

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-León



Facultad de Ciencias Químicas

Escuela de Farmacia

Desarrollo y Validación de un Método de Análisis de Tabletas de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por Espectrofotometría UV-Vis.

**Monografía para optar al Título de:
LICENCIADO QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Autora:

Mercedes Elizabeth Román Mercado.

Tutor:

Lic. Yader Francisco Sánchez.

León, 2004

AGRADECIMIENTO

- ❖ *A DIOS, nuestro Señor por estar presente en cada momento de mi vida, por iluminarme, darme fortaleza y sabiduría para culminar mi carrera.*

- ❖ *A mi madre, Elisa Mercedes Mercado, por brindarme todo su amor, dedicación y apoyo incondicional.*

- ❖ *A mi hermano, Mario José Román, por estar siempre dispuesto a ayudarme.*

- ❖ *A mi abuelita, María Teresa Bermúdez, (Q. E. P. D.), por todo su amor, su sabiduría y sus consejos.*

- ❖ *A mi madrina, Emma Sampson, por su cariño y apoyo incondicional.*

- ❖ *A mi tutor Yader F. Sánchez por compartir sus conocimientos, por brindarme su colaboración, orientación y su tiempo para la realización de este estudio.*

- ❖ *Al Lic. César Martínez por brindarme su apoyo y por contribuir con aportes técnico-material durante la realización de esta monografía.*

- ❖ *A todas las personas que de una u otra forma han colaborado en la culminación de mis estudios.*

DEDICATORIA

- ❖ *A DIOS, por permitirme culminar mis estudios y a quien dedico mi profesión, teniéndolo siempre como mi guía.*

- ❖ *A mi Madre, Elisa Mercedes Mercado por estar en todo momento de mi vida y por darme todo su amor, apoyo y dedicación.*

- ❖ *A mi hermano Mario José Román, por apoyarme y tener confianza en mí.*

- ❖ *A mi abuelita, María Teresa Bermúdez (Q. E. P.D.), aunque ya no estés aquí siempre estarás en mi corazón.*

- ❖ *A todas las personas que tienen deseos de superación, para que luchen por lograr sus propósitos a pesar de las adversidades de la vida.*

INDICE

Introducción.....	1
Objetivos.....	3
Marco Teórico.....	5
Material y Método.....	31
Resultados y Discusión.....	36
Conclusiones.....	56
Recomendaciones.....	58
Bibliografía.....	60
Anexos.....	63



INTRODUCCIÓN



La globalización de la economía mundial ha provocado un incremento en el ingreso de medicamentos nuevos al mercado nacional, además, la industria farmacéutica del país precisa de mejorar la calidad de sus productos para poder así competir con los productos extranjeros; de ahí, la creciente necesidad de controlar la calidad de los medicamentos ha obligado a buscar nuevas técnicas analíticas que faciliten y brinden una respuesta rápida a los análisis de los mismos.

Es por eso que de acuerdo a la realidad nacional se debe garantizar el aseguramiento de la calidad, tanto de los medicamentos fabricados en el país como los que se compran en el extranjero. Para esto, los laboratorios de control de calidad de las instituciones regulatorias y de la Industria Farmacéutica deben contar con técnicas analíticas versátiles, confiables y reproducibles para el análisis y control de las drogas consumidas en nuestro país.

La falta de métodos no establecidos en las Farmacopeas ha obligado a la industria farmacéutica a desarrollar métodos analíticos que permitan velar por la calidad de sus productos.

El propósito de este Estudio es desarrollar un método analítico para tabletas de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por Espectrofotometría derivativa UV Visible con el grado de seguridad y confianza que brinda la validación.



OBJETIVOS



Objetivo General

* Desarrollar un método de Análisis para tabletas de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por Espectrofotometría derivativa UV-Vis.

Objetivos Específicos

1. Describir la técnica analítica para el ensayo de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina.
2. Evaluar los parámetros para la validación del método Analítico que se empleará para el análisis de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por Espectrofotometría derivativa UV-Vis.
3. Determinar cuantitativamente Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina en tabletas por Espectrofotometría derivativa UV-Vis.



MARCO TEÓRICO



1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LORATADINA

Se han utilizado diversos métodos para la determinación de Loratadina, incluyendo espectroscopia ultravioleta, colorimetría, polarografía, cromatografía líquido-gas, espectrometría de absorción atómica, cromatografía líquida de alta resolución usando detección UV.

1.1 Método de Análisis de Loratadina por Cromatografía Líquido-Gas (GLC).

Johnson R y col. (1) desarrollaron un método por cromatografía líquido-gas para la determinación de Loratadina en el plasma humano utilizando un detector nitrógeno-fósforo. El método involucra la extracción con un solvente orgánico con un pH neutro y alcalino. El medio orgánico a pH neutro es evaporado hasta sequedad después de la extracción, reconstituido e inyectado en el sistema GLC. A la extracción a pH alcalino en el solvente orgánico se le añade trifluoroacético anhídrido. Se le adiciona agua; esta mezcla es centrifugada y el medio orgánico es evaporado hasta sequedad, reconstituido e inyectado en el sistema GLC que esta equipado con un detector específico de nitrógeno y una columna capilar de silica-fusionada.

El método es exacto y preciso; describe y demuestra que se puede utilizar para la determinación de Loratadina presente en las muestras de plasma de los voluntarios luego de haber tomado una sola dosis de 10 mg de Loratadina en jarabe.

1.2 Método de Análisis de Loratadina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con diferentes técnicas de detección.

Sutherland FC y col (2) publicaron un método desarrollado para determinar simultáneamente Loratadina y su metabolito activo descarboetoxyloratadina (DCL) presente en plasma; usando cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica de masa. Las muestras son extraídas del plasma con tolueno (que contiene a la Loratadina) y ácido fórmico al 2% para DCL. El tolueno que contiene a la Loratadina es evaporado, el analito es reconstituido y mezclado con el extracto de DCL. La cromatografía es realizada con una columna Phenomenex Luna C18, 5.0 μm , 150-2.1mm con una fase móvil constituida de acetonitrilo 0.1%, ácido fórmico usando como gradiente de elusión (10-90% de acetonitrilo en dos minutos) y un flujo 0.3ml/min. Este es el primer método descrito para la determinación simultánea de Loratadina y descarboetoxyloratadina en plasma usando una corrida cromatográfica. Este método es sensible y reproducible para ser usados en estudios farmacocinéticos.



Kunicki PK y col (3) proponen un método de análisis por HPLC con detección ultravioleta para determinar Loratadina en plasma humano. Después de una simple extracción líquido-líquido con 2- metil-butano:hexano (2:1) y evaporación de la fase orgánica; los componentes son disueltos en HCl 0.01 M; de nuevo extraído y evaporado y finalmente separado en una columna Supelcosil LC-18-DB. Este análisis fue hecho a temperatura ambiente y bajo condiciones isocráticas usando la siguiente fase móvil: CH₃CN-agua-0.5 M KH₂PO₄-H₃PO₄ (440:480:80:1, v/v). La detección por UV fue realizada a 200 nm con un límite de cuantificación de 0.5 ng/ml. La precisión fue encontrada satisfactoria con un rango ensayado (0.5-50 ng/ml) con una desviación estándar relativa de 2.3-6.3 y 5.2-14.1% para ensayos intra e interlaboratorio, respectivamente.

Yin OQ, Shi X, Chow MS y col (4) por su parte demuestran que se puede determinar simultáneamente Loratadina (L) y su metabolito activo Descarboetoxyloratadina (DCL) en plasma por HPLC con detección de fluorescencia. La extracción se realizó con tolueno, los analitos fueron separados usando un gradiente de fase móvil que consiste en metanol-acetonitrilo-buffer fosfato. La linealidad para la L y DCL esta en el rango de concentración de 0.5-16 ng/ml, el coeficiente de variación para ensayos intra e interdías fue de < 8.3%, con un rango de exactitud desde 98.3 hasta 105.7%. El límite de cuantificación fue de 0.5 ng/ml para L y DCL.

Zhong D, Blume H y col (5) determinaron separadamente Loratadina (L) y Descarboetoxyloratadina (DCL) presente en el plasma humano por medio del siguiente procedimiento: A causa de las altas diferencias de polaridad entre los analitos fueron determinados separadamente en dos sistemas de HPLC. Como estándar interno propil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo-[5,6]-ciclohepta-[1,2-b]-piridina-11-ylidina)-1 piperidincarboxilato y 1-etil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo-[5,6]-ciclohepta-[1,2-b]-piridina-11-ylidina)-piperidina fueron usados para L y DCL, respectivamente. La extracción fue hecha con solventes orgánicos desde 1ml de plasma, L y DCL fueron reextraídos con ácido fosfórico diluido desde la fase orgánica. La separación cromatográfica fue hecha en una columna RP-18 y la detección de fluorescencia fue lo suficientemente sensible para la determinación de L y DCL en plasma con un bajo limite de cuantificación de 0.5 ng/ml para los analitos.



1.3 Método de Análisis de Loratadina por Espectrofotometría de Absorción Atómica y por Colorimetría.

El-Kousy N y col (6) demostraron que se puede determinar Loratadina por medio de estos métodos. El primer método depende de la interacción de la droga (Loratadina) con tiocianato de cobalto a pH 2 para formar complejos ternarios. Estos complejos son extraídos con solvente orgánicos y estimados por método de absorción atómica indirecta, la determinación del complejo que contiene cobalto después de la extracción con HCl 0.1M. Se encontró que la Loratadina puede ser determinada en un rango de concentración de 10-93 ug/ml con un porcentaje medio recuperado $99.62 \pm 0.75\%$. El segundo método esta basado en la formación de pares de iones de color rojo naranja como resultado de la reacción entre Loratadina y el tiocionato de molibdeno con una absorción máxima de 469.5 nm en diclorometano.

1.4 Método de Análisis de Loratadina por Electroforesis capilar.

Fernández H, Ruperez FJ, Barbas C y col (7) realizaron un estudio para determinar Loratadina y sus impurezas por Electroforesis Capilar (EC). El método que tradicionalmente se ha usado es HPLC para la determinación de la pureza de las sustancias farmacéuticas, la electroforesis capilar ofrece una selectividad diferente y es una técnica complementaria para HPLC. De la Loratadina incluyendo su materia prima se separaron siete impurezas que fueron identificadas y cuantificadas para el control de calidad de la droga. La separación se dio con capilares de silica (57 cm. x 50 microm ID) y fue operado a un potencial 20 kV. La temperatura fue mantenida a 25 grados C. Para la separación final fue preparado un buffer con 100 mM H_3PO_4 a un pH 2.5 con NaOH y con 10% acetonitrilo agregado (v/v). Las impurezas pueden detectarse a un nivel de 0.1%.

2. MÉTODO DE ANÁLISIS DE LORATADINA Y PSEUDOEFEDRINA.

2.1 Método de Análisis de Loratadina y Pseudoefedrina por HPLC en fase reversa y por la primera derivada espectrofotométrica.

