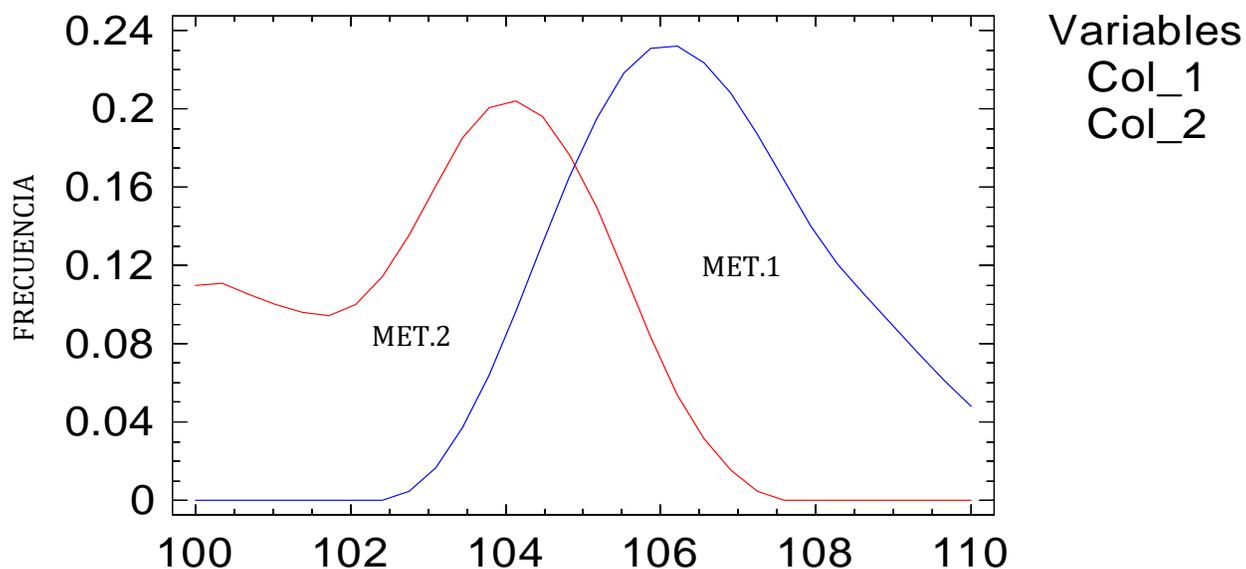


Imagen 5. Gráfico de frecuencia de los datos para método 1 y método 2.

El gráfico de frecuencia nos muestra el punto de inflexión donde convergen los métodos, el cual se observa (imagen 5) próximo al centro de cada una de las campanas de frecuencia de los datos, punto donde se grafica las medias, por lo que se podría asumir existe una similitud entre la respuesta obtenida por cada método²⁵.

Ya que los gráficos obtenidos no brindan datos precisos sobre si existen o no semejanzas entre los métodos, se llevó a cabo el análisis de la equivalencia estadísticamente. Se realizó el cálculo del intervalo de confianza con un 95% de confianza, obteniendo el siguiente resultado⁸:

$$I. C: 5.2220\% - 2.4703\%$$

El resultado del análisis muestra que el valor de $\theta = \pm 2\%$ no se encuentra dentro del intervalo de confianza calculado, por lo que se confirma la falta de semejanzas entre los métodos analizados y, por lo tanto, la no equivalencia. El resultado no favorable de la equivalencia se debe a la diferencia en la respuesta analítica de cada uno de los métodos empleados y no a la técnica analítica empleada, comprobando así que el hecho de que un método analítico este validado no indica que produzca resultados equivalentes a otro método analítico validado.

A pesar de haber obtenido un resultado no favorable hacía la equivalencia entre los métodos analíticos, cabe resaltar ciertos puntos importantes encontrados durante esta investigación. Hoy día diversos métodos analíticos son desarrollados por medio de cromatografía de líquidos, debido a su elevada sensibilidad, sin embargo no todas las ocasiones la sensibilidad es una ventaja, como lo fue este, ya que se observó interferencia de la matriz farmacéutica empleada, por lo que se descartó ese método analítico. Además, con la finalidad de realizar un análisis sobre la aplicabilidad de cada uno de estos métodos, se realizó un análisis de costos (tabla 5), donde se mostró que para implementar un método analítico por cromatografía se requiere de una inversión elevada, comparada con los otros dos métodos analizados, y no todas las ocasiones se cuenta con un presupuesto que logre cubrir la implementación, el mantenimiento, confinación de desechos y demás gastos involucrados en este tipo de técnicas.