Mabrouk MM y col (8) describen un método para determinar simultáneamente Loratadina (L) y Pseudoefedrina (PE). El método de HPLC involucra la separación de L y PE con una columna micro-BondaPak C18 usando una mezcla de metanol agua:ácido fosfórico:fosfato de amonio dihidrogenado (220:300:2:3 g) (V/V/V/P), 60 y 40% acetonitrilo como fase móvil con un flujo de 2 ml/min con detección ultravioleta a 247 nm. Los gráficos de calibración son lineales desde 5 hasta 100 microg/ml de L y desde 120 hasta 1200 microg/ml para PE. Los límites de detección son de 0.5 microg/ml para L y 60 microg/ml para PE. El método espectrofotométrico esta basado en el espectro de la primera derivada para L y PE a 307, 266 nm, respectivamente, de estas soluciones en HCl 0.01M, usando el ácido como blanco. Los gráficos de calibración son lineales en n rango de 5-25 microg/ml para L y 240-720 microg/ml para PE; los límites de detección son de 0.16 microg/ml para L y 10 microg/ml para PE. El porcentaje medio recuperado obtenido por



diferentes mezclas sintéticas usando este método fue de 97.6% con un coeficiente de variación de 1.79 para L y 101.6% con un coeficiente de variación de 1.95 para PE. Los dos métodos fueron satisfactoriamente aplicados para la determinación de L en combinación con PE en tabletas de Clarinase y en diferentes formas farmacéuticas.

2.2. Método de Análisis de Loratadina y Pseudoefedrina por Espectrofotometría de la Segunda Derivada.

Ivanovic D y col (9) describen un estudio realizado para determinar simultáneamente Pseudoefedrina, Ibuprofeno y Loratadina. El espectro de la derivada de segundo orden en etanol con una modulación de la longitud de onda fue usada. Para el ensayo de cuantificación de todas las sustancias investigadas en mezclas de laboratorio y formas farmacéuticas fue aplicada una técnica de "zero-crossing".

3. MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA PSEUDOEFEDRINA.

3.1 Método de Análisis de Pseudoefedrina por HPLC del par iónico en fase reversa.

Argekar AP y col (10) realizaron un estudio para determinar simultáneamente Pseudoefedrina y Terfenidina por medio de HPLC del par iónico en fase reversa. Utilizaron la siguiente fase móvil: acetonitrilo:metanol:agua (60:15:25 v/v) conteniendo 2.9 g de lauril sulfato de sodio por litro, pH ajustado a 3.1 usando ácido fosfórico, y C18 Spherisorb ODS 2 (3 microns, 5 cm. x 4.6 mm i.d.) como fase estacionaria. Se utilizó un detector UV a 254 nm. Un flujo constante de 1.0 ml/min fue mantenido durante todo el análisis. El tiempo de retención para la Pseudoefedrina y la Terfenidina fue de 1.90 y 7.35 min, respectivamente. El rango de linealidad y el porcentaje recuperado para la Pseudoefedrina y la Terfenidina fueron 24-1200 y 12-600 micrograms/ml, y 100.01 y 100.4%, respectivamente.

3.2 Método de Análisis de Pseudoefedrina por cromatografía electrocinética de micro emulsión

Zhang J y col (11) desarrollaron un estudio de cromatografía electrocinética de micro emulsión con detección de fluorescencia con láser inducido para cuantificar Efedrina (E) y Pseudoefedrina (PE) con 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol. Para una serie de optimización, una corrida con un buffer compuesto de 20 mM de borato + micro emulsión (23.3 mM de dodecil sulfato de sodio/180.85 mM 1-butanol/16.4 mM n-heptano) +8% acetonitrilo fue aplicado para la separación de las derivadas. Una relación lineal para E y PE fue obtenido en un rango de 0.058-11.58 microg. ML (-1) (coeficiente de correlación: 0.9993 para E, 0.9995 para PE), y los límites de detección para E y PE fueron 5.3 y 3.9 ng.mL(-1). El método fue aplicado a el análisis de dos alcaloides en preparaciones de hierbas tradicionales de la China con un rango de porcentaje recuperado de 96.9-105.4%.



3.3 Método de Análisis de Pseudoefedrina por cromatografía líquida.

Mansour AM y col (12) llevaron a cabo un método de cromatografía líquida en fase reversa isocrático para la determinación simultánea de clorhidrato de Pseudoefedrina (PE) y maleato de Carboximina (C) en formas farmacéuticas. El análisis fue conducido a una columna CN (10 microns), con una fase móvil que contiene acetonitrilo-metanol-buffer fosfato (pH 5.3)-agua (140 + 170 + 40 + 100) y la detección a una longitud de onda de 262 nm. El método fue validado para la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad del sistema. Recuperando en un rango desde 97.4 hasta 100.7% y desde 98.5 hasta 100.2% para PE y C, respectivamente. Los resultados de linealidad fueron coeficiente de correlación, $r > 0.9995$ para PE en un rango de 250-750 micrograms/ml y $r > 0.9999$ para C en un rango de 20-60 micrograms/ml.

3.4 Método de Análisis de Pseudoefedrina por Espectrofotometría

Mahgoub H y col (13) publicaron un estudio desarrollado para determinar Pseudoefedrina en tres mezclas binarias con fenoxifenadina (mezcla 1), cetirizina (mezcla 2) y Loratadina (mezcla 3) usando la primera derivada de un espectro de radio. El método está basado en el uso de la primera derivada de un espectro de radio. El espectro de radio es obtenido dividiendo el espectro de absorción de la mezcla para cada uno de los componentes. La concentración de los otros componentes fue determinada desde su respectiva gráfica de calibración tratada similarmente. La influencia de Delta lambda para obtener la primera derivada del espectro de radio y en efecto de la concentración divisor en las gráficas de calibración estudiadas. El método fue aplicado para la determinación de estos en mezclas sintéticas y formas farmacéuticas. Los resultados obtenidos fueron precisos y exactos.

Validación de Métodos Analíticos (14)

El término Validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo: 1-especificar e implementar, 2- aprobar y 3- documentar.

- Definición:

Es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientes, documentadas y demostrativas de que un proceso de fabricación o método de control es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

La importancia de la validación es crucial para asegurar que determinado método analítico sea exacto, preciso, específico, reproducible y robusto, dentro de una variación específica en que un analito presente una matriz dada al ser analizado.



El proceso de validación de métodos de análisis consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, así como la evidencia documentada del procedimiento, diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y un criterio de aceptación.

A pesar de asumirse la validación de los métodos la realidad es que los mecanismos de desempeño para una validación rigurosa no están generalmente bien definidos o no son bien ejecutados.

Se pueden considerar tres tipos de validación: prospectiva, retrospectiva y revalidación. La primera para nuevas metodologías, la segunda para metodologías usadas repetidamente, no validadas anteriormente y sobre las cuales existe documentación suficiente para probar la adecuación del método; y finalmente, la revalidación que consiste en repetir de forma total o parcial la validación, ya sea debido a modificaciones en el método, equipos, en la muestras a analizar, etc., para garantizarla obtención de resultados fiables.

Existen términos relacionados con la validación como:

- **Cualificación:** El término validación se amplía a veces para incluir el concepto de cualificación y consiste en la operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos.
- **Calibración:** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.
- **Validar:** Es verificar documentalente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer.

Es fundamental en el desarrollo de un método analítico la validación del mismo, o sea, debe probarse el método para determinar su efectividad. La validación incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud, especificidad, etc; que proporciona una media del comportamiento del método. Para evaluar cada uno de los parámetros mencionados anteriormente se debe realizar de manera exigente y rigurosa el procedimiento a seguir, el tratamiento estadístico y los criterios de aceptación, debido a la variabilidad de la respuesta que se puede obtener en cada uno de los procedimientos seguidos para la validación del método.

Definición de las características de practicabilidad.

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.



Puesta a punto. Características de idoneidad.

La puesta a punto de un método analítico, incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento de análisis.

El estudio de robustez se utiliza para optimizar y verificar la criticidad del valor de los parámetros del método antes de validar. A partir de este estudio se definirán las características de idoneidad o conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde en el momento del análisis, a los requisitos fijados. Dichas características se reúnen en un ensayo conocido como ensayo de idoneidad.

Características de Fiabilidad.

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.



Selectividad.

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar las interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos.

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico.

Los criterios de selectividad que debe satisfacer un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique. El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar el principio activo o de la forma farmacéutica.

El método debe evitar la interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

En el estudio de la selectividad se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipientes.



Con el fin de estudiar la capacidad del método analítico para cuantificar el principio activo en presencia de la matriz de excipientes se procede a preparar muestras correspondientes a los siguientes grupos:

Determinaciones para la Forma Farmacéutica
Matriz
Principio Activo
Matriz + Principio Activo

Se preparan seis muestras de un placebo cargado y seis de principio activo solo. La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés y las interferencias a su límite máximo establecido. Se valoran mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{dediscrepancia} = \frac{(D_i - D_s)}{D_s} \times 100$$

Donde:

D_i = Respuesta media con interferencia

D_s = Respuesta media sin interferencia

También sería de aplicación una prueba t de Student para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los dos grupos.



Linealidad y Rango

Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Se suele evaluar la linealidad de los métodos en un rango de 80- 120 %, recomendado por la ICH (International Conference of Harmonization).

Procedimientos de determinación de la Linealidad.

- Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K = 5^\circ$, N° de réplicas = 3) con un total de 15 determinaciones ($n = 15$). Por ejemplo: 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones.
- El número de repeticiones de cada muestra (por ejemplo el número de inyecciones en HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento analítico a validar.

Para evaluar la linealidad se utilizan las siguientes fórmulas:

Ecuación de la recta:

$$y = b * x_i + a$$

Valor estimado para x_i

$$\hat{y}_i = b * x_i + a$$

Valor residual

$$e_i = \hat{y}_i - y_i$$

i grupos



$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Término Independiente

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

Pendiente

Coefficiente de Correlación

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

Coefficiente de determinación

$$r^2 = SC_{REG} / SC_T$$

Cálculo de la variancia residual

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}{n - 2} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 2} (1 - r^2) = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2} = \frac{\sum e_i^2}{n - 2}$$

Cálculo de la variancia de la pendiente

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$



Cálculo de la variancia del término independiente

$$S_a^2 = S_b^2 * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{s_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} * \frac{\sum x^2}{n}$$

ANÁLISIS DE VARIANZA

Para probar la significancia de una regresión puede utilizarse el método de análisis de varianza. Como base de la prueba el procedimiento proporciona la variabilidad total en la variable de respuesta en componentes más semejantes. La identidad del análisis de varianza es la siguiente:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Se llama a $SSE = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ la suma de los cuadrados de los errores.

y $SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ es la suma de los cuadrados de la regresión.

La suma de ambos términos se puede escribir como $SS_{yy} = SSR + SSE$

Donde $SS_{yy} = \sum_{n=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ es la suma total de cuadrados corregidos de y.

Por otro lado se tiene que $SSE = SS_{yy} - bSS_{xy}$, o puesto que $SS_{yy} = bSS_{xy} + SSE$, la suma de los cuadrados de la regresión en la ecuación es:

$$SSR = bSS_{xy}$$

La suma de los cuadrados SS_{yy} tiene n-1 grados de libertad, y SSR y SSE tienen 1 y n-2 grados de libertad, respectivamente.

Si la hipótesis nula $H_0: b=0$ es verdadera, el estadístico



$$F_0 = \frac{SSR/1}{SSE/(n-2)} = \frac{MSR}{MSE}$$

Sigue a la distribución $F_{1,n-2}$, con lo que H_0 debe de rechazarse si $F_0 > F_{\alpha,1,n-2}$.

Las cantidades $MSR = SSR/1$ y $MSE = SSE/(n-2)$ recibe el nombre de medias de cuadrados.

Lo usual es acomodar el procedimiento de prueba en una **tabla de análisis de varianza**.

Tabla de ANOVA.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias de cuadrados	F_0
Regresión	$SSR = bSS_{xy}$	1	MSR	MSR/MSE
Error	$SSE = SS_{yy} - bSS_{xy}$	n-2	MSE	
Total	SS_{yy}	n-1		

Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.

En la recta de regresión $y = \mathbf{b} * \mathbf{x} + \mathbf{a}$, \mathbf{x} es la concentración, \mathbf{y} la respuesta, \mathbf{b} el valor de la pendiente y, \mathbf{a} el término independiente.

La pendiente \mathbf{b} se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad. El término independiente \mathbf{a} , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error matemático.

Coefficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²)

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable \mathbf{x} (concentración), y la variable \mathbf{y} (respuesta). Su valor máximo es **1**. Si \mathbf{r} es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables. El valor recomendado para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 .



Variancia residual constante (homoscedasticidad)

La representación de los residuales e_i aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abcisas).

Análisis de la Variancia: ANOVA

Para poder realizar una ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

- A) Homogeneidad de variancias
- B) Normalidad de los residuales
- A) Homogeneidad de variancias

La homogeneidad de variancias se puede comprobar aplicando un test de Cochran que indicará si el factor de concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados.

El valor de G_{exp} se calcula de la siguiente forma:

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{máxima}}}{\sum s_i^2} = \frac{s^2_{\text{máxima}}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

Donde:

s_i^2 = Variancia de cada grupo

$s^2_{\text{máxima}}$ = Variancia máxima de los grupos

$$G_{\text{tablas}} = (\alpha = 0.05, K = 5, n = 3) = 0.68$$

Las variancias no deben ser estadísticamente diferentes entre sí para el grado de significación escogido, generalmente $\alpha = 0.05$.

- B) Normalidad de los residuales

La normalidad de los residuales se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobados estos supuestos, se calcularán los estadísticos F_1 y F_2 .

$F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tablas}}$ demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0



$F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tablas}}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos

Los valores tabulados para F se obtienen de las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0.05.

Test de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

a) Coeficientes de variación de los factores de respuesta(f)

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Los valores recomendados del coeficiente de variación no deben ser superiores al 2%.

$$f = \frac{y_i}{x_i}$$

Procedimiento a seguir:

- Corregir respuestas ($y_i - a$).
- Calcular f para cada concentración.
- Determinar \bar{f} (promedio de los factores respuesta) y s_f (desviación estándar de los factores respuesta).
- Calcular el coeficiente de variación **CV (%)**.

$$CV = \frac{s_f}{\bar{f}} * 100.$$

Donde:

s_f = Desviación estándar de los factores de respuesta

\bar{f} = Valor medio de los factores de respuesta

b) Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de Student.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{s_b} \quad s_b \text{ Se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual } s_{y,x}^2$$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0.05.



También es habitual calcular los intervalos de confianza a partir de la expresión: $b \pm t * s_b$, siendo en este caso t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación α igual a 0.05. Estos intervalos de confianza no deben incluir el cero.

Test de proporcionalidad

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor nominal.

Para llevar a cabo este test se recurre a una prueba de significación t de Student ($n-2$ grados de libertad, $\alpha= 0.05$):

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a} \quad s_a \text{ Se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual } s_{y,x}^2$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido.

En los intervalos de confianza $(a \pm t * s_a)$ debe estar incluido el cero.

Precisión

Expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las mismas condiciones prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos tiempo, etc.)

Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto.

Precisión Intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula de la siguiente manera:



$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media aritmética de los resultados

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. El número de replicados se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método. La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación.

- Repetibilidad del sistema instrumental.

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces.

Para especialidades farmacéuticas y materia prima suelen aceptarse valores inferiores al 1-2%.

- Repetibilidad del método.

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analizan independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Existen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a 3 niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (total de 9 muestras).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de concentración a cada nivel de concentración estudiado.

- a) Coeficiente de Variación.

El cálculo permite deducir el número de replicados que se deben realizar en el método de ensayo para un determinado intervalo de aceptación.

$$CV = |100 - LA| * \frac{\sqrt{n}}{Z}$$

Donde:

LA = Valor límite aceptado. n = Número de replicados que se deben realizar en el método de análisis.

$Z = (\alpha = 0.01) = 2.58$



Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el CV del método.

$$CV_{\text{método}} = CV_{\text{sistema}} * \sqrt{2}$$

b) Intervalos de confianza. Se calculan a partir de:

-Los resultados individuales $\bar{x} \pm t * s$

-Los resultados promedios $\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$

Donde:

\bar{x} = Media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t = Valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha = 0.05$

n = Número de análisis.

s = Desviación estándar.

Precisión Intermedia: Determina la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc.

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, considerando cada resultado independientemente.

Se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método.

Exactitud

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

En la práctica la exactitud puede ser determinada de la siguiente manera:

- Cuando no existe un material certificado se procede a la fortificación de la matriz de interés, como mínimo, con un nivel de concentración conocida del analito. En general, se asume que deben ejecutarse dos o tres niveles de fortificación con tres replicados como mínimo o mejor cinco replicados de la misma matriz homogénea para cada nivel.

Los niveles de concentración a usar para la fortificación deben cubrir la variación de interés e incluir una concentración próxima al límite de cuantificación.



En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

-Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{x_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Diferencia} = x_m - \mu$$

Donde:

x_m = Valor medio hallado

μ = Valor aceptado como verdadero

Para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados se utiliza un test de igualdad de variancias de varios grupos maestres del mismo tamaño como puede ser el test de Cochran.

$$G_{\text{exp}} = s_{\text{máx}}^2 + s_1^2 + s_2^2 + s_3^2$$

$$G_{\text{tablas}} (\alpha = 0.05; k, n)$$

Donde k el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo.

Al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ significa que las variancias de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Para confirmar se aplica un test de t:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - x| * \sqrt{n}}{CV}$$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 por lo que la exactitud es correcta.



Espectroscopía

La Espectroscopía o Espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción por las diferentes sustancias de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática (15).

La luz ultravioleta se extiende aproximadamente de 1 a 350 nm y la visible de 350 a 800 nm. La región ultravioleta se divide por comodidad en ultravioleta lejano (de 1-200 nm) y ultravioleta próximo (200-400 nm).

Una transición espectroscópica es la energía requerida para llevar una molécula de un estado de baja energía (estado basal o fundamental) a un estado de alta energía (estado excitado).

La luz visible y la ultravioleta proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas. Los espectros visibles y ultravioleta se conocen, pues, como espectros electrónicos.

Transmitancia

Si un haz de radiación paralela atraviesa una capa de solución de una especie absorbente de concentración c , de b cm de grosor provoca una interacción entre los fotones y las partículas absorbentes; la potencia del haz se atenúa de P_0 hasta P . La Transmitancia T de la solución es por tanto, la fracción de radiación incidente transmitida por la solución.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

A menudo, se expresa la Transmitancia como un porcentaje:

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100$$

Absorbancia

La absorbancia A de una solución viene definida por:

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P}$$

A diferencia de la Transmitancia, la absorbancia de una solución aumenta cuanto mayor es la atenuación del haz.



Absortividad y Absortividad Molar (16)

La absorbancia es directamente proporcional a la longitud b de la trayectoria a través de la solución, y a la concentración c de la especie absorbente. Estas relaciones se expresan por:

$$A = abc$$

En la que a es una constante de proporcionalidad denominada Absortividad. La magnitud de a dependerá de las unidades utilizadas para b y c . a menudo b se expresa en cm, y c en gramos por litro. Entonces la Absortividad tiene unidades $Lg^{-1}cm^{-1}$.

Cuando la concentración de $A = abc$ se expresa en moles por litro y la longitud de la cubeta en cm, la Absortividad se denomina Absortividad molar y se representa con el símbolo ϵ . Cuando b se da en cm y c en moles por litro.

$$A = \epsilon bc$$

En la que ϵ tiene unidades de $Lmol^{-1}cm^{-1}$.

Ley de Beer

Esta ley establece que:

La absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción. Es decir:

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

La ley de Beer se aplica a soluciones que contengan más de una clase de especie absorbente.

Limitaciones de la Ley de Beer.

La Ley de Beer sólo describe bien el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas; en este sentido es una ley límite. A concentraciones elevadas ($> 0.01 M$), la distancia promedio entre las especies responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada uno afecta a la distribución de carga de sus vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de que las especies absorban a una determinada longitud de onda de radiación. Dado que el grado de interacción depende de la concentración, el hecho de que ocurra este fenómeno causa ciertas desviaciones de la relación lineal entre la absorbancia y la concentración.



Análisis de Multicomponentes (17).

Cuando en una muestra se encuentra más de un componente, ésta puede ser objeto de un análisis multicomponente, técnica que permite determinar cuantitativamente los diversos componentes de una mezcla sin separación previa. Esto es posible siempre que los espectros de absorción de los componentes por analizar no sean idénticos. Se determina el espectro de cada componente que se absorbe en el intervalo de longitudes de onda empleadas y se almacena en la memoria como un patrón.

Espectrofotometría derivada.

En la Espectrofotometría derivada, los espectros se obtienen representando la derivada primera o de orden más alto de la absorbancia o de la transmitancia con respecto a la longitud de onda en función de esta. Estas representaciones muestran detalles espectrales que se pierden en un espectro ordinario. Las medidas de la concentración de un analito en presencia de una interferencia pueden ser, a veces, más fáciles o más precisas. Desafortunadamente, las ventajas de los espectros derivados son contrarrestadas, al menos parcialmente, por una degradación en la señal-ruido que acompaña a las derivadas obtenidas. En muchas zonas de las regiones del ultravioleta y del visible, sin embargo, la relación señal-ruido no es un factor limitante serio; es aquí donde los espectros derivados se utilizan más.

Un espectro en derivadas es la representación gráfica del cociente diferencial:

$$\frac{dA}{d\lambda} \text{ Primera Derivada.}$$

A es la absorbancia y λ la longitud de onda. La primera derivada del espectro también puede definirse como la representación gráfica de la pendiente de la curva de absorbancia en un punto cualquiera de la zona que se estudia.



Expresión de la derivada de curvas de Gauss.

Del recubrimiento parcial de numerosas bandas diferentes de tipo gaussiano resulta un espectro de absorción electrónico. Los estudios teóricos se refieren a este tipo de curvas, más fáciles de analizar que los espectros reales.