El método yodométrico requiere de una menor inversión para su implementación, el mantenimiento se podría considerar menor, ya que los reactivos empleados se emplean en bajas cantidades, sin embargo es un método laborioso en cuestión a la preparación de reactivos y a la estabilidad de estos, ya que la solución de yodo es poco estable y se debe mantener en todo momento en las condiciones establecidas de almacenamiento, además que debe ser estandarizado en todas las ocasiones que se emplea. La respuesta analítica obtenida por este método fue la deseada, no se observó interferencia de la matriz o de algún producto de degradación y mostró relación lineal entre la concentración y la propiedad química analizada⁴. Este método analítico presento una menor variación, lo cual se puede observar en la imagen 4, con lo cual se puede asumir que en el método existe una mayor precisión, pero también se observa una menor exactitud, lo cual se comprueba en los datos obtenidos durante la validación.

El método espectrofotométrico fue específico para el analito de interés, pero no mostró capacidad de dar respuesta proporcional a la cantidad de muestra adicionada²⁶, pudiendo deberse a que el método de extracción empleado no sea el adecuado para la matriz utilizada, por lo que en algunas ocasiones se extrajeron concentraciones menores al 100%, además se observó una mayor variación del método por lo que se asume presenta poca precisión, lo que podría ocasionar una sobreestimación durante la cuantificación. Este método, comparado con los otros dos mencionados anteriormente, tiene un costo de implementación intermedio, su costo se incrementa debido a la necesidad de un equipo para brindar la respuesta analítica y de celdas especiales para realizar el análisis, sin embargo es de fácil manipulación y solo requiere la preparación de una solución, lo que se vuelve más sencillo conforme se va adquiriendo pericia analítica.

MÉTODO 1 ESPECTROFOTOMÉTRICO		MÉTODO 2 YODOMÉTRICO		MÉTODO 3 CROMATOGRÁFICO	
DESCRIPCIÓN	COSTO	DESCRIPCIÓN	COSTO	DESCRIPCIÓN	COSTO
Espectrofotómetro UV/Vis Varian modelo Cary 50, con monocromador Czemy-Tumer de 0.25m, rango de longitud de onda, ancho de banda espectral fijo de 1.5nm, lámpara pulsada de xenón de larga duración, óptica recubierta de cuarzo, velocidad máxima de barrido 24000nm/min, inmune a la luz externa. Software WinUV Bio	\$9478,3 ⁷	Bicarbonato de sodio, marca J.T Baker 500gr.	\$565,39 ⁴	Software primade de Hitachi	\$20375,9 ³
		Hidróxido de sodio lentejas, marca J.T Baker 500gr.	\$271,17 ⁴	Sistema Dell de manejo de datos que incluye: CPU, monitor pantalla plana de 15", impresora.	\$16914,7 ³
		Yodo, marca Meyer 50gr.	\$394,4 ⁴	Cable USB	\$292,49 ³
		Almidón soluble, marca Meyer 100gr.	\$241,16 ⁴	Kit de jeringa de 1.0ml marca Hitachi	\$15080 ³
		Ácido clorhídrico, marca Fermont 1000ml	\$103,36 ⁴	Bomba 1110 primade modo isocrático marca Hitachi. Tipo de bomba: sistema de eliminación de pulsaciones. Rango de flujo: 0.001 a 9.999ml/min	\$7203,6 ³
Par de celdas de cuarzo c/2pzs. de 1cm de paso, marca Baus	\$10994,8 ²	Yoduro de potasio granular, marca Baker 100gr.	\$834,04 ²	Detector UV 1310 primaide	\$6670 ³
Pipeta volumétrica de 1ml, marca KIMAX	\$100,98 ¹	Yoduro mercúrico rojo polvo, marca Baker 125gr.	\$7274,36 ²	Organizador de botellas de solventes y administrador de energía priamaide Hitachi	\$32448,3 ³
Pipeta volumétrica de 2ml, marca KIMAX	\$132,36 ¹	Bureta con llave de teflón capacidad 25mL, marca KIMAX	\$1531,56 ¹	Viales de vidrio transparente de 2ml con tapa de rosca de 8mm. Paquete con 100pzs	\$805,06 ⁶
Pipeta volumétrica de 3ml, marca KIMAX	\$138,38 ¹	Pipeta volumétrica de 1ml, marca KIMAX	\$100,98 ¹	Columna phenomenex modelo luna 5u C18 150x4.6mm	\$9674,12 ⁵