La expresión matemática de una banda gaussiana es la siguiente:

$$A = A_{m\acute{a}x} \exp\left[\frac{-(\lambda - \lambda_{m\acute{a}x})^2}{2L^2}\right]$$

y su derivada de orden n expresa mediante la fórmula:

$$A_n = S \cdot \frac{A_{m\acute{a}x}}{L^n} \cdot \exp\left[\frac{-(\lambda - \lambda_{m\acute{a}x})^2}{2L^2}\right] \cdot p$$

$$p = b_0 - b_1^x + b_2^{x^2} - b_3^{x^3} + b_4^{x^4} - b_5^{x^5}$$

A = absorbancia a una λ determinada.

$A_{m\acute{a}x}$ = absorbancia máxima a la longitud de onda $\lambda_{m\acute{a}x}$.

λ = longitud de onda.

L = mitad del ancho de la banda a la altura de los puntos de inflexión.

n = orden de la derivada

b_0, b_1, \dots = coeficientes del polinomio.

$$x = \frac{(\lambda - \lambda_{m\acute{a}x})^2}{2L^2}$$



Puntos notables y signos de las curvas de las derivadas.

La primera derivada representa la pendiente del espectro, se anula en las longitudes de onda de los máximos y pasa por los puntos extremos en las longitudes de onda de los puntos de inflexión. Es de signo positivo en las porciones ascendentes de la curva original y de signo negativo en sus partes descendentes.

Aspecto de las bandas.

Las bandas de un espectro en derivadas son de dos tipos:

- Las bandas principales, centrales, las más intensas.
- Las bandas satélites, más pequeñas, que rodean las bandas principales.

Una de las características sobresalientes de esas bandas en derivadas es la reducción notable del ancho de la banda principal a media altura con el aumento del orden de la derivada. Sin embargo, esta mejoría de la resolución la reduce el aumento concomitante del número y la amplitud relativa de las bandas satélites que dificultan la lectura e interpretación del espectro, razones por las cuales la importancia de la espectrofotometría disminuye después de la cuarta derivada.

Intensidad de la señal.

La intensidad que se mide disminuye cuando el orden de la derivada aumenta, lo que requiere, por consiguiente, ampliar la señal obtenida.

La intensidad de la señal es inversamente proporcional (de manera exponencial) al orden de la derivada y al ancho del pico a media altura, lo que significa que mientras mayor sea el orden de la derivada, más se amplifican las bandas estrechas en relación con las bandas anchas.

Espectros reales.

Por definición, los espectros reales son curvas experimentales que se originan por la superposición de varias curvas gaussianas desconocidas. A priori, es imposible conocer su ecuación y calcular su derivada. El único enfoque válido es el razonamiento intuitivo que se basa en el cambio de la pendiente de los espectros.



Para obtener espectros en derivadas se siguen dos enfoques experimentales:

- Espectrofotometría con modulación de longitud de onda o de dos longitudes de onda que actúan sobre el haz luminoso en la parte óptica del espectrofotómetro.
- Diferenciación electrónica, taquímetros mecánicos y diferenciación digital que transforman la señal que da el espectrofotómetro.

En conclusión, la espectrofotometría en derivadas ofrece las siguientes ventajas:

- Determinación precisa de la posición de los máximos de absorción y de los puntos de inflexión.
- Mejoría de la resolución espectral (aumento de la especificidad).
- Mediciones cuantitativas directas en medio turbio o coloreado.
- Mediciones cuantitativas en sistemas complejos.



MATERIAL Y MÉTODO



Método

Tipo de Estudio: Experimental

Área de Estudio: Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas, ubicada en el Complejo Docente de la Salud, Campus Médico.

Población de Estudio: 10000 Tabletas de Loratadina 5mg y Clorhidrato de Pseudoefedrina 120 mg, correspondientes al 100% producidas por el Laboratorio Ceguel.

Muestra: 100 tabletas que contienen Loratadina 5 mg y Clorhidrato de Pseudoefedrina 120 mg del lote # 090803, que corresponde al 1% de la población total.

Unidad de Análisis: Tabletas de Loratadina 5 mg y Clorhidrato de Pseudoefedrina 120 mg.

Método de Recolección: Las tabletas fueron proporcionadas por Laboratorio Ceguel. A esta muestra se le aplicó el método de análisis por Espectrofotometría UV.

Procedimiento: Se realizó en coordinación con el responsable de este estudio monográfico y el responsable del Laboratorio Ceguel.

Plan de Análisis: El análisis de datos se realizó a través del programa de EXCEL XP, presentando la información a través de cuadros y gráficos

Material:



Reactivos:

- Solventes y Soluciones de :
 - Ácido Clorhídrico, grado reactivo JT Baker.
 - Agua Destilada producida por el sistema de destilación Classic Electrically Heated Stills.
- Estándares y Muestras de:
 - Loratadina proporcionada por Laboratorios Ceguel
 - Clorhidrato de Pseudoefedrina proporcionado por Laboratorio Ceguel
 - Muestra: Tabletas de Loratadina 5 mg y Clorhidrato de Pseudoefedrina 120 mg producidas por Laboratorios Ceguel. Lote No 09803

Equipos:

I. Cristalería:

- Matraz volumétrico de 50, 100 y 250 ml.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Mortero y pilón.
- Balones de 25, 100, 1000 ml.
- Pera.
- Beacker de 25, 100 y 250 ml.
- Espátula

II. Instrumentos:

- Agitador magnético y magneto
- Sonificador.
- Sistema de Espectroscopia UV HP 8453 compuesto por: espectrofotómetro HP 8453; computadora HP Ventra; software ChemStation UV-Visible y una impresora HP Desk Jet.
- Balanza Analítica. Balance Electronic AC 115V, Serie No. 470233.
- Calculadora Casio Fx-82.

Metodología Analítica:

- Preparación de los Reactivos.



* Solución de Ácido Clorhídrico 0.1 N.

- En un balón de 1000 ml con 250 ml de agua destilada añadir 8.5 ml HCl, aforar con agua destilada.

- Preparación de las soluciones Patrón.

Preparación para Loratadina

1. Pesar una cantidad de Loratadina de pureza conocida equivalente a 25 mg.

1.1. Pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con HCl 0.1 N.

1.2. Tomar alícuotas de 2, 4,8, 12 y 16 ml de la solución anterior.

1.3. Transferir estas alícuotas a matraces volumétricos de 100 ml, aforar con HCl 0.1 N, para obtener soluciones con concentraciones de 5, 10,20, 30 y 40 ug/ml de Loratadina respectivamente.

Preparación para Clorhidrato de Pseudoefedrina

2. Pesar una cantidad de Clorhidrato de Pseudoefedrina de pureza conocida equivalente a 500 mg.

2.1. Pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con HCl 0.1 N.

2.2. Tomar alícuotas de 4,6, 10, 14 y 16 ml de la solución anterior.

2.3. Transferir estas alícuotas a matraces volumétricos de 100 ml, aforar con HCl 0.1 N, para obtener soluciones con concentraciones de 200, 300, 500, 700 y 800 ug/ml de Clorhidrato de Pseudoefedrina respectivamente.



- Preparación de las Muestras.
 1. Pesar 20 tabletas, calcular su peso promedio.
 2. Triturar hasta polvo fino.
 3. Pesar una cantidad de polvo equivalente al peso de una tableta.
 4. Pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de HCl 0.1 N.
 5. Agitar por 30 minutos en el agitador magnético y luego al sonificador por 10 minutos.
 6. Aforar con HCl 0.1 N.
 7. Tomar alícuotas de 5, 7 y 10 ml de la solución anterior.
 8. Transferir a matraces volumétricos de 25 ml, aforar con HCl 0.1 N para obtener soluciones con concentraciones de Loratadina de 10, 14 y 20 ug/ml; de Clorhidrato de Pseudoefedrina igual a 240, 336 y 480 ug/ml, respectivamente.

Procedimiento:

Obtener las absorbancias de las soluciones patrón y de las soluciones de la muestra para cada uno de los principios activos a una longitud de onda máxima de absorción de 307 nm para la Loratadina y 261.2 nm para la Pseudoefedrina.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo del Método de Análisis.

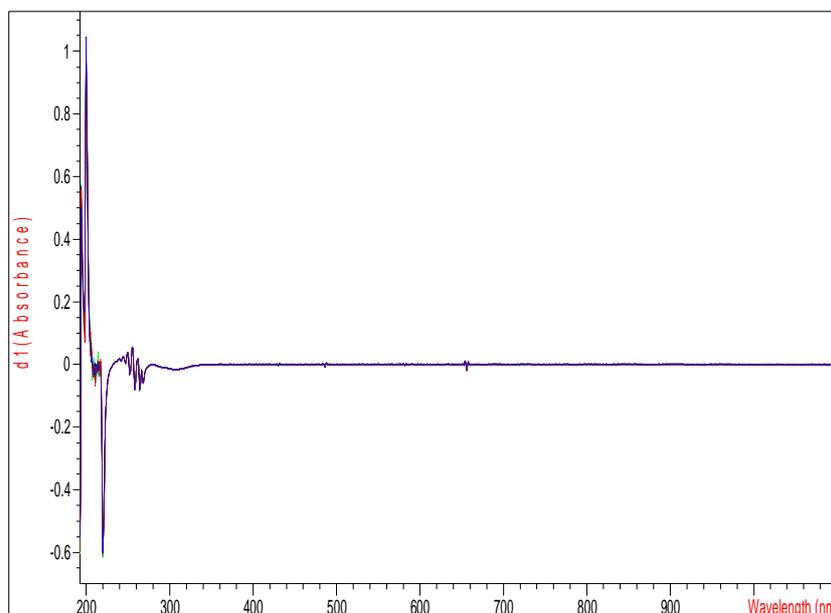


El presente estudio se basó en la investigación de Feyyaz Onur, Cem Yücesoy, Saadet Dermis, Murat Kartal, Gamze Kökdil (18) para determinar simultáneamente Loratadina y Pseudoefedrina en tabletas haciendo algunas modificaciones en las longitudes de onda, en el espectrofotómetro (En el estudio se utilizó un instrumento de arreglo de diodos), en condiciones ambientales y matrices diferentes; variando las concentraciones de los estándares y muestras cuando se obtuvieron las gráficas de orden cero y de primer orden y utilizando concentraciones más bajas.

Control del Disolvente.

Se determina la absorbancia del disolvente (HCl 0.1 N) frente al aire; la absorbancia debe ser inferior de 0.40 y preferiblemente menor de 0.2.

Figura 1.



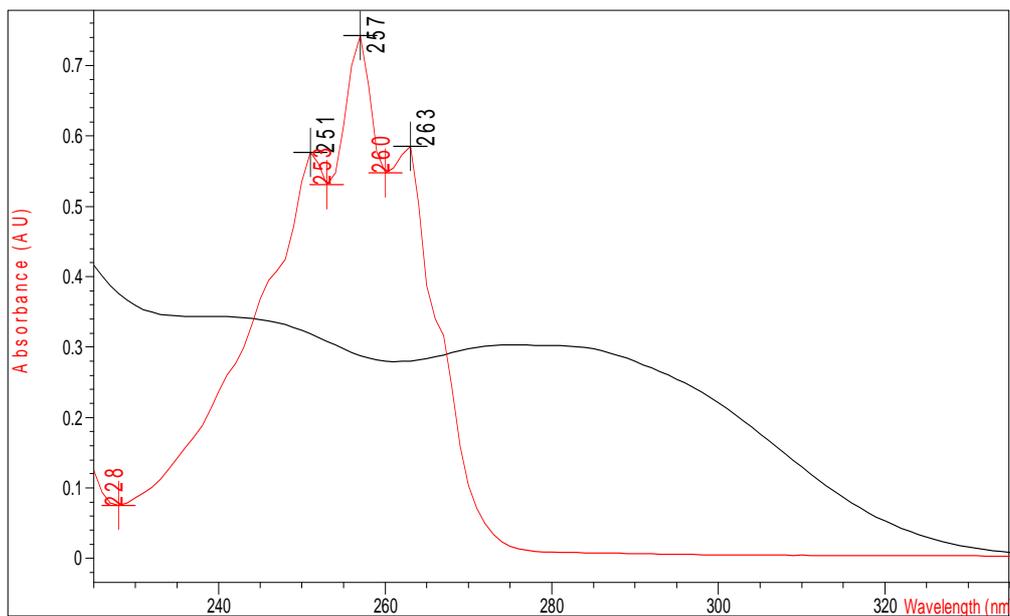
El gráfico del blanco muestra la absorbancia obtenida, donde puede comprobarse que es menor al 0,20 en todo el espectro.

Derivada de Orden Cero.



Para la obtención de estos resultados se utilizó una mezcla de Loratadina (12.65 ug/ml) y Pseudoefedrina (763.8 ug/ml) en 0.1 N de HCl; en un rango de longitud de onda de 230-325nm. Se puede observar que para el máximo de absorción de la Loratadina la interferencia de la Pseudoefedrina es mínima; pero no así para el caso de la Pseudoefedrina donde se produce una interferencia significativa por parte de la Loratadina.

Figura 2.



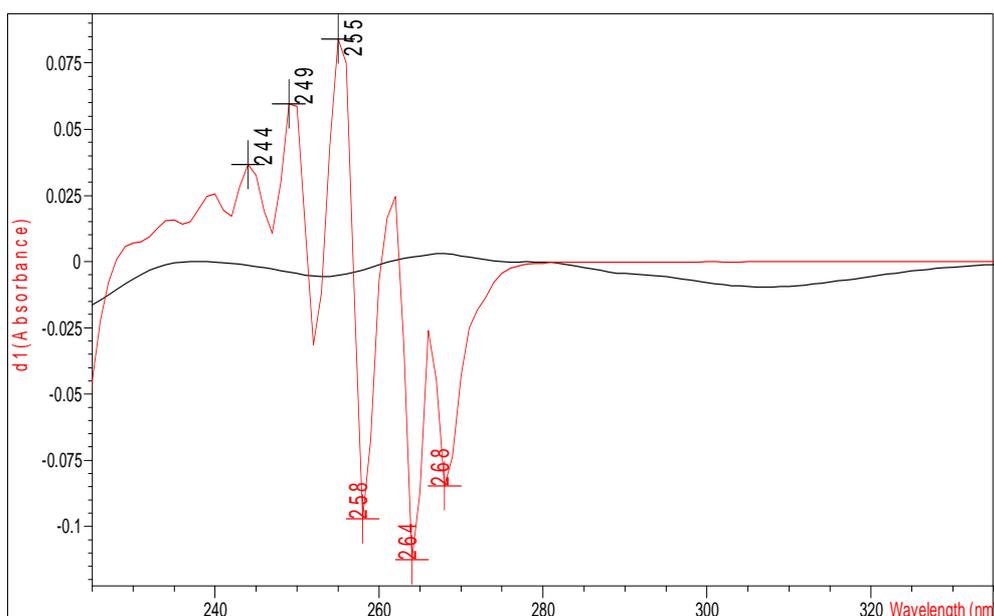
- La Línea Roja representa a la Pseudoefedrina.
- La Línea Negra representa a la Loratadina.

Derivada de Primer Orden.



La determinación simultánea de Loratadina y Pseudoefedrina se realizó con una mezcla de éstas con una concentración de 12.65 ug/ml para Loratadina y de 763.8 ug/ml para Pseudoefedrina a longitud de onda de 307nm y 261.2 nm respectivamente. Se observa que en estas longitudes de onda no se producen interferencias entre los analitos estudiados.

Figura 3.



- La Línea Roja representa a la Pseudoefedrina.
- La Línea Negra representa a la Loratadina.

2. Validación del Método de Análisis.



Linealidad del Sistema para Loratadina.

La Linealidad del sistema fue comprobada con 5 soluciones de Loratadina patrón, en dos días diferentes y a diferentes concentraciones, que abarca un intervalo donde se incluye la concentración teórica de la muestra en estudio (25-200%).

Los resultados obtenidos se plasman en las siguientes tablas. Se muestran los resultados obtenidos en los dos días de análisis.

Tabla 1.

Día 1			Día 2		
Curva de Calibrado de Loratadina			Curva de Calibrado de Loratadina		
Concentración(ug/ml)	Absorbancia	Factor f	Concentración(ug/ml)	Absorbancia	Factor f
5	-3,77E-03	-7,54E-04	5	-3,78E-03	-7,55E-04
5	-3,80E-03	-7,59E-04	5	-3,71E-03	-7,42E-04
5	-3,83E-03	-7,66E-04	5	-3,64E-03	-7,28E-04
10	-7,90E-03	-7,90E-04	10	-7,55E-03	-7,55E-04
10	-7,92E-03	-7,92E-04	10	-7,59E-03	-7,59E-04
10	-7,87E-03	-7,87E-04	10	-7,59E-03	-7,59E-04
20	-1,56E-02	-7,79E-04	20	-1,51E-02	-7,55E-04
20	-1,56E-02	-7,82E-04	20	-1,52E-02	-7,61E-04
20	-1,55E-02	-7,77E-04	20	-1,52E-02	-7,60E-04
30	-2,35E-02	-7,83E-04	30	-2,32E-02	-7,72E-04
30	-2,35E-02	-7,84E-04	30	-2,30E-02	-7,66E-04
30	-2,36E-02	-7,87E-04	30	-2,30E-02	-7,66E-04
40	-3,13E-02	-7,82E-04	40	-3,09E-02	-7,72E-04
40	-3,13E-02	-7,82E-04	40	-3,10E-02	-7,76E-04
40	-3,13E-02	-7,82E-04	40	-3,09E-02	-7,72E-04

Tabla 2.

Loratadina Día 1	Loratadina Día 2
------------------	------------------



	Absorbancia	Des Es	Varianza		Absorbancia	Des Es	Varianza
5	-3,77E-03	3,007E-05	9,046E-10	5	-3,78E-03	6,794E-05	4,616E-09
5	-3,80E-03			5	-3,71E-03		
5	-3,83E-03			5	-3,64E-03		
10	-7,90E-03	2,260E-05	5,109E-10	10	-7,55E-03	2,255E-05	5,086E-10
10	-7,92E-03			10	-7,59E-03		
10	-7,87E-03			10	-7,59E-03		
20	-1,56E-02	4,476E-05	2,004E-09	20	-1,51E-02	5,632E-05	3,172E-09
20	-1,56E-02			20	-1,52E-02		
20	-1,55E-02			20	-1,52E-02		
30	-2,35E-02	5,472E-05	2,994E-09	30	-2,32E-02	1,14E-04	1,296E-08
30	-2,35E-02			30	-2,30E-02		
30	-2,36E-02			30	-2,30E-02		
40	-3,13E-02	1,001E-05	1,003E-10	40	-3,09E-02	8,611E-05	7,416E-09
40	-3,13E-02			40	-3,10E-02		
40	-3,13E-02			40	-3,09E-02		

A los resultados obtenidos (concentración y absorbancia) se les aplicó el test de homogeneidad de variancias o Test de Cochran, con el cual se obtuvo una G_{exp} para el día 1 igual a 0,459632 y una G_{exp} para el día 2 igual a 0,452004 que se comparan con G_{tablas} igual a 0,6838 para $p = 0,05$ de probabilidad en cinco concentraciones y tres replicados para cada concentración que se estudió (Tabla 2).

Al resultar $G_{exp} < G_{tablas}$ (Tabla 3) se puede afirmar que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla 3.

Analito	G_{exp}	G_{tablas}
Loratadina Día 1	0,459632	0,6838
Loratadina Día 2	0,452004	

El factor de respuesta se calcula dividiendo la absorbancia entre la concentración (Tabla 1). Se calcula el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados; expresados en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Resultados estadísticos de Loratadina. Día1	Resultados estadísticos de Loratadina. Día2
---	---



$\bar{x} = -7,79E - 04$	$\bar{x} = -7,60E - 04$
$s = 1,0998E-05$	$S = 1,24296E-05$
$CV\% = 1,41$	$CV\% = 1,64$

Al ser los coeficientes de variación de los factores de respuesta menores al 2% en ambos días, significa que hay una relación lineal en el estudio.

La ecuación de la recta de calibrado se determina con $y = m \cdot x + b$, tomando como abscisas las absorbancias y como ordenadas las concentraciones correspondientes.

Absorbancia = pendiente* conc + intercepto

Tabla 5.

Loratadina	Ecuación de la recta
Día 1	$Y = -7,84E-04 \cdot \text{conc} + 4,30128E-05$
Día 2	$Y = -7,77E-04 \cdot \text{conc} + 2,31E-04$

El coeficiente de correlación y el de determinación indican que hay una buena linealidad (Tabla 6). El coeficiente de determinación indica el grado de aproximación de los puntos en la relación lineal, es decir, que se puede afirmar que esta relación lineal explica en un 99,994% para el día 1 y 99,989% para el día 2 la variancia de las absorbancias para la Loratadina.

Tabla 6.

Loratadina		
Estadísticas de la regresión	Día 1	Día 2
Coefficiente de correlación múltiple	0,999972	0,999948005
Coefficiente de determinación r^2	0,999943	0,999896013
Error típico	0,000081	0,000109003

Se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$ (tabla 7), para terminar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad.

Tabla 7.

Loratadina	Coefficientes	Error típico	LCI 95%	LCS 95%
Intercepto	4,30128E-05	4,02032E-05	-4,384E-05	0,00012987



Día 1	Pendiente	-7,84E-04	1,63449E-06	-0,0007875	-0,0007804
Día 2	Intercepto	2,31E-04	5,4057E-05	0,00011453	0,0003481
	Pendiente	-7,77E-04	2,1977E-06	-0,0007817	-0,0007722

Los intervalos de confianza de la recta del día 1 no incluye el cero pero si está incluido el cero en el día 2; por lo tanto existe sesgo a este nivel en el día 1.

Se le aplicó un test de análisis de la variancia (ANOVA) a la recta de regresión.

Tabla 8.

Análisis de Variancia para Loratadina						
		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Día 1	Regresión	1	0,001511799	0,001511799	230034,408	5,3144E-29
	Residuos	13	8,54367E-08	6,57206E-09		
	Total	14	0,001511884			
Día 2	Regresión	1	0,001485	0,001485236	125002,438	2,799E-27
	Residuos	13	1,54E-07	1,18817E-08		
	Total	14	0,001485			

Dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 13) = 4,67 queda demostrada la existencia de una pendiente diferente de 0.