Pipeta volumétrica de 5ml, marca KIMAX	\$140,37 ¹	Pipeta volumétrica de 2ml, marca KIMAX	\$132,36 ¹	Sistema completo de filtración con membrana de 47mm de diámetro	\$4760,64 ⁴
Vaso de precipitados de 4000ml, marca KIMAX	\$1048,96 ¹	Pipeta volumétrica de 3ml, marca KIMAX	\$138,38 ¹	Metanol grado HPLC J.T. Baker 4L	\$586,23 ⁴
Vaso de precipitados de 250ml, marca KIMAX	\$63,76 ¹	Pipeta volumétrica de 4ml, marca KIMAX	\$143,82 ¹	Ácido clorhídrico, marca Fermont 1000ml	\$103,36 ⁴
Ácido clorhídrico, marca Fermont 1000ml	\$103,36 ⁴	Pipeta volumétrica de 5ml, marca KIMAX	\$140,37 ¹	Pipeta volumétrica de 1ml, marca KIMAX	\$100,98 ¹
Matraz volumétrico de 100ml, marca KIMAX	\$367,72 ²	Matraz Erlenmeyer capacidad 125ml, marca KIMAX	\$76,04 ¹	Pipeta volumétrica de 2ml, marca KIMAX	\$132,36 ¹
Matraz volumétrico de 50ml, marca KIMAX	\$358,44 ²	Vaso de precipitados de 250ml, marca KIMAX	\$63,76 ¹	Pipeta volumétrica de 3ml, marca KIMAX	\$138,38 ¹
Matraz volumétrico de 25ml, marca KIMAX	\$323,64 ²	Vaso de precipitados de 150ml, marca KIMAX	\$53,81 ¹	Pipeta volumétrica de 4ml, marca KIMAX	\$143,82 ¹
		Matraz volumétrico de 100ml, marca KIMAX	\$367,72 ²	Pipeta volumétrica de 5ml, marca KIMAX	\$140,37 ¹
		Matraz volumétrico de 10ml, marca KIMAX	\$299,28 ²	Matraz volumétrico de 100ml, marca KIMAX	\$367,72 ²
		Pipeta graduada de 2ml en 1/10, marca KIMAX	\$74,24 ²	Matraz volumétrico de 10ml, marca KIMAX	\$299,28 ²

		Pipeta graduada de 10ml en 1/10, marca KIMAX	92,22 ²		
TOTAL	\$23251,1	TOTAL	\$12898,42	TOTAL	\$116237

Tabla 6. Costos de implementación de métodos analíticos: espectrofotométrico, yodométrico y cromatográfico.

¹Proveedor Físico Químico, S.A. de C.V. Cotización realizada el 16 de Enero de 2015. No. cotización 11155.

² Proveedor Físico Químico, S.A. de C.V. Cotización realizada el 19 de Enero de 2015. No. cotización 11161.

³ Quantum D-O Analytical, S.A. de C.V. Cotización realizada el 14 de Octubre de 2013. No. cotización JC-FESZ-M081209B.

⁴ Proveedor Químico Científico, S.A. de C.V. Cotización realizada el 16 de Enero de 2015. No. cotización E-0010/14.

⁵Phenomenex, Inc. Cotización realizada el 27 de Septiembre de 2012. No.cotización458553.

⁶ ABC Instrumentación Analítica, S.A. de C.V. Cotización realizada el 25 de Octubre de 2013. No. cotización 00084266.