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente y test de proporcionalidad.

Tabla 9.

Test de Verificación de	Loratadina Día1		Loratadina Día 2	
	Estadístico t_{exp}	t_{tab} $g, l = 13$ $\alpha = ,05\%$	Estadístico t_{exp}	t_{tab} $g, l = 13$ $\alpha = ,05\%$

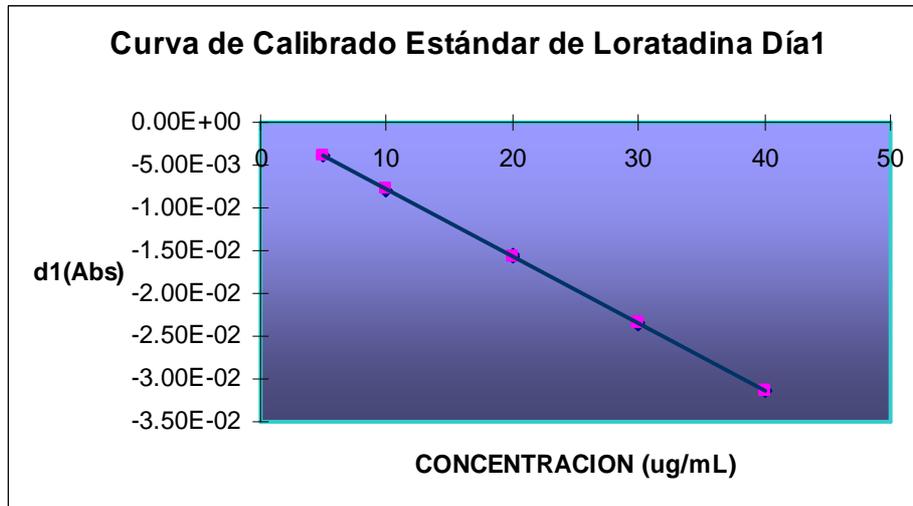


Variable independiente	1,06988478	2,16	4,27913947	2,16
Pendiente	479,619024		353,556838	

Se cumple con el test de Student de la variable independiente en el día 1 $t_{exp} < t_{tablas}$; no así en el día 2 donde se dio un error sistemático (error en la pesada o en la transferencia de volúmenes) pues, $t_{exp} > t_{tablas}$

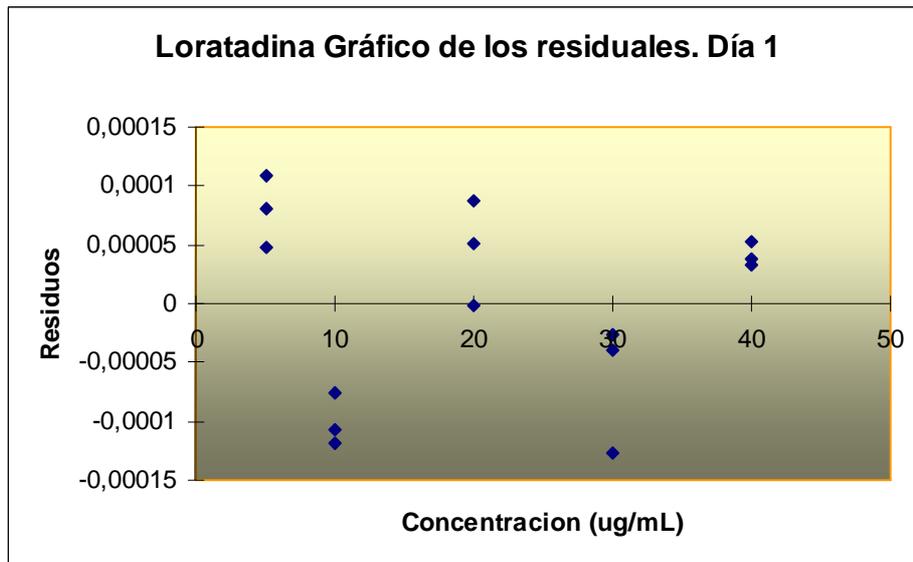
Cumple también con el test de Student de la pendiente ya que el $t_{exp} > t_{tablas}$.

Figura 4.



El gráfico demuestra la relación lineal entre la concentración y la primera derivada de la absorbancia. Los mismos comentarios se aplican al gráfico del día 2. (Fig. 6)

Figura 5.



La representación de los residuales demuestra que la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia. Los mismos comentarios se aplican al gráfico del día 2. (Fig. 7)



Figura 6.

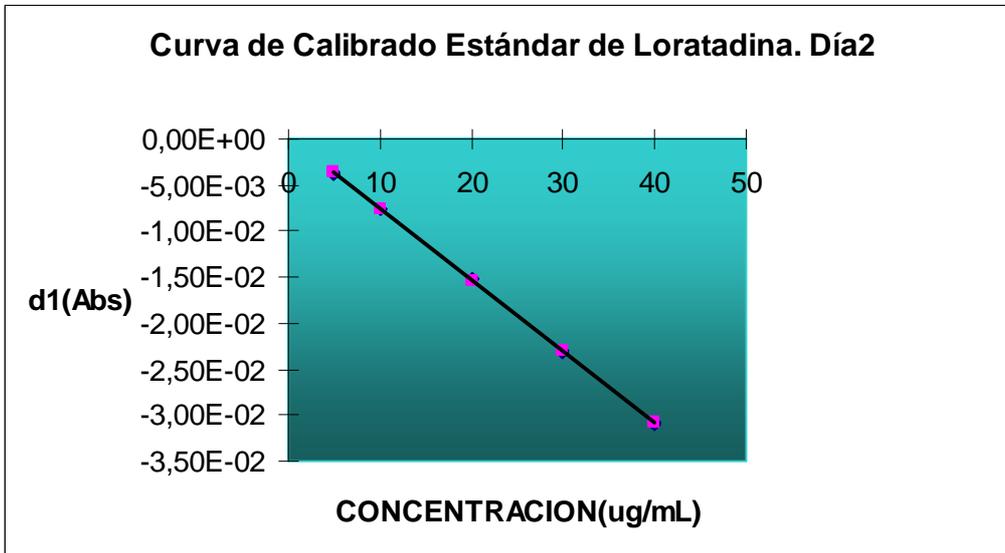
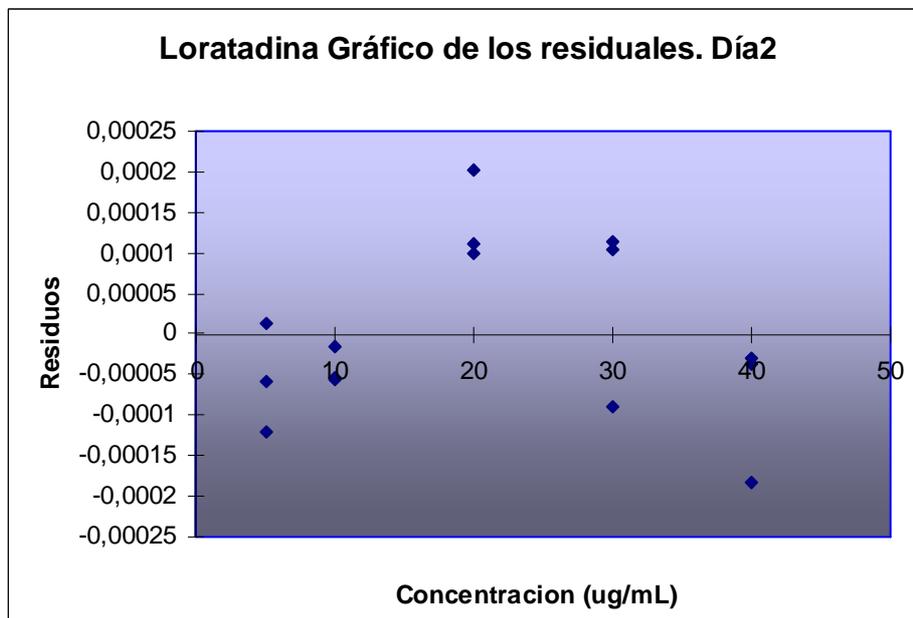


Figura 7.



Linealidad del Sistema para la Pseudoefedrina.



La Linealidad del sistema fue comprobada con 5 soluciones de Pseudoefedrina patrón, en dos días diferentes y a diferentes concentraciones, que abarca un intervalo donde se incluye la concentración teórica de la muestra en estudio (25-200%).

Los resultados obtenidos se plasman en las siguientes tablas. Se muestran los resultados obtenidos en los dos días de análisis.

Tabla 10.

Día 1			Día 2		
Curva de calibrado de Pseudoefedrina			Curva de calibrado de Pseudoefedrina		
Concentración (ug/ml)	Absorbancia	Factor f	Concentración (ug/ml)	Absorbancia	Factor f
201,6	5,18E-03	2,57E-05	200,08	5,13E-03	2,56E-05
201,6	5,14E-03	2,55E-05	200,08	5,12E-03	2,56E-05
201,6	5,11E-03	2,53E-05	200,08	5,17E-03	2,59E-05
302,4	7,59E-03	2,51E-05	300,12	7,86E-03	2,62E-05
302,4	7,64E-03	2,53E-05	300,12	7,78E-03	2,59E-05
302,4	7,66E-03	2,53E-05	300,12	7,81E-03	2,60E-05
504	1,28E-02	2,54E-05	500,2	1,29E-02	2,59E-05
504	1,28E-02	2,54E-05	500,2	1,29E-02	2,58E-05
504	1,27E-02	2,53E-05	500,2	1,29E-02	2,57E-05
705,6	1,82E-02	2,57E-05	700,28	1,80E-02	2,57E-05
705,6	1,81E-02	2,57E-05	700,28	1,80E-02	2,57E-05
705,6	1,82E-02	2,58E-05	700,28	1,80E-02	2,57E-05
806,4	2,03E-02	2,52E-05	800,32	2,03E-02	2,54E-05
806,4	2,05E-02	2,54E-05	800,32	2,02E-02	2,52E-05
806,4	2,06E-02	2,56E-05	800,32	2,02E-02	2,52E-05



	Absorbancia	Des Est	Variancia		Absorbancia	Des Est	Variancia
201,6	5,18E-03	3,60714E-05	1,30114E-09	200,08	5,13E-03	2,75226E-05	7,57493E-10
201,6	5,14E-03			200,08	5,12E-03		
201,6	5,11E-03			200,08	5,17E-03		
302,4	7,59E-03	3,29949E-05	1,08866E-09	300,12	7,86E-03	4,08438E-05	1,66821E-09
302,4	7,64E-03			300,12	7,78E-03		
302,4	7,66E-03			300,12	7,81E-03		
504	1,28E-02	3,45977E-05	1,197E-09	500,2	1,29E-02	3,8527E-05	1,48433E-09
504	1,28E-02			500,2	1,29E-02		
504	1,27E-02			500,2	1,29E-02		
705,6	1,82E-02	4,43772E-05	1,96933E-09	700,28	1,80E-02	2,35018E-05	5,52333E-10
705,6	1,81E-02			700,28	1,80E-02		
705,6	1,82E-02			700,28	1,80E-02		
806,4	2,03E-02	0,000159559	2,5459E-08	800,32	2,03E-02	7,40968E-05	5,49033E-09
806,4	2,05E-02			800,32	2,02E-02		
806,4	2,06E-02			800,32	2,02E-02		

Tabla 11.

A los resultados obtenidos (concentración y absorbancia) se les aplicó el test de homogeneidad de variancias o Test de Cochran, con el cual se obtuvo una G_{exp} para el día 1 igual a 0,820857 y una G_{exp} para el día 2 igual a 0,551642 que se comparan con G_{tablas} igual a 0,6838 para $p = 0,05$ de probabilidad en cinco concentraciones y tres replicados para cada concentración que se estudió (Tabla 11).

Al resultar $G_{exp} < G_{tablas}$ (Tabla 12) se puede afirmar que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados en el día 2; pero si en el día 1 al ser $G_{exp} > G_{tablas}$.

Tabla 12.

Analito	G_{exp}	G_{tablas}
Pseudoefedrina Día 1	0,820857	0,6838
Pseudoefedrina Día 2	0,551642	

El factor de respuesta se calcula dividiendo la absorbancia entre la concentración (Tabla 10). Se calcula el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados; expresados en la siguiente tabla:



Tabla 13.

Resultados estadísticos de Pseudoefedrina. Día1	Resultados estadísticos de Pseudoefedrina. Día2
$\bar{x} = 2,54E - 05$	$\bar{x} = 2,57E - 05$
$s = 2,07469E-07$	$s = 2,78894E-07$
$CV\% = 0,82$	$CV\% = 1.09$

Al ser los coeficientes de variación de los factores de respuesta menores al 2% en ambos días, significa que hay una relación lineal en el estudio.

La ecuación de la recta de calibrado se determina con $y = m \cdot x + b$, tomando como abscisas las absorbancias y como ordenadas las concentraciones correspondientes.

Absorbancia = pendiente* conc + intercepto

Tabla 14.

Pseudoefedrina	Ecuación de la recta
Día 1	$Y = 2,5585E-05 \cdot \text{conc} + (-6,0384E-05)$
Día 2	$Y = 2,52057E-05 \cdot \text{conc} + 2,04E-04$

El coeficiente de correlación y el de determinación indican que hay una buena linealidad (Tabla 15). El coeficiente de determinación indica el grado de aproximación de los puntos en la relación lineal, es decir, que se puede afirmar que esta relación lineal explica en un 99,964% para el día 1 y 99,954% para el día 2 la variancia de las absorbancias para la Pseudoefedrina.

Tabla 15.

Pseudoefedrina		
Estadísticas de la regresión	Día1	Día 2
Coefficiente de correlación múltiple	0,99982	0,99977
Coefficiente de determinación r^2	0,99964	0,99954
Error típico	0,0000119	0,0001323

Se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$ (tabla 16), para terminar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad.



Tabla 16.

Pseudoefedrina		Coeficientes	Error típico	LCI 95%	LCS 95%
Día 1	Intercepto	-6.0385E-05	7,41611E-05	2,21E-04	9,983E-05
	Pendiente	2,55857E-05	1,33879E-07	2,5297E-05	2,5875E-05
Día 2	Intercepto	2,04E-04	8,23687E-05	2,5808E-05	3,82E-04
	Pendiente	2,52057E-05	1,49825E-07	2,4882E-05	2,5529E-05

Los intervalos de confianza de la recta de ambos días no incluyen el cero por lo tanto no existe sesgo este nivel.

Se le aplicó un test de análisis de la variancia (ANOVA) a la recta de regresión.

Tabla 17.

Análisis de Variancia para Pseudoefedrina						
		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Día 1	Regresión	1	5,19E-04	5,19E-04	36523,4607	8,31E-24
	Residuos	13	1,85E-07	1,42E-08		
	Total	14	5,19E-04			
Día 2	Regresión	1	4,96E-04	4,96E-04	28602,6237	4,36E-23
	Residuos	13	2,28E-07	1,75E-08		
	Total	14	4,96E-04			

Dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 13) = 4,67 queda demostrada la existencia de una pendiente diferente de 0.

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente y test de proporcionalidad.

Tabla 18.

Test de Verificación de	Pseudoefedrina Día1	Pseudoefedrina Día 2
-------------------------	---------------------	----------------------

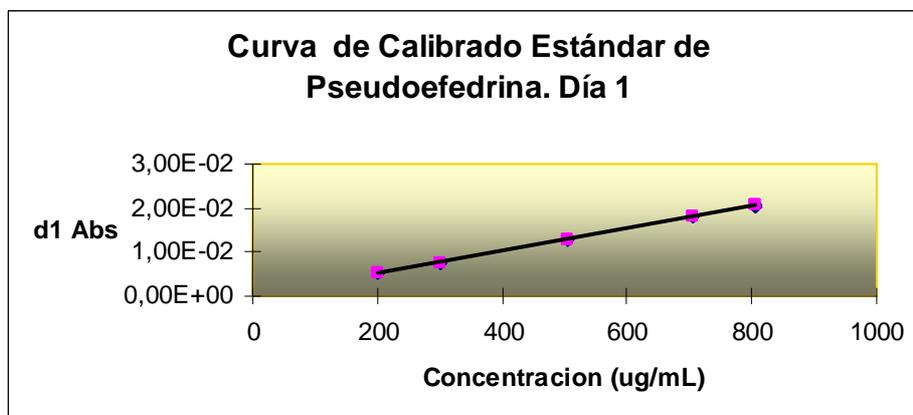


	<i>Estadístico</i> t_{exp}	t_{tab} $g, l = 13$ $\alpha = ,05\%$	<i>Estadístico</i> t_{exp}	t_{tab} $g, l = 13$ $\alpha = ,05\%$
Variable independiente	-0,814239508	2,16	2,47369559	2,16
Pendiente	191,1111213		168,233864	

Se cumple con el test de Student de la variable independiente en el día 1 al ser $t_{exp} < t_{tablas}$, no así en el día 2 donde $t_{exp} > t_{tablas}$ debido a un error sistemático (error en la pesada o transferencia de volúmenes).

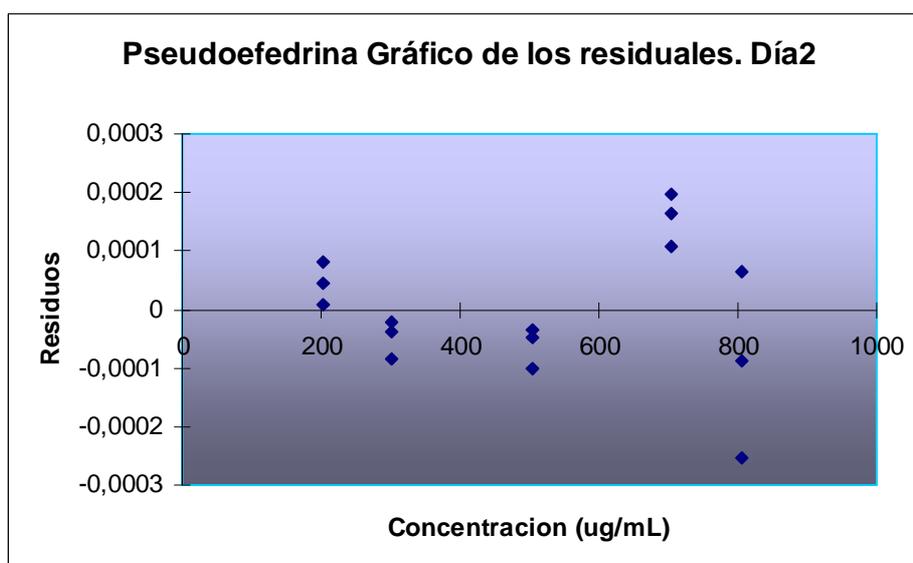
Cumple también con el test de Student de la pendiente ya que el $t_{exp} > t_{tablas}$.

Figura 8.



El gráfico demuestra la relación lineal entre la concentración y la primera derivada de la absorbancia. Los mismos comentarios se aplican al gráfico del día 2. (Fig. 10)

Figura 9.



La representación de los residuales demuestra que la distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia. Los mismos comentarios se aplican al gráfico del día 2. (Fig. 11)

Figura 10.

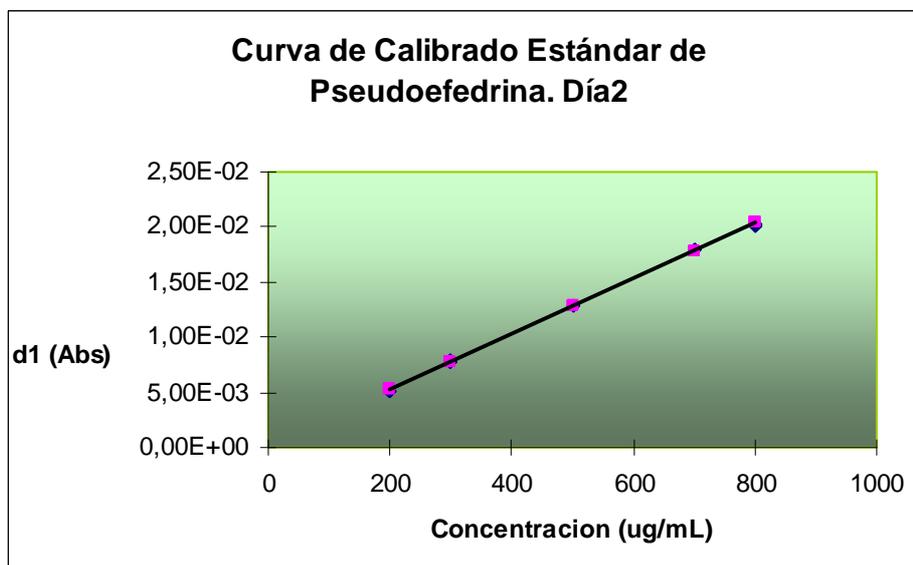
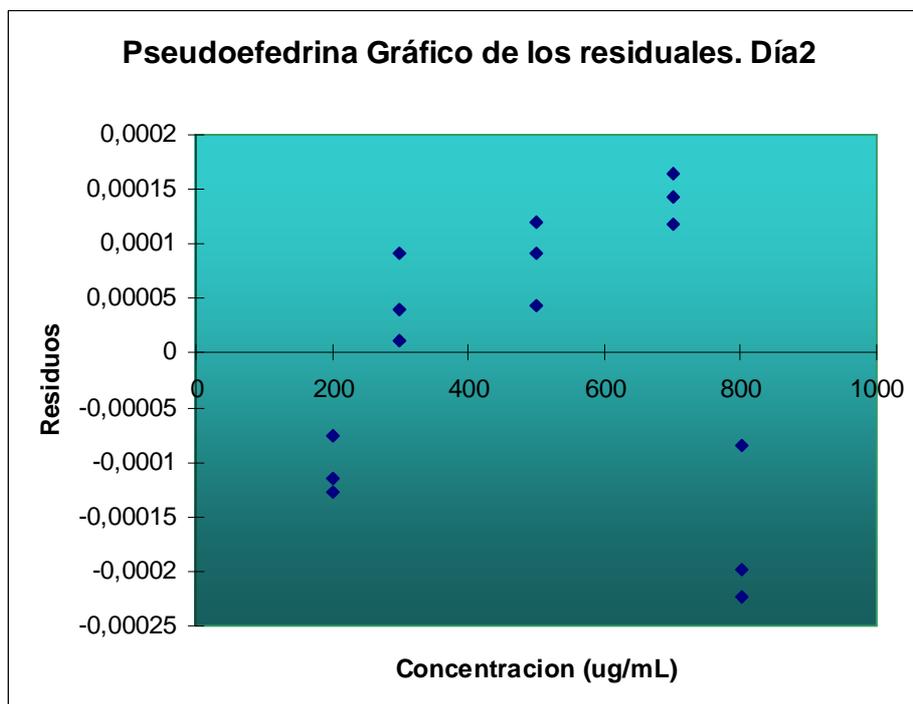


Figura 11.