⁷Varian, S.A. Cotización realizada el 18 de Junio de 2004. No. cotización VARMEXLZR04804.

9 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico por espectrofotometría UV, el cual fue viable para la matriz y el principio activo empleados, por lo que se procedió con la validación para así formar parte del estudio de equivalencia.

También se desarrolló un método analítico por yodometría, el cual mostró ser viable para la matriz y el principio activo empleados, por lo que se validó y así formó parte del estudio de equivalencia.

El método cromatógráfico fue desarrollado, sin embargo mostró interferencia de la matriz farmacéutica, por lo que se descartó del análisis de la equivalencia.

Se mostró la falta de equivalencia entre los resultados obtenidos por los métodos analíticos analizados, a pesar de ser métodos analíticos validados, comprobando que la validación únicamente evalúa la calidad de un método y no si se producen resultados similares. Sin embargo se comprobó la ventaja de una técnica sencilla, como la yodometría, sobre las técnicas más complejas, ya que es una técnica en la cual se observó una mejor respuesta analítica, para la matriz y el analito utilizados, y la cual tiene un costo de implementación bajo, comparado con las otras técnicas empleadas.

10 REFERENCIAS

1. Valcárcel M, Cárdenas M. Automatización y miniaturización en Química analítica. España: Springer-Verlag Ibérica; 2000.p 40
2. OCW. UM: Open course ware. Universidad de Murcia [Internet]. España Campillo N, curso 2011/2012. [Citado 06 Mayo 2014] Análisis químico: Introducción al análisis químico. Disponible en: <http://ocw.um.es/ciencias/analisis-quimico/material-de-clase-1/tema-1.pdf>
3. International Conference on Harmonization, Q2A (R1). Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology, 1996.
4. Sánchez J, Mora J, Hernández V. Validación de métodos analíticos. México: U.N.A.M. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2006.
5. Chambers D, Kelly G, Limentani G, Lister A, Lung R, Warner E. Analytical method equivalency. An acceptable analytical practice. Pharm Tech [Internet]. 2005 [Citado 06 Mayo 2014]; 64-80. Disponible en: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/362005/178592/article.pdf>
6. Borman P, Chatfield M, Damjanov I, Jackson P. Design and analysis of method equivalence studies. Analytical Chemistry. 2009, Vol. 81 (24): 9849-57
7. Carstensen B. Comparing and predicting between several methods of measurement. Biostatistics. 2004, Vol. 5 (3): 399-413
8. Lung R, Gorko M, Llewelyn J, Wiggins N. Statistical method for determination of equivalence of automated test procedures. Journal of automated methods and management in chemistry. 2003, Vol. 25 (6): 123-127
9. Maindonald J, Broun J. Cambridge series in statistical and probabilistic mathematics. Data analysis and graphics using R: an example-based approach. 3ª ed. United Kingdom: Cambridge; 2010 p 67
10. Paretta M. Reingeniería farmacéutica: principios y protocolos de la atención al paciente. 5ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2005. p 708-9

11. Bowker J, Pfeifer M, Levin y O'Neal, El pie diabético. 7ª ed. España: Elsevier; 2008. p 210-5
12. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J.C, Moro M.A, Portolés A. Velázquez, Farmacología básica y clínica. 18ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008. p 1009-10
13. Calvo M. Bioquímica de los alimentos, ácido ascórbico [Internet]. [Citado 06 Mayo 2014]. Disponible en:
<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/vitamins/ascorbico.html>
14. Merck and Co. Inc. The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 10ª ed. Rahway, N.J, USA. 1983. p 120
15. Ocampo R, Ríos A, Betancur L, Ocampo D. Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos. Colombia: Universidad de Caldas; Colombia: 2008. p. 123
16. Yilmaz S, Sadikoglu M, Saglikoglu G, Yagmur S, Askin G. Determination of ascorbic acid in tablet dosage forms and some fruit juices by DPV. International Journal of electrochemical science. 2008; vol. 3: 1534-42
17. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª ed. México: 2004. p. 874-5
18. Viera C, Milani V, Menezes C, Jorge L, Giglio J. Further insight toward vitamin C determination and stability. Proposal of a new quantification method. Uberlândia. 2010; vol. 26 (2): 296-304
19. Tomuta I, Dudas D, Vonica A, Leucuta S. Quantification of ascorbic acid and sodium ascorbate in powder blends for tableting and in vitamin C chewable tablets by NIR-chemometry. Acto Pharm. 2013; vol. 63: 373-84
20. Grindberg T, Williams K. Vitamin C quantification using reversed-phase ion-pairing HPLC. Concordia Journal of analytical chemistry. 2010, vol. 1: 19-23
21. Ferrier S, Bandeira M, Lemos V, Dos Santos H, Costa A, De Jesus D. Sensitive spectrophotometric determination of ascorbic acid in fruit juices and pharmaceutical formulations using 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP). Fresenius Journal of analytical chemistry. 1997; vol. 357 (8): 1174-78

22. Olsen E. Métodos ópticos de análisis. España: Editorial Reverté; 1990. p 87-95.
23. Silva C, Simoni J, Collins C, Volpe P. Ascorbic acid as a standard for iodometric titrations. *JChemEd.* 1999; 76(10):1-2.
24. Llinás H, Rojas C. Estadística descriptiva y distribuciones de probabilidad. Colombia: Ediciones Uninorte; 2005. p. 76-7.
25. Chatfield M, Borman P. Acceptance criteria for method equivalency assessments. *Anal. Chem.* 2009; 81(24): 9841-8.
26. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, et al. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales de validación de métodos". Santiago: Instituto de Salud Pública Chile; 2010.

ANEXO 1. PROTOCOLOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

1) DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA VALIDACIÓN DE SISTEMA.

- 1.1) Se preparó una solución stock pesando 10mg de ácido ascórbico, se colocaron en un matraz volumétrico con capacidad de 100mL, se disolvió con solución de ácido clorhídrico 0.1N y se llevó a volumen final.
- 1.2) Se prepararon las soluciones descritas a continuación, cada una por sextuplicado:

Volumen de alícuota de stock	Aforo a	Concentración
1mL	25mL	4 μ g/mL
3mL	50mL	6 μ g/mL
2mL	25mL	8 μ g/mL
5mL	50mL	10 μ g/mL
3mL	25mL	12 μ g/mL

Tabla 7. Descripción de preparación de soluciones para validación de sistema, método espectrofotométrico.

- 1.3) Procedió a leer cada una de las muestras en una longitud de onda de 243nm.

2) DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODO.

- 2.1) Se preparó el placebo cargado de la siguiente manera:

Formulación	Porcentaje
Gel	80%
Ácido ascórbico	20%

Tabla 8. Descripción de preparación de placebo cargado.

- 2.2) Se pipetearon 5mL de placebo cargado y fueron llevados a volumen final de 100mL con solución de ácido clorhídrico 0.1N. Se realizó este procedimiento por triplicado en cada nivel.
- 2.3) Fueron extraídas dos alícuotas de 1mL cada una, de la solución preparada en el numeral 2.2 y se llevó cada una a volumen final 25mL con solución de ácido clorhídrico 0.1N. Se realizó este procedimiento con cada una de las soluciones preparadas en el numeral 2.2.
- 2.4) Se extrajo una alícuota de 1mL de cada una de las soluciones preparadas en el numeral 2.3 y se llevó a volumen final de 100mL con solución de ácido clorhídrico 0.1N.
- 2.5) Se realizó el mismo procedimiento realizado en el numeral 2.3, extrayendo volúmenes de 3mL y llevando a volumen final de 50mL, volumen de 2mL y llevando a 25mL, volumen de 5mL y llevando a 50mL, volumen de 3mL y llevado a 25mL. Para obtener las siguientes concentraciones:

Concentración
4µg/mL
6µg/mL
8µg/mL
10µg/mL
12µg/mL

Tabla 9. Concentraciones obtenidas de acuerdo al procedimiento del numeral 2.5.

- 2.6) Se procedió de igual forma que en el numeral 2.4 con cada una de las soluciones preparadas en el numeral 2.5.
- 2.7) La lectura de cada una de las muestras preparadas se realizaron en una longitud de onda de 243nm.

- 2.8) ESPECIFICIDAD. Fueron preparadas 3 muestras que contenían todos los excipientes a excepción del principio activo y se realizó la lectura de las muestras a $\lambda=243\text{nm}$.
- 2.9) Se prepararon dos muestras de ácido oxálico de concentración de $30\mu\text{g/ml}$ y se realizó un barrido para determinar longitud de onda de máxima absorción.
- 2.10) PRECISIÓN INTERMEDIA. Fueron preparadas 6 muestras en el nivel de concentración de $8\mu\text{g/mL}$ con ayuda de otro analista. El procedimiento se realizó en dos días diferentes. La lectura de las muestras se realizó a $\lambda=243\text{nm}$.
- 2.11) ROBUSTEZ. Se prepararon seis muestras en el nivel de $8\mu\text{g/mL}$ aforando con solución de ácido sulfúrico 0.1N. Las muestras se leyeron a $\lambda=243\text{nm}$.
- 2.12) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA. De las muestras preparadas en el numeral 2.6 se almacenaron dos muestras de la concentración de $8\mu\text{g/mL}$, una muestra se almacenó en refrigeración y la otra se conservó sobre la mesa de trabajo expuesta a luz blanca. Se monitoreó durante 48h, analizando la muestra cada 30min, las primeras 3h, y posteriormente a las 24h y 48h. Se realizó el análisis de las muestras a $\lambda=243\text{nm}$.

3) OBJETIVO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Desarrollar un método analítico que sea capaz de cuantificar el ácido ascórbico presente en un gel.

4) FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

La radiación ultravioleta provoca la excitación de electrones a niveles de energía superior, con esta propiedad física la espectrofotometría permite relacionar la

cantidad de una sustancia con la cantidad de radiación absorbida²⁰. El ácido ascórbico presentó una longitud de onda de máxima absorción de 243nm, por lo que las mediciones se realizarán en esa longitud.

5) MATERIAL

- Pipetas volumétricas de capacidades de 1, 2, 3 y 5mL
- Matraz volumétrico de 100mL
- Matraz volumétrico de 25mL
- Matraz volumétrico de 50mL
- Vaso de precipitados de 250mL
- Celdas de cuarzo de 1cm de ancho

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Solución de ácido clorhídrico 0.1N
- Solución de ácido sulfúrico 0.1N

EQUIPO

- Microbalanza
- Espectrofotómetro Cary 50

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN MÉTODO YODOMÉTRICO

1) DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA VALIDACIÓN DE SISTEMA.

- 1.1) Se preparó una solución stock pesando un gramo de ácido ascórbico, fue colocado en un matraz volumétrico con capacidad de 100mL, se disolvió con solución de ácido clorhídrico 0.1N y fue llevado a volumen final.
- 1.2) Fueron preparadas las soluciones descritas a continuación, cada una por sextuplicado:

Volumen de alícuota de stock	Aforo a	Concentración
1mL	10mL	1mg/mL
2mL	10mL	2mg/mL
3mL	10mL	3mg/mL
4mL	10mL	4mg/mL
5mL	10mL	5mg/mL

Tabla 10. Descripción de preparación de soluciones para validación de sistema, método yodométrico.

- 1.3) Se adicionó 0.5mL de indicador de almidón a cada una de las muestras preparadas en el numeral 1.2.
- 1.4) Fueron valoradas cada una de las muestras con solución de yodo 0.1N, previamente estandarizada.

2) DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODO.

- 2.1) Se preparó el placebo cargado de la siguiente manera:

Formulación	Porcentaje
Gel	80%
Ácido ascórbico	20%

Tabla 11. Descripción de preparación de placebo cargado.

- 2.2) Se pipetearon 5mL de placebo cargado y fueron llevados a volumen final de 100mL con solución de ácido clorhídrico 0.1N. Se realizó este procedimiento por triplicado en cada nivel.
- 2.3) Fueron extraídas dos alícuotas de 1mL cada una, de la solución preparada en el numeral 2.2 y se llevó cada una a un volumen final de 10mL con solución de ácido clorhídrico 0.1N. Este procedimiento se realizó con cada una de las soluciones preparadas en el numeral 2.2.
- 2.4) Se realizó el mismo procedimiento realizado en el numeral 2.3, extrayendo volúmenes de 2mL, 3mL, 4mL y 5mL. Las concentraciones obtenidas son las siguientes:

Concentración
1mg/mL
2mg/mL
3mg/mL
4mg/mL
5mg/mL

Tabla 12. Concentraciones obtenidas de acuerdo al procedimiento del numeral 2.5.

- 2.5) Fueron adicionados 0.5mL de solución indicadora de almidón a cada una de las muestras.
- 2.6) Se valoró cada una de las muestras con solución de yodo 0.1N previamente estandarizada.
- 2.7) ESPECIFICIDAD. Fueron preparadas 3 muestras que contenían todos los excipientes a excepción del principio activo y se procedió conforme al numeral 2.5 y 2.6.
- 2.8) Se prepararon 3 muestras que contenían ácido oxálico en vez de ácido ascórbico y se procedió conforme al numeral 2.5 y 2.6.

- 2.9) PRECISIÓN INTERMEDIA. Fueron preparadas seis muestras en el nivel de concentración de 3mg/mL con ayuda de otro analista. Este procedimiento se realizó en dos días diferentes. Se procedió de igual forma que en el numeral 2.5 y 2.6.
- 2.10) ROBUSTEZ. Se prepararon seis muestras en el nivel de 3mg/mL aforando con solución de ácido sulfúrico 0.1N. Se dio el mismo tratamiento a las muestras que en el numeral 2.5 y 2.6.
- 2.11) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA. De las muestras preparadas en el numeral 2.4 fueron almacenadas dos muestras de la concentración de 3mg/mL, una muestra se almacenó en refrigeración y la otra se conservó sobre la mesa de trabajo expuesta a luz blanca. Se monitoreó durante 48h analizando la muestra cada 30min, las primeras 3h, y posteriormente a las 24h y 48h. El análisis de las muestras se realizó siguiendo el procedimiento del numeral 2.5 y 2.6.

3) OBJETIVO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Desarrollar un método analítico que sea capaz de cuantificar el ácido ascórbico presente en un gel.

4) FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

El ácido ascórbico reacciona con el yodo, cediendo sus electrones al yodo presente formando ácido dehidroascórbico. El punto final de la reacción se observa cuando el primer exceso de yodo en la solución forma un complejo con el almidón generando una tonalidad azul oscuro-violeta²¹.

5) MATERIAL

- Pipetas volumétricas de capacidades de 1, 2, 3, 4 y 5mL
- Pipeta graduada de 2mL

- Matraz volumétrico de 100mL
- Matraz volumétrico de 10mL
- Vaso de precipitados de 250mL
- Vaso de precipitados de 25mL
- Vaso de precipitados de 50mL
- Matraz Erlen Meyer de 125mL
- Bureta de 25mL
- Soporte universal
- Pinzas de doble presión

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Solución indicadora de almidón
- Solución volumétrica de yodo 0.1N
- Solución de ácido clorhídrico 0.1N
- Solución de ácido sulfúrico 0.1N
- Ácido ascórbico

EQUIPO

- Balanza analítica OHAUS
- Balanza granataria

ANEXO 2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS

RESULTADOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

VALIDACIÓN DE SISTEMA

PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	LÍMITE DE ESPECIFICACIÓN ESTABLECIDO	VALOR OBTENIDO	
Precisión del sistema	c.v. <2%	Conc.	c.v
		4µg/ml	1.01%
		6µg/ml	0.47%
		8µg/ml	0.52%
		10µg/ml	0.42%
		12µg/ml	1.37%
Linealidad del sistema	r ² > 0.98 b=0 m≠0	r ² =0.9996 b=0 m≠0	

Tabla 13. Resultados obtenidos para la validación de sistema, método espectrofotométrico.

VALIDACIÓN DE MÉTODO

PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	LÍMITE DE ESPECIFICACIÓN ESTABLECIDO	VALOR OBTENIDO	
Precisión del sistema	c.v. <2%	Conc.	c.v
		4µg/ml	1.29%
		6µg/ml	1.75%
		8µg/ml	1.46%
		10µg/ml	1.89%
		12µg/ml	1.23%
Linealidad del sistema	r ² >0.98 b=0 m≠0	r ² =0.9851 b≠0 m≠0	
Exactitud	t calc.< t tab. t calc< 1.6991	Cant. adicionada	%R promedio
		4µg/ml	94.88%
		6µg/ml	97.48%
		8µg/ml	106.63%
		10µg/ml	102.11%
		12µg/ml	96.78%
		t calc= 0.5103	

Repetibilidad	c.v<2%	Conc.	Variable respuesta ABS
		8µg/ml	0.3518
		8µg/ml	0.3574
		8µg/ml	0.3460
		8µg/ml	0.3444
		8µg/ml	0.3487
		8µg/ml	0.3444
		c.v= 1.46%	
Precisión intermedia	Analista 0.1703<Fcalc>5.871	Analista Fcalc= 0.7015	
	Día 0.2242<Fcalc>4.461	Día Fcalc= 404.8335	
Robustez	t calc>t tab t calc> 2.2281	t calc= 10.6286	
Especificidad	No exista interferencia de la matriz farmacéutica ni de algún producto de degradación.	No se observó interferencia de la matriz farmacéutica, ni del producto de degradación ácido oxálico.	
Estabilidad de la muestra	La muestra analítica debe ser estable al menos durante el tiempo de análisis.	La muestra analítica mostró estabilidad al menos de 24h.	

Tabla 14. Resultados obtenidos para la validación de método espectrofotométrico.

RESULTADOS DE VALIDACIÓN MÉTODO YODOMÉTRICO

VALIDACIÓN DE SISTEMA

PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	LÍMITE DE ESPECIFICACIÓN ESTABLECIDO	VALOR OBTENIDO	
		Conc.	c.v
Precisión del sistema	c.v. <2%	1mg/ml	1.23%
		2mg/ml	0.97%
		3mg/ml	0.64%
		4mg/ml	0.38%
		5mg/ml	0.25%
Linealidad del sistema	$r^2 > 0.98$ $b=0$ $m \neq 0$	$r^2 = 0.9997$ $b \neq 0$ $m \neq 0$	

Tabla 15. Resultados obtenidos para la validación de sistema, método yodometrico.

VALIDACIÓN DE MÉTODO

PARÁMETRO DE VALIDACIÓN	LÍMITE DE ESPECIFICACIÓN ESTABLECIDO	VALOR OBTENIDO	
		Conc.	c.v
Precisión del sistema	c.v. <2%	1mg/ml	1.58%
		2mg/ml	1.97%
		3mg/ml	1.91%
		4mg/ml	0.32%
		5mg/ml	1.21%
Linealidad del sistema	$r^2 > 0.98$ $b=0$ $m \neq 0$	$r^2 = 0.9962$ $b \neq 0$ $m \neq 0$	
Exactitud	$t \text{ calc.} < t \text{ tab.}$ $t \text{ calc} < 1.6991$	Cant. adicionada	%R promedio
		1mg/ml	94.83%
		2mg/ml	99.15%
		3mg/ml	102.79%
		4mg/ml	102.27%
		5mg/ml	97.89%
		t calc= 1.0110	

Repetibilidad	c.v<2%	Conc.	Variable respuesta Vol. (ml)
		4mg/ml	9.9
		4mg/ml	9.8
		4mg/ml	9.7
		4mg/ml	9.8
		4mg/ml	9.8
		4mg/ml	9.8
		c.v= 1.91%	
Precisión intermedia	Analista 0.1703<Fcalc>5.871	Analista Fcalc= 2.9362	
	Día 0.2242<Fcalc>4.461	Día Fcalc= 954.1667	
Robustez	t calc>t tab t calc> 2.2281	t calc= 18.9814	
Especificidad	No exista interferencia de la matriz farmacéutica ni de algún producto de degradación.	No se observó interferencia de la matriz farmacéutica, ni del producto de degradación ácido oxálico.	
Estabilidad de la muestra	La muestra analítica debe ser estable al menos durante el tiempo de análisis.	La muestra analítica mostró estabilidad al menos de 24h.	

Tabla 16. Resultados obtenidos para la validación de método yodométrico.