Exactitud y Precisión del Método para Loratadina.



Para evaluar la exactitud y la precisión del método se trabajó a tres concentraciones diferentes y por triplicado cada una.

Loratadina. Día 1				Loratadina. Día 2			
Absorbancia	Conc teórica	Conc calculd	%R	Absorbancia	Conc teórica	Conc calculd	%R
-7,23E-03	10	9,28	92,83	-7,38E-03	10	9,79	97,94
-7,70E-03	10	9,87	98,72	-7,30E-03	10	9,69	96,95
-7,73E-03	10	9,92	99,19	-7,02E-03	10	9,33	93,32
-1,04E-02	14	13,33	95,19	-1,02E-02	14	13,45	96,09
-1,05E-02	14	13,45	96,10	-1,01E-02	14	13,27	94,75
-1,05E-02	14	13,46	96,13	-1,01E-02	14	13,27	94,75
-1,47E-02	20	18,83	94,13	-1,47E-02	20	19,22	96,11
-1,47E-02	20	18,87	94,33	-1,44E-02	20	18,78	93,89
-1,47E-02	20	18,79	93,96	-1,45E-02	20	19,00	94,98
$\bar{x} = 95,62$ $s = 2,16355162$ $CV\% = 2,26$				$\bar{x} = 95,42$ $s = 1,47695874$ $CV\% = 1,55$			

Como muestra la tabla anterior, los resultados expresan que existe precisión (repetibilidad) en el método, ya que el CV en ambos días es menor de 3% para el análisis de métodos espectrofotométrico. Obteniéndose mayor precisión el día 2.

Se considera que el método presenta exactitud ya que la recuperación media se encuentra en el rango establecido de 90-110% de recuperado.

El cálculo del intervalo de confianza se realiza aplicando la siguiente formula:

$$\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde

$$n = 9$$

$$t = (g.l = 8, \alpha = 0,05\%) = 2,31$$

Exactitud y Precisión del método para Pseudoefedrina.



Igual que para la Loratadina, la exactitud y precisión del método para la Pseudoefedrina se calculó con tres concentraciones diferentes y cada una por triplicado.

Pseudoefedrina. Día 1				Pseudoefedrina. Día 2			
Absorbancia	Conc teórica	Con calculada	%R	Absorbancia	Conc teórica	Conc calculada	%R
5,41E-03	240	213,90	89,12	5,82E-03	240	222,81	92,84
5,88E-03	240	231,99	96,66	5,89E-03	240	225,78	94,08
5,78E-03	240	228,35	95,14	6,09E-03	240	233,44	97,27
7,93E-03	336	312,29	92,94	8,57E-03	336	331,88	98,77
8,03E-03	336	316,15	94,09	8,52E-03	336	329,92	98,19
8,11E-03	336	319,38	95,05	8,41E-03	336	325,60	96,90
1,14E-02	480	447,33	93,19	1,22E-02	480	474,47	98,85
1,14E-02	480	448,74	93,49	1,22E-02	480	474,74	98,91
1,15E-02	480	451,44	94,05	1,21E-02	480	473,51	98,65
$\bar{x} = 93,7503288$ $s = 2,08479789$ $CV\% = 2,22$				$\bar{x} = 97,16$ $s = 2,23750118$ $CV\% = 2,30$			

Los resultados que se muestran en la tabla anterior, expresan que existe precisión (repetibilidad) en el método, ya que el CV en ambos días es menor de 3% para métodos de análisis espectrofotométrico.

Se considera que el método presenta exactitud ya que la recuperación media se encuentra en el rango establecido de 90-110% de recuperado.

El cálculo del intervalo de confianza se realiza aplicando la siguiente formula:

$$\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde

$$n = 9$$

$$t = (g.l = 8, \alpha = 0,05\%) = 2,31$$



CONCLUSIONES

Para desarrollar el método se probaron diferentes longitudes de onda para la obtención de las condiciones óptimas de la primera derivada para cada uno de los compuestos analizados.



En vista de los resultados obtenidos en este estudio se demuestra que el método analítico propuesto es factible para el análisis de tabletas de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por Espectrofotometría UV.

El método desarrollado es barato, fácil y sobre todo rápido de ensayar. Utilizando el análisis estadístico de los grupos de datos se establece que el método es exacto y preciso para la determinación de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina tanto en formulaciones farmacéuticas como en productos semi-elaborados.

El método de análisis es lineal en un rango de concentración de 5-40 ug/ml para la Loratadina y de 200-800 ug/ml para la Pseudoefedrina.

Con el método analítico propuesto es posible la identificación y cuantificación de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina en productos semi-elaborados y tabletas. Este método puede ser aplicado con gran éxito para la determinación simultánea de Loratadina y Pseudoefedrina en tabletas sin interferencia de cada uno.



RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios posteriores para comparar el método espectrofotométrico con métodos cromatográficos.



2. Aplicar este método para ensayos de disolución y pruebas comparativas de perfil de disolución.

3. Estudiar la aplicabilidad de este método para estudios de estabilidad y disolución de formas farmacéuticas de Loratadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina.



BIBLIOGRAFÍA



1. Johnson R, Christensen J, Lin CC. Sensitive gas-liquid chromatographic method for the determination of loratadine and its major active metabolite, descarboethoxyloratadine, in human plasma using a nitrogen-phosphorus detector. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994 Jul 1;657(1):125-31.
2. Sutherland FC, de Jager AD, Badenhorst D, Scanes T, Hundt HK, Swart KJ, Hundt AF. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of loratadine and its major active metabolite descarboethoxyloratadine in human plasma. *J Chromatogr A.* 2001 Apr 20; 914(1-2):37-43.
3. Kunicki PK. Determination of loratadine in human plasma by high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 May 5;755(1-2):331-5.
4. Yin OQ, Shi X, Chow MS. Reliable and specific high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of loratadine and its metabolite in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Oct 25; 796(1):165-72.
5. Zhong D, Blume H. [HPLC-determination of loratadine and its active metabolite descarboethoxyloratadine in human plasma]. *Pharmazie.* 1994 Oct; 49(10):736-9.
6. El-Kousy N, Bebawy LI. Determination of some antihistaminic drugs by atomic absorption spectrometry and colorimetric methods. *J Pharm Biomed Anal.* 1999 Aug; 20(4):671-9.
7. Fernandez H, Ruperez FJ, Barbas C. Capillary electrophoresis determination of loratadine and related impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Mar 10;31(3):499-506.
8. Mabrouk MM, el-Fatary HM, Hammad S, Wahbi AA. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RP-LC and derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Nov 24;33(4):597-604.
9. Ivanovic D, Medenica M, Markovic S, Mandic G. Second-derivative spectrophotometric assay of pseudoephedrine, ibuprofen and loratadine in pharmaceuticals. *Arzneimittelforschung.* 2000 Nov; 50(11):1004-8.
10. Argekar AP, Shah SJ, Raj SV. Simultaneous determination of pseudoephedrine HCl (PSE) and terfenadine (TER) from formulations by reversed-phase ion pair high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Drug Dev Ind Pharm.* 1998 Mar; 24(3):219-23.
11. Zhang J, Xie J, Liu J, Tian J, Chen X, Hu Z. Microemulsion electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection for sensitive determination of ephedrine and pseudoephedrine. *Electrophoresis.* 2004 Jan;25(1):74-9.



12. Mansour AM. Determination of pseudoephedrine hydrochloride and carbinoxamine maleate in combination drug formulation by liquid chromatography. *J AOAC Int.* 1998 Sep-Oct; 81(5):958-62
13. Mahgoub H, Gazy AA, El-Yazbi FA, El-Sayed MA, Youssef RM. Spectrophotometric determination of binary mixtures of pseudoephedrine with some histamine H1-receptor antagonists using derivative ratio spectrum method. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Mar 26; 31(4):801-9.
14. Pérez, José Antonio y Pujol, Martí; Coordinadores. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A. E. F. I.). Pág. 23-26, 31-36, 46-47, 56-57, 61-77, 106-109, 119-121.
15. Connors A. Kenneth. Curso de Análisis Farmacéutico. Segunda Edición. Editorial Reverté. España. 1981. Pág. 195, 233, 243-245, 623-632.
16. Skoog, D. A; Leary, J. Análisis Instrumental. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill. España. 1994. Pág. 55, 67-69, 84, 107, 119-120.
17. Acezat-Mispelter. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. Coordinador Pradeau, Dominique. Primera Edición. Editorial UTELIA. México. 1998. Pág.582-585.
18. Feyyaz Onur, Cem Yücesoy, Saadet Dermis, Murat Kartal, Gamze Kökdil. Simultaneous determination of pseudoephedrine sulphate, dexbrompheniramine maleate and loratadine in pharmaceutical preparations and ratio spectra derivative spectrophotometry. *Talanta* 51 (2000) 269-279.
19. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta Edición, México (1994). Pág. 730-731.
20. British Pharmacopeia. (2002). Volumen II. Pág. 1602.
21. USAN and USP Dictionary of Drug Names. The United States. Pharmacopeial convention. USA. 1993. Pág. 392.



ANEXOS



Clorhidrato de Pseudoefedrina

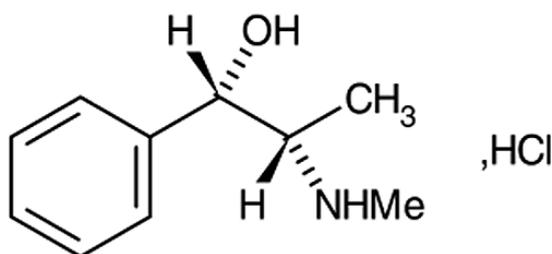
Clorhidrato de α [1-(metilamino)etil][S-(R*,R*)]bencenometanol. Muy soluble en agua; fácilmente soluble en etanol; poco soluble en cloroformo (**19**, **20**).

Peso molecular: 201.7

Punto de fusión: 182-186°C

Formula química: C₁₀H₁₅NO, HCl

Estructura química:



Loratadina

Etil4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ylideno)-1-piperidincarboxilato. Muy soluble en acetona, alcohol y cloroformo; insoluble en agua



Peso molecular: 382.89

Formula química: $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$

Estructura química:

