

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Validación del método de Cromatografía Líquida de Alta
Resolución para cuantificación de vitamina "A" en tabletas
multivitamínicas masticables.**



Informe de Tesis
Presentado por

Sandra Patricia De León Barrientos de Barco

Para optar al Título de

QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, enero de 1,998

06
T(1844)
c.4

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. HERBERTH RAUL AREVALO ALVARADO
VOCAL V	BR. MANOLA ANLEU FORTUNY

Tesis que dedico

A DIOS

A MIS PADRES

Héctor De León Morales

Clara Luz Barrientos de De León

A MIS HERMANOS

Hada Lucrecia De León de Sáenz

Héctor Hugo De León Barrientos

A MIS HIJOS

Sarah Alejandra, Mónica Renata,

Emilio Sebastian Barco De León

A MI ESPOSO

Emilio Salvador Barco Corado

A MIS AMIGOS

Byron Wilfredo Jérez Aguilar

Perla Anaid Galdámez de Rivera

Iris Ariadna López de Duro

AGRADECIMIENTO

A DIOS

A MIS PADRES

Héctor De León Morales

Clara Luz Barrientos de De León

**por el esfuerzo de toda una vida y
por su apoyo incondicional.**

A MI ASESOR DE TESIS

Ingeniero Oscar Vásquez Antillón.

A BAYER DE GUATEMALA

**Especialmente al Departamento de
Control de Calidad de la División
Consumer Care.**

A MIS COMPAÑEROS DE LABORES

Licda. Sonia Vides

Ing. Ricardo García

Licda. Sulma Portillo

Ing. Juan Antonio Vivar

Por su valiosa colaboración.

A LAS SIGUIENTES EMPRESAS

MULTISERVICIOS BARCO Y

EDIGRAFIC

INDICE

	Página
1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Antecedentes	7
4. Justificaciones	8
5. Objetivos	9
6. Hipótesis	10
7. Materiales y Métodos	11
7.1 Universo de trabajo	11
7.2 Medios	11
7.3 Diseño Experimental	18
8. Resultados	21
9. Discusión de Resultados	25
10. Conclusiones	29
11. Recomendaciones	31
12. Referencias	32
13. Anexos	
13.1 Tablas de resultados	35
13.2 Fórmulas	45
13.3 Marco Teórico	47
13.4 Monografía	57
13.5 Metodos de Análisis	62

1. RESUMEN:

Un método HPLC puede tener aplicación en la cuantificación de vitamina "A" presente en tabletas multivitamínicas masticables con grandes ventajas sobre los métodos químicos y biológicos como tiempos de análisis reducidos, separación de mezclas complejas con alta resolución, automatización de los sistemas de cromatografía, costo de análisis. Sin embargo, a pesar de esas ventajas presentadas por el método HPLC, al igual que otros métodos debe ser validado previo a su implementación como un método de análisis para asegurar que el mismo cumple con las características necesarias para poder ser utilizado .

El presente trabajo se realizó con el propósito de demostrar que el método de cromatografía líquida de alta resolución propuesto en el mismo para cuantificar vitamina "A" en tabletas multivitamínicas masticables cumple con los parámetros de selectividad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema, linealidad y reproductibilidad para ser considerado como un método válido para dicha cuantificación.

Las muestras de producto terminado utilizadas en la presente investigación, fueron seleccionadas en forma aleatoria y sometidas a la preparación que se indica para la evaluación de cada uno de los parámetros anteriormente mencionados.

Con los resultados obtenidos se procedió a la evaluación estadística la cual permitió concluir que el método propuesto si es válido para poder ser utilizado como un método analítico, es decir, si cumple con las características necesarias para implementarlo como un método de cuantificación de vitamina "A" con la garantía de que los resultados obtenidos con el mismo son confiables.

La validación fue enmarcada estadísticamente y los dictámenes rutinarios posteriores cumplieron con la precisión y la veracidad establecida durante la validación .

Para los propósitos de este trabajo, la validación incluye la evaluación de parámetros como selectividad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema, linealidad y reproductibilidad.

Los objetivos de este trabajo fueron asegurar que el método propuesto para cuantificar vitamina "A" en tabletas multivitamínicas masticables es selectivo para dicha vitamina; garantizar que los resultados obtenidos son confiables; demostrar que el método propuesto es reproducible, exacto, preciso y lineal siempre y cuando se trabaje bajo las mismas condiciones propuestas en este trabajo.

La hipótesis del estudio plantea que el método HPLC propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables si cumple con las condiciones necesarias para poder ser implementado como un método de análisis.

Los resultados se basan en mediciones estadísticas tales como desviación estándar, coeficiente de variación, intervalos 2S y 3S del valor medio, intervalo de confianza del 95%, regresión lineal y análisis de varianza para comparación de medias para evaluar la reproductibilidad del método.

2. INTRODUCCION

En la última década la cromatografía líquida de alta resolución ha adquirido relevante importancia en el análisis químico cuantitativo, tanto así que en laboratorios de países desarrollados como Estados Unidos y Alemania el cromatógrafo líquido de alta resolución es parte indispensable del equipo de análisis. En Guatemala, varios laboratorios nacionales y transnacionales cuentan con por lo menos un cromatógrafo líquido.

El éxito de la cromatografía líquida de alta resolución, algunas veces referida como HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography), se debe a las ventajas que presenta esta técnica sobre los métodos tradicionales; con frecuencia es posible obtener tiempos de análisis de pocos minutos, en algunos casos, de segundos; en adición, pueden separarse ingredientes de mezclas complejas con alta resolución, los análisis con métodos HPLC son ejecutados con facilidad y exactitud pudiendo obtenerse errores relativos menores de 1%. Además, ya existen sistemas automatizados que inyectan la muestra, realizan la separación, imprimen la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente (6,11).

Un método HPLC puede tener aplicación en la cuantificación de vitamina "A" presente en tabletas multivitamínicas masticables con grandes ventajas en tiempo y costo de análisis sobre los métodos químicos y biológicos. Sin embargo, a pesar de esas ventajas presentadas por el método HPLC, al igual que otros métodos debe ser validado previo a su implementación como un método de análisis

para asegurar que el mismo cumple con las características necesarias para poder ser utilizado (2).

La validación debe ser enmarcada estadísticamente y los dictámenes rutinarios posteriores deben cumplir con la precisión y la veracidad establecida durante la validación (2).

Para los propósitos de este trabajo, la validación incluirá la evaluación de parámetros como selectividad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema, linealidad y reproducibilidad, con la finalidad de validar un método de cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar vitamina "A" en tabletas multivitamínicas masticables.

3. ANTECEDENTES

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de productos farmacéuticos están sujetos a varios requerimientos. De acuerdo a la Sección 501 de el Acta Federal de alimentos, drogas y cosméticos, los ensayos y especificaciones en monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos y del Formulario Nacional constituyen estándares legales. Las actuales regulaciones de las Buenas Prácticas de Manufactura [21 CFR 211.194(a)] requieren que los métodos de ensayo utilizados para evaluar el cumplimiento de un producto farmacéutico con especificaciones establecidas, debe llenar sus propios estándares de exactitud y seguridad. También, de acuerdo a estas regulaciones [21CFR 211.194(a)(2)], los usuarios de métodos analíticos descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos y en el Formulario Nacional no requieren validar la exactitud y seguridad de estos métodos, pero deben verificar la adecuabilidad bajo las condiciones actuales de uso. Reconociendo el estatus legal de la Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional, es esencial, para propósitos de adopción de un nuevo método analítico, reforzar con suficientes datos de laboratorio la documentación de la validación de estos procedimientos (14,13).

En el trabajo de Tesis "Procedimiento para la Validación de Métodos Analíticos, Aplicado a Cromatografía Líquida de Alta Precisión", se validó un método para la cuantificación de los ingredientes activos: ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, maleato de clorfeniramina y bitartrato de fenilefrina contenidos en un producto farmacéutico comercial. En dicha validación se evaluaron los parámetros: selectividad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema y linealidad (10).

4. JUSTIFICACIONES

Los métodos biológicos y químicos son los más antiguos y los métodos más ampliamente aceptados para el análisis de vitamina A.

Los métodos biológicos son costosos y las variaciones individuales en las respuestas de los animales de experimentación son altas. Además, requieren períodos prolongados para obtener resultados.

Los métodos químicos son más exactos y reproducibles pero generalmente requieren una separación previa de las vitaminas y sufren interferencias de impurezas químicamente relacionadas (1).

Por el contrario, el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables propuesto en este trabajo, reduce el tiempo de análisis y no requiere una extracción previa de vitamina A en la que pueda perderse parte de la misma.

En adición con el método HPLC, mezclas complejas de vitaminas pueden ser separadas con una óptima resolución. Por otro lado, es posible detectar cantidades a niveles de nanogramos, lo que significa decir que el análisis con método HPLC es muy sensible (6,11,8).

El incremento en la producción de tabletas multivitamínicas masticables hace necesario la implementación del método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para cuantificar vitamina A en las mismas, sin embargo debe garantizarse que el método cumple con las características necesarias para poder ser utilizado como un método analítico.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Garantizar que el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, propuesto en este trabajo, para cuantificación de vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables, cumple con las características necesarias para poder ser utilizado como un método de análisis.

5.2 Específicos:

- 5.2.1 Asegurar que el método propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables es selectivo para vitamina A.
- 5.2.2 Garantizar que los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones con el método HPLC sean confiables.
- 5.2.3 Demostrar que el método HPLC es reproducible siempre que se utilicen las mismas condiciones en el sistema.
- 5.2.4 Demostrar que el método HPLC para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables es exacto, preciso y lineal siempre que se trabaje bajo las mismas condiciones propuestas en este trabajo.

6. HIPOTESIS

El método HPLC propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables sí cumple con las condiciones necesarias para poder ser implementado como un método de análisis.

PROVEGAR 3011
L. 1000
1000

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo:

Para el efecto del presente trabajo se utilizó una marca comercial de tabletas multivitamínicas masticables la cual contiene 3,500 UI de vitamina A, además de otras vitaminas, sabores y colores artificiales.

Las muestras de tabletas se prepararon y analizaron de acuerdo al método propuesto en este trabajo y con los resultados obtenidos en los respectivos cromatogramas se evaluaron estadísticamente los parámetros selectividad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema, linealidad y resolución.

7.2 MEDIOS

7.2.1 Recursos Humanos:

Estudiante: Sandra Patricia De León Barrientos de Barco.

Asesor: Ing. Oscar Vásquez Antillón.

Colaboradores:

Bayer de Guatemala.

7.2.2 Recursos Materiales:

Institucional:

Laboratorio Control de Calidad, División Consumer Care, Bayer de Guatemala.

7.2.3 Equipo:

- Balanza analítica
- Balones volumétricos de vidrio actínico
- Tubos de Centrifuga
- Centrifugadora
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca Beckman,
- Modelo: Bomba 116, Detector 166, Autosampler 507.
- Agitador mecánico.
- Evaporador rotativo.
- Pipetas serológicas y volumétricas.

7.2.4 Reactivos:

- Dimetil sulfóxido grado reactivo.
- Hexano grado HPLC
- Metanol grado reactivo
- Ascorbato de sodio grado reactivo
- Ácido pirogálico grado reactivo
- vitamina E acetato, estándar de referencia
- Iso Octano grado reactivo
- vitamina A, estándar de referencia
- Ciclohexano grado reactivo
- Metil-t-butil éter grado reactivo
- Bicarbonato de sodio grado reactivo

7.2.5 PROCEDIMIENTO

7.2.5.1 Preparación de las soluciones:

7.2.5.1.1 Acido Sulfúrico 3N en metanol:

Agregar lentamente con agitación constante, 90 mL de ácido sulfúrico concentrado a 600 mL de metanol en un balón volumétrico de 1000 mL. Enfriar y aforar a volumen con metanol. Mezclar bien.

7.2.5.1.2 Solución de Ascorbato de sodio 10%-ácido pirogálico 5%:

Transferir 200 g de ascorbato de sodio y 100 g de ácido pirogálico a un balón volumétrico de 2000 mL y disolver en agua. Agregar 34 mL de ácido sulfúrico y diluir con agua a volumen. Mezclar bien. Esta solución puede ser almacenada a 50°C antes de su uso.

7.2.5.1.3 Preparación del Estándar:

Pesar exactamente 210 mg de estándar de referencia de vitamina A y de estándar de referencia de vitamina E acetato en un beaker. Proceder como la preparación de la muestra desde el paso 2.

7.2.5.1.4 Preparación de la muestra:

Pulverizar con mortero 6 tabletas masticables hasta polvo fino y transferir al recipiente en el agitador mecánico.

Agregar cerca de 1 g de bicarbonato de sodio a la muestra y al estándar.

Agregar 25 mL de iso-octano a cada contenedor y agitar brevemente hasta dispersión.

Agregar 12 mL de la solución de ascorbato de sodio 10%-ácido pirogálico 5% y agitar por 12 minutos.

Agregar 12 mL de dimetilsulfóxido y agitar por 12 minutos adicionales.

Agregar 12 mL de ácido sulfúrico 3N en metanol y agitar por 12 minutos.

Agregar 25 mL de iso-octano y agitar por 10 minutos. Remover del agitador y centrifugar brevemente hasta romper la emulsión y clarificar el sobrenadante.

Transferir una alícuota de la capa inorgánica (capa superior), a un vial para muestra para inyectar en el cromatógrafo.

7.2.5.2 Condiciones del equipo HPLC:

Columna Zorbax Sílica: 2.0 mm de diámetro interno x 10 cm.5 micrones o equivalente.

Fase móvil: 0.9 a 1.1% de metil-butyl eter en hexano para obtener: factor de resolución entre los picos de vitamina A y vitamina E de 1.5 o más. Adicionalmente $K'(A)$ debe ser 6 o mayor y $K'(E)$ debe ser de 8 o más.

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min.

Longitud de onda de detector: 265 nm

Sensibilidad del detector: 0.5 AUFS

Volumen de inyección: 10 microlitros.

Factor de respuesta: área de los picos.

7.2.5.3 Cálculos:

$$\frac{\text{UI de vitamina A}}{\text{Tableta}} = \frac{\text{Area de pico de la Muestra}}{\text{Area de pico de Estándar}} \times \frac{\text{UI de estándar}}{\text{Concentración de muestra}}$$

Donde:

Cantidad de muestra = 6 tabletas masticables (2500 UI de vitamina A/tableta)

$$\text{Cantidad de estándar} = \frac{\text{Peso de estándar (g)} \times \text{mg de vitamina A} \times 2904 \text{ UI}}{\text{gramos} \times \text{miligramos}}$$

7.2.6 Validación del método:

7.2.6.1 Selectividad:

Se realizaron las siguientes inyecciones:

Dos inyecciones de placebo solo.

Dos inyecciones de estándar de vitamina A.

Dos inyecciones de estándar de vitamina E.

Previo a la inyección tanto la muestra de placebo como de estándar fueron tratadas de acuerdo al inciso 7.2.5.1.4.

7.2.6.2 Exactitud:

Se realizaron las siguientes inyecciones:

Un estándar de vitamina A por duplicado

Una muestra original por triplicado

Una muestra original mas 25% de activo por triplicado

Una muestra original mas 50% de activo por triplicado.

7.2.6.3 Precisión del método:

Se efectuaron las siguientes inyecciones:

6 muestras de un mismo lote por triplicado

Un estándar de vitamina A por duplicado. Este estándar se inyectó cada 10 inyecciones de muestra.

7.2.6.4 Precisión del sistema:

Se efectuaron 6 inyecciones de estándar de vitamina A bajo las mismas condiciones.

7.2.6.5 Linealidad:

Se efectuaron por duplicado de activo a las siguientes concentraciones: 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%.

7.2.6.6 Reproducibilidad:

Se Inyectaron 6 muestras de un mismo lote por triplicado cada una contra un estándar de vitamina A por duplicado. Se inyectó el estándar cada 10 muestras. Este paso fue realizado por seis diferentes analistas. (2,13)

PHARMACY

7.3 Diseño Experimental:

En base a los cromatogramas obtenidos después de analizar las muestras en el cromatógrafo líquido de alta resolución se evaluaron cada uno de los parámetros anteriormente mencionados de la siguiente manera:

7.3.1. Selectividad:

Se analizaron los componentes, listados a continuación, en forma ordenada evaluados en el límite de la especificación:

2 Inyecciones de placebo

2 Inyecciones de estándar de vitamina A.

2 Inyecciones de estándar de vitamina E.

Exclusivamente se aseguró la especificidad o selectividad del método para aquellas sustancias que fueron analizadas. Esta prueba es satisfactoria siempre y cuando el cromatograma incluya un listado de sustancias con sus correspondientes tiempos de retención, así como los picos desconocidos provenientes de los pre-productos y post-productos de placebo.

7.3.2 Exactitud:

Para la evaluación de este parámetro se efectuaron en el cromatógrafo las siguientes inyecciones:

1 Inyección de estándar de vitamina A por duplicado.

1 Inyección de muestra de original por triplicado.

ANEXO
672

1 Inyección de muestra mas 25% de activo por triplicado.

1 Inyección de muestra mas 50% de activo por triplicado.

Se calculó la desviación estándar y la media (X). Los resultados obtenidos fueron expresados en % de recuperación. Se calculó el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) con la fórmula:

$$C.V. = (S/X)*100$$

donde:

S = Desviación estándar

X = Media

7.3.3 Precisión del método:

6 muestras de tabletas multivitamínicas masticables pertenecientes a un mismo lote fueron inyectadas por triplicado contra un estándar de vitamina A por duplicado cada 10 inyecciones. Se evaluó la repetibilidad por la desviación estándar y el coeficiente de variación, intervalos 2S y 3S del valor medio, con un nivel de confianza 95.0%.

7.3.4 Precisión del sistema:

La precisión del sistema se realizó con la misma solución estándar inyectándola 6 veces. La repetibilidad de la desviación estándar se calculó sobre los 6 resultados (área o altura del pico en el cromatograma). Como medición de la precisión del sistema están:

La repetibilidad de la desviación estándar.

El coeficiente de variación.

Intervalos 2S y 3S del valor medio.

Nivel de confianza del 95.0%.

7.3.5 Linealidad:

Se efectuaron inyecciones por duplicado de la muestra a las siguientes concentraciones: 25, 50,75,100,125 y 150 % del principio activo.

Los valores obtenidos se graficaron en función de la concentración, esto soporta el grado de confiabilidad de acuerdo a los intervalos de confianza de la recta. Con los valores de concentración vrs. áreas de los picos se determinó la ecuación de la recta " $Y = mX + b$ " y para su evaluación se calculó el coeficiente de determinación que es el porcentaje de desviación de los resultados explicado en la recta, y el intercepto "b" que para este caso debe ser no mayor del 3% del valor máximo de concentración (150% de principio activo).

7.3.6 Reproducibilidad:

Para comparar y calcular las diferentes desviaciones estándar fueron necesarias por lo menos 6 muestras de un mismo lote y seis analistas diferentes, para la obtención de resultados.

Para cada muestra fue necesario calcular la desviación estándar. Se analizaron 6 muestras de un mismo lote por triplicado contra un estándar por duplicado cada 10 inyecciones. El mismo procedimiento se efectuó por seis diferentes analistas bajo las mismas condiciones. (2,13)

15/11/2013
14
arbitraje

8. RESULTADOS

8.1 Selectividad:

Los resultados obtenidos al evaluar el parámetro Selectividad son los siguientes:

Preparación	<u>Tiempos de Retención</u>	
	vitamina A	vitamina E
Estándar de vitamina A	2.28	---
Estándar de vitamina E	---	3.07
Estándar de vitamina A & E	2.18	3.04
Producto Terminado	2.20	3.16
Placebo	----	----

Se realizaron dos inyecciones de estándar de vitamina A, dos inyecciones de Estándar de vitamina E, dos inyecciones de estándar de vitamina A y E, dos inyecciones de Producto terminado y dos inyecciones de placebo. El método demostró ser capaz de identificar y diferenciar tanto a la vitamina A como a la vitamina E, por lo que, el método es selectivo con respecto a las sustancias de interés (vitamina A). (Tabla 1, Anexo 1)

8.2 Exactitud:

Se realizaron inyecciones de soluciones de muestra a los niveles del 100%, 125% y 150% de vitamina A. Cada solución de cada nivel fue inyectada por triplicado contra una solución estándar de vitamina A por duplicado.

Se calculó el porcentaje de recuperación en cada una de las inyecciones de los diferentes

niveles obteniéndose un promedio de 100.98% de recuperación, con una desviación estándar de 1.41 y un coeficiente de variación de 1.40%. El valor de la t de Student calculada fue de 2.085 contra un t crítico de 2.306 . (Tabla 2, Anexo 1)

8.3 Precisión del método:

Se prepararon 6 soluciones de muestra pertenecientes al mismo lote de producto terminado y cada solución fue inyectada por triplicado contra un estándar de vitamina A inyectado por duplicado. La secuencia de inyección fue realizar las inyecciones por duplicado de estándar cada 10 inyecciones simples de muestra.

El contenido promedio de vitamina A fue de 3508 UI/tableta, con una desviación estándar de 81.3 y un coeficiente de variación de 2.3%.

Los intervalos 2S del valor medio van de 3345.2 a 3670.8 UI/tab. Mientras que los intervalos 3S valor medio van de 3263.8 a 3752.2 UI/tab.

La evaluación t de Student con un nivel de confianza del 95.0%, y 16 grados de libertad muestra que el intervalo de precisión del método es de 3458.2 a 3557.8 UI/tab. (Tabla 3, Anexo 1)

8.4 Precisión del sistema:

Se preparó una solución estándar de vitamina A y se realizaron 6 inyecciones de la misma solución. Al evaluarlas se obtuvo un área promedio de 38.1420 unidades de absorbancia con una desviación estándar de 0.12 y un coeficiente de variación de 0.32%.

(Tabla 4, Anexo 1)

8.5 Linealidad:

Para evaluar este parámetro se prepararon soluciones de muestra a las siguientes concentraciones de vitamina A del 25, 50, 75, 100, 125 y 150%. Cada solución fue inyectada por duplicado y con los resultados de concentración vrs área de los picos obtenidos se graficó la recta que se muestra en la tabla 5.1, Anexo 1, de la cual se obtiene la ecuación:

$Y = 0.346X + 0.0134$ con un coeficiente de determinación de 0.9997 para 12 muestras y 10 grados de libertad. O sea que variaciones entre X y Y están explicadas en el 99.97% de los casos y un 0.03% no se encuentra explicado en la recta.

8.6 Reproducibilidad:

6 muestras de un mismo lote de producto fueron preparadas por 6 analistas diferentes y cada una de ellas se inyectó por triplicado contra un estándar de vitamina A por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

# de Analista	Media	Des. Std.	C.V. %
1	3540.1	37.71	1.07
2	3528.4	72.01	2.04
3	3561.6	46.08	1.29
4	3543.9	41.71	1.18
5	3540.1	40.88	1.15
6	3524.7	51.42	1.46

Donde:

Media = Promedio de área, en unidades de absorbancia obtenido por cada analista para un total de 18 resultados.

Des. Std. = Desviación Estándar para cada serie de 18 datos correspondiente a cada analista.

C.V.% = Coeficiente de Variación obtenido para cada serie de datos de cada analista.

Con el análisis de Varianza se obtiene un valor para F de 1.18, menor que la F crítica de 2.29. Lo cual demuestra que el método es reproducible de un analista a otro. (Tablas 6.1, 6.2, 6.3, Anexo 1)

PROPIEDAD DE LA
SECRETARÍA DE
1974

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Con los resultados anteriormente presentados comprobamos que el método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables ha sido validado y cumple con todos los parámetros necesarios para instituirlo como un método oficial de análisis, siempre y cuando se trabaje bajo las condiciones especificadas en el presente trabajo de Tesis.

El método demostró ser selectivo ya que al realizar inyecciones separadas de vitamina A y vitamina E cada una de ellas obtuvo una lectura de área en unidades de absorbancia a diferentes tiempos de retención. Por otro lado, el cromatograma de la solución que contiene estándar de vitamina A y estándar de vitamina E muestra dos picos bien definidos a, aproximadamente los mismos tiempos de retención que los obtenidos para cada una de las vitaminas A y E por separado, con una resolución entre picos mayor de 1.5

Anexo (1)

El método también demuestra ser exacto ya que al analizar soluciones de muestra a las cuales se les agregó una cantidad conocida de vitamina A se obtuvieron porcentajes de recuperación del principio activo que van desde el 98.2 hasta el 103.65% con una desviación de 1.41 y un coeficiente de variación de 1.4 bastante bueno, tomando en cuenta que el coeficiente de variación máximo permitido en la cuantificación de activos es de 3.0%. Además el valor t de Student calculado fue de 2.085 menor que la t crítica de 2.306 con lo que afirmamos que el valor medio para el 100% de la población cae en el intervalo de confianza de 0.95 (exactitud mayor que 99.5%).

Para la evaluación de la precisión del método 6 muestras de un mismo lote fueron preparadas según el método propuesto e inyectadas por triplicado para la cuantificación del principio activo. Sobre un total de 18 observaciones se cuantificó el grado de dispersión de los datos respecto de una media de 3,508 UI de vitamina A con una desviación estándar de 81 y un coeficiente de variación de 2.32%. Se calcularon los intervalos 2S y 3S con los cuales podemos explicar y predecir que con el método propuesto el 95% de los resultados caen en el intervalo de 3,345.2 a 3,670.8 UI de vitamina A y el 99.7% de los resultados están en el intervalo de 3,263.8 a 3,752.2 UI de vitamina A.

Se evaluó la t de Student con un nivel de confianza del 95.0% indica que el método propuesto es preciso en el intervalo de 3,458.2 a 3,557.8 UI de vitamina A.

En la evaluación de la Precisión del Sistema una misma solución estándar preparada según el método propuesto fue inyectada 6 veces. Se registraron las áreas y sobre ella se calculó la media que fue de 38.1420 unidades de absorbancia con una dispersión de los datos respecto de la media de 0.12 , o sea un 0.32% dispersos respecto del valor medio. Con el cálculo de los intervalos 2S y 3S se puede predecir que al efectuar cuantificación de vitamina A con el método propuesto para el sistema HPLC especificado en el presente trabajo de tesis, 95% de los resultados que se obtengan estarán en el intervalo de área de 37.9020 a 38.3820 UA y el 99.7% de los resultados estarán en el intervalo de 37.7820 a 38.5020 UA.

Para la evaluación de la Linealidad del método, muestras a las concentraciones del 25, 50, 75, 100, 125, y 150% de vitamina A fueron preparadas con el método propuesto en el presente trabajo de Tesis e inyectadas cada una de ellas por duplicado. Se graficaron los valores de concentración vrs. área obtenida correspondiente a cada concentración y se ajustó la gráfica a la mejor línea recta con el cálculo de mínimos cuadrados, obteniendo la siguiente ecuación de recta:

$$Y = 0.34614X + 0.01340$$

donde:

Y = Área en Unidades de Absorbancia

X = Porcentaje de vitamina A en la muestra

0.34614 = Pendiente de la línea recta

0.01340 = Intercepto entre la recta y el eje Y

Calculando el valor de Y, para un X máximo de 150%, obtenemos un valor de área de 51.9343 UA, el 3% de ese valor es de 1.558029 UA por lo que el intercepto en 0.01340 UA es no mayor del 3% del valor esperado para Y a la máxima concentración de X de 150%.

El coeficiente de determinación obtenido es de 0.9997, lo cual indica que el 99.97% de los valores de área en Y están explicados por la función descrita con la ecuación de la recta.

La tabla 5.1, Anexo 1 muestra los intervalos de confianza y los intervalos de predicción de Y (área en unidades de absorbancia) para cada X evaluada (% de vitamina A), con una t de Student de 2.228, 10 grados de libertad y $\alpha / 2 = 0.025$.

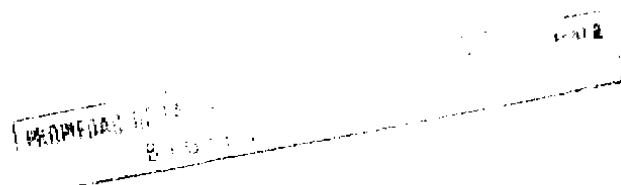
En el análisis de la Reproducibilidad del método se evaluaron los resultados de 6 muestras preparadas según el método propuesto por 6 diferentes analistas. Se compararon

las desviaciones estándar obtenidas por cada uno de ellos; los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.2, Anexo 1.

El análisis de varianza de dos vías para comparación de más de dos medias se efectuó calculando el valor F que fue de 1.18, menor que el valor crítico de F de 2.29 para 5 grados de libertad y un total de 120 observaciones con un alfa de 0.05, lo que demuestra que hay suficiente evidencia para afirmar que no hay diferencia en los resultados promedios obtenidos por los 6 diferentes analistas, lo cual confirma que el método es reproducible de una persona a otra, siempre y cuando se trabaje bajo las mismas condiciones especificadas en el presente trabajo de Tesis.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables cumple con los parámetros establecidos por la validación de métodos según USP XXIII (9.14) por lo que los resultados que con él se obtengan son seguros y confiables.
- 10.2 El método propuesto es capaz de diferenciar vitamina A de cualquier otra sustancia, ya sea activo o placebo, presente en la formulación utilizada en el presente trabajo de Tesis.
- 10.3 El método propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables es exacto. Los resultados que se obtienen con el mismo concuerdan con el valor real.
- 10.4 El método es preciso. Los resultados concuerdan al efectuar el procedimiento repetidas veces a múltiples preparaciones de una muestra homogénea.
- 10.5 El sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizado en el presente trabajo de tesis es preciso, o sea que es capaz de reproducir los resultados de una misma preparación de muestra inyectada varias veces.



10.6 El método propuesto es lineal. El área, en unidades de absorbancia, obtenida en cada nivel de concentración es proporcional a dicha concentración, y los resultados son predecibles, siempre y cuando se trabaje en el intervalo de concentración propuesto en el presente trabajo de Tesis.

10.7 El sistema es capaz de detectar niveles de vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables que van desde 912.5 UI hasta 5475.0 UI.

10.8 El método puede ser reproducido por diferentes analistas con la seguridad que los resultados que se obtengan serán confiables, siempre y cuando se trabaje bajo las condiciones especificadas en el presente trabajo.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Para garantizar la confiabilidad en los resultados obtenidos al cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables, deben mantenerse las condiciones de análisis especificadas en el presente trabajo.
- 11.2 Cualquier modificación de una o varias condiciones del análisis con el método propuesto hace necesaria una nueva validación del método.
- 11.3 Previo a utilizar el método propuesto en otro equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es necesario realizar una adecuación del sistema, la cual incluye evaluación de la precisión del sistema, linealidad, resolución entre picos y factor de simetría.
- 11.4 El presente trabajo de tesis garantiza los resultados obtenidos siempre que se trabaje en el intervalo de concentración propuesto, o sea del 25% al 150% de la concentración de vitamina A presente en el producto utilizado para propósitos de esta validación, o sea de 912.5 a 5475.0 UI de vitamina A.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Barret P, Shah M. Miles Lab. Inc. Quality Assurance. Development of an HPLC method for the simultaneous analysis of vitamins A and D in Flintstones. Doc.Tec. C902.31. 51pp. (p.1-2)
- 12.2 Bayer A.G. Self Medication. Garantía de la Calidad. Validación de Métodos Cromatográficos (HPLC, GC). Doc.Tec. No.25006-1. 1991. 12pp. (p. 1-12)
- 12.3 Council of Europe. European Pharmacopoeia. 2d. Ed. Maisonneuve. IX vol. V.6.20.4. 1994.
- 12.4 Goodman L, Gilman A. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 5a. Ed. Espinosa R, Folch A, Vela H. trads. México: Nueva Editorial Interamericana. 1978. 1412pp. (p. 1322-1329)
- 12.5 Johnson B. Method of Vitamin Determination. USA: Burgess Publishing. 1948. 109pp. (p.31-37)
- 12.6 Johnson E, Stevenson R. Basic Liquid Chromatography. USA: Varian, 1978. 354pp. (p. 1-15)

- 12.7 Miles Inc. Quality Assurance Procedures. Consumer Healthcare Division. Determination of vitamin A acetate and Vitamin E acetate by HPLC and general fat soluble Vitamin sample preparation. Doc. Tec. CHD902.49e. 1990. 5pp. (p.1-5)
- 12.8 Pryde A, Gilbert M. Applications of High Performance Liquid Chromatography. USA: Chapan And Hall Ltd. 1979. 255pp. (p. 3-5, 162-163)
- 12.9 Remington's Pharmaceutical Science. USA: Mack Publishing. 1980. 2928pp. (p.949)
- 12.10 Rodríguez V, Claudia R. Procedimiento para la validación de métodos analíticos, aplicado a cromatografía líquida de alta precisión. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ingeniería) 1993. 50p.
- 12.11 Steven B, Schram S. The LDC Basic Book on Liquid Chromatography. Laboratory Data Control. USA: Milton Roy Company. 1982. 114 pp. (p.1-9, 101-102).
- 12.12 Strohecker R, Henning H. Vitamin Assay. Tested Methods. Libman D. Trad. from German. Germany: Verlag Chemie. 1965. 563pp. (p.33-58)
- 12.13 The United States Pharmacopeia. The National Formulary. XXII Ed. USA: United Stated Pharmacopeial Convention. 1990. 2067pp. (p.1508, 1710-1712)

12.14 The United States Pharmacopeia. The National Formulary. XXIII Ed. USA: United States Pharmacopeial Convention. 1994. 2391pp. (p.2137-2150)

13. ANEXOS

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD
Biblioteca

13.1 TABLAS DE RESULTADOS

TABLA No. 1

TABLA DE RESULTADOS DE SELECTIVIDAD

<u>ESTANDAR</u>	<u>COMPONENTE</u>	<u>AREA</u>	<u>TIEMPO DE RETENCION</u>
vitamina A	vitamina A	39.3981	2.28
	vitamina A	38.7204	2.27
vitamina E	vitamina E	96.1377	3.07
	vitamina E	94.0836	3.07
vitamina A & E	vitamina A	38.8108	2.17
	vitamina E	92.1237	3.04
vitamina A & E	vitamina A	38.0724	2.18
	vitamina E	90.2855	3.04
PRODUCTO	vitamina A	38.7499	2.21
	vitamina E	41.2101	3.17
PRODUCTO	vitamina A	37.9018	2.18
	vitamina E	40.3412	3.14
PLACEBO	vitamina A	-----	-----

TABLA No. 2

TABLA DE RESULTADOS DE EXACTITUD

Nivel	W(g) de muestra	# Inyección	Area Vitamina A	mg Vit. A teóricos	mg Vitamina A	% Recuperacion
Std	----	1	37.8880	---	----	----
	---	2	37.2826	---	----	----
100%	5.3283	1	39.0961	22012.78	22195.7743	100.83
		2	38.3565	22012.78	21775.8860	98.92
		3	38.4278	22012.78	21816.3647	99.11
125%	5.1732	1	50.5840	27707.36	28717.7250	103.65
		2	49.6505	27707.36	28187.7551	101.73
		3	49.6535	27707.36	28189.4583	101.74
150%	5.2371	1	62.9353	34996.59	35729.8481	102.10
		2	61.8461	34996.59	35111.4837	100.33
		3	61.8991	34996.59	35141.5730	100.41
					PROMEDIO =	100.98
					DES. STD. =	1.41
					COEF. VAR.=	1.40

Exeso de Vitamina A para los niveles 125 y 150%:

125% = 65.20 mg = 6335.3432 UI

150% = 137.38 mg = 13360.578 UI

NOTA: Cada gramo de Vitamina A, estándar de Referencia equivale a 97250 Unidades USP de Vitamina A

Estándar Utilizado: USP REFERENCE STANDARD VITAMIN A, LOT T.

TABLA No. 3

PRECISION DEL METODO

MUESTRA	INYECCION	AREA	UI Vit. A/tab.
Std 1	1	37.2682	-----
Std 1	2	37.2820	-----
Muestra 1	1	38.4602	3646
Muestra 1	2	38.4446	3645
Muestra 1	3	38.3288	3634
Muestra 2	1	37.8148	3585
Muestra 2	2	36.7823	3487
Muestra 2	3	36.7629	3485
Muestra 3	1	37.4854	3554
Muestra 3	2	37.4682	3552
Muestra 3	3	37.5013	3555
Std 2	1	37.3688	-
Std 2	2	37.2519	-
Muestra 4	1	36.6653	3473
Muestra 4	2	36.6684	3473
Muestra 4	3	36.6648	3473
Muestra 5	1	35.6470	3376
Muestra 5	2	35.8101	3392
Muestra 5	3	35.7465	3386
Muestra 6	1	36.7084	3477
Muestra 6	2	36.7528	3481
Muestra 6	3	36.6736	3473

W STD (mg) = 218.2

PROMEDIO = 3508

DES. STD. = 81.4

COEF. VAR. = 2.32

Intervalos 2 sigma = de 3345.2 a 3670.8 UI de Vitamina A

Intervalos 3 sigma = de 3263.8 a 3752.2 UI de Vitamina A

Intervalo de Confianza del 95.0 % de 3458.2 a 3557.8 UI de Vitamina A

para una T a 0.025 = 2.120, N = 18 y 16 grados de libertad.

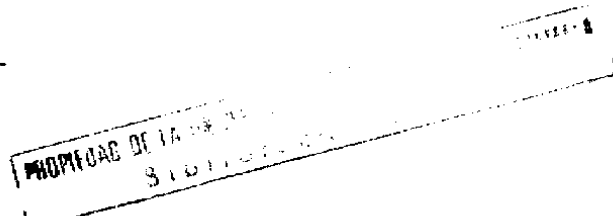


TABLA No. 4

RESULTADOS DE PRECISION DEL SISTEMA

6 INYECCIONES DE LA MISMA SOLUCION ESTANDAR

No. Iny.	AREA
1	38.1850
2	38.2171
3	38.2995
4	38.0733
5	38.1942
6	37.8831

PROM. 38.1420

DESV. STD. 0.12

COEF. VAR 0.32

TABLA No. 5

RESULTADOS DE LINEALIDAD

NIVEL %	# INY.	AREA
23.43	1	8.1300
23.43	2	8.0379
52.48	1	18.4231
52.48	2	18.0825
75.14	1	26.2497
75.14	2	25.7950
103.9	1	36.1621
103.9	2	35.6088
129.24	1	45.1871
129.24	2	44.4906
154.23	1	53.7354
154.23	2	52.9955

Intercepto: 0.0134
 Error Estándar de Y estimada: 0.2974
 Coeficiente de Determinación: 0.9997
 No.de Observaciones: 12
 Grados de Libertad : 10
 Pendiente : 0.3461

ECUACION DE LA RECTA $Y = 0.01340X + 0.3461$

LINEALIDAD

Concentración vrs Area

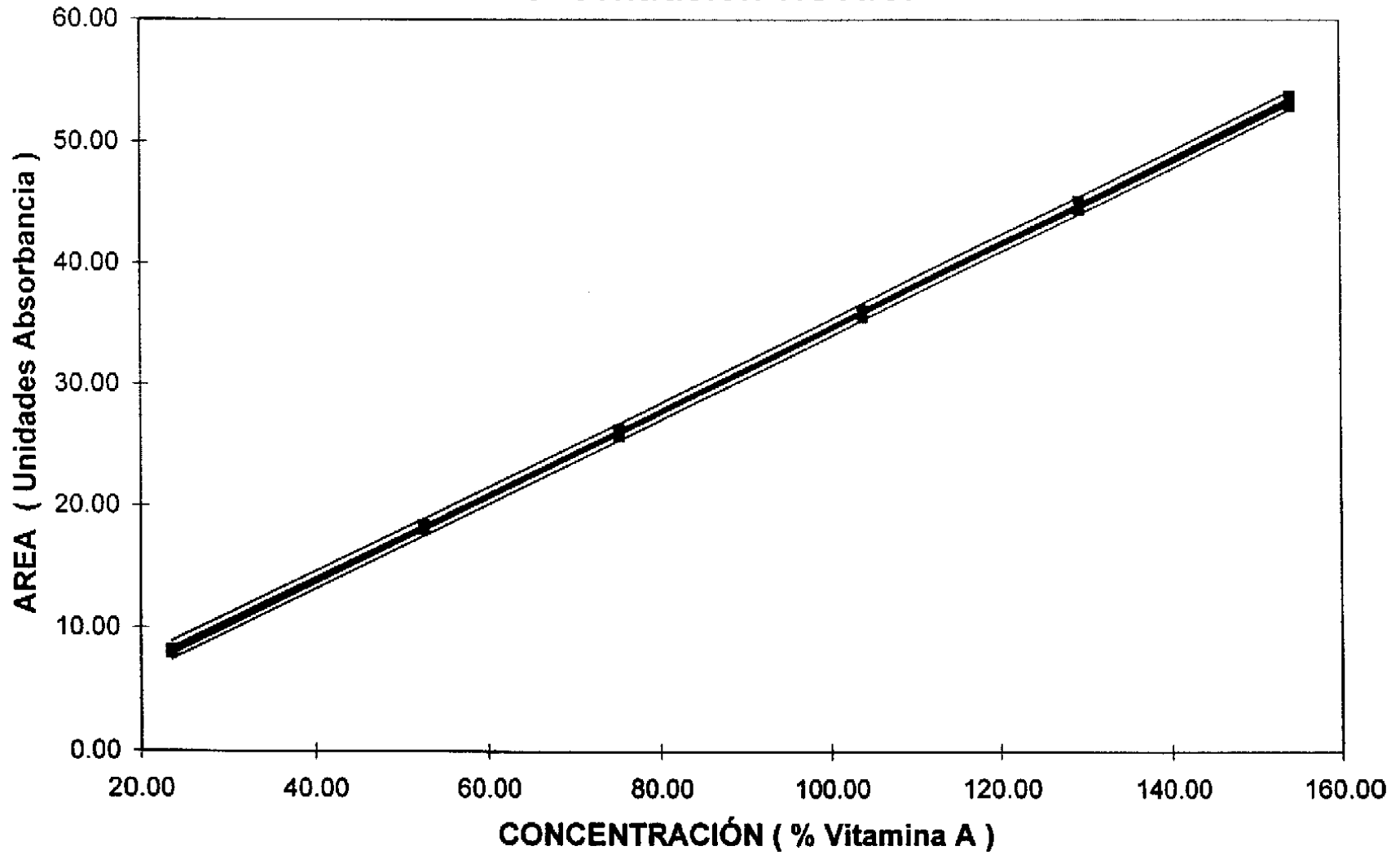


TABLA No. 6.1
 RESULTADOS DE REPRODUCTIBILIDAD DEL METODO
 AREA vrs. UNIDADES INTERNACIONALES DE VITAMINA A POR TABLETA

Muestra	Iny	Analista 1 W STD.= 221.4 mg		Analista 2 W STD.= 219.2 mg		Analista 3 W STD.= 221.0 mg		Analista 4 W STD.= 219.4 mg		Analista 5 W STD.= 218.6 mg		Analista 6 W STD.= 208.9 mg	
		Area	UI/tab	Area	UI/tab	Area	UI/tab	Area	UI/tab	Area	UI/tab	Area	UI/tab
Std 1	1	37.2738	-----	37.2682	-----	37.5679	-----	36.5701	-----	36.4645	-----	36.4779	-----
Std 1	2	37.4456	-----	37.2820	-----	37.6014	-----	36.5970	-----	36.4396	-----	36.4417	-----
Muestra 1	1	36.9386	3545	38.4602	3654	37.4598	3588	37.5243	3569	37.3608	3541	39.1095	3541
Muestra 1	2	37.0445	3555	38.4446	3652	37.5502	3597	37.6992	3586	37.5288	3557	39.2244	3551
Muestra 1	3	37.0506	3556	38.3288	3641	37.4623	3589	37.6239	3579	36.6305	3472	39.2792	3556
Muestra 2	1	36.6238	3515	37.8148	3592	37.0795	3552	37.3091	3549	37.0693	3513	38.9255	3524
Muestra 2	2	36.5632	3509	36.7823	3494	37.0479	3549	36.8451	3505	37.1210	3518	37.3877	3385
Muestra 2	3	36.6919	3521	36.7629	3492	37.0971	3554	36.8163	3502	37.1483	3521	38.6991	3504
Muestra 3	1	37.2983	3580	37.4854	3561	37.8801	3629	37.4216	3560	37.6442	3568	39.4804	3574
Muestra 3	2	37.3363	3583	37.4682	3559	37.8475	3626	37.6827	3584	37.8017	3583	39.4655	3573
Muestra 3	3	37.2567	3576	37.5013	3563	37.8433	3625	37.8329	3599	37.8132	3584	39.6375	3588
Std 2	1	37.2008		37.3688		37.5114		36.6008		36.4712		36.2623	
Std 2	2	37.0317		37.2519		37.4199		36.6582		36.5693		36.2924	
Muestra 4	1	36.5731	3533	36.6653	3506	36.9856	3566	37.2260	3564	37.2431	3553	38.9299	3548
Muestra 4	2	36.6156	3537	36.6684	3506	36.9761	3565	37.2549	3567	37.2207	3551	39.1168	3565
Muestra 4	3	36.7902	3554	36.6648	3506	36.9805	3566	37.2819	3570	37.9229	3618	39.0577	3559
Muestra 5	1	35.8087	3459	35.6470	3409	35.9519	3467	36.1774	3464	36.4663	3479	37.9229	3456
Muestra 5	2	35.9982	3477	35.8101	3424	36.0012	3471	36.1587	3462	36.4666	3479	37.9046	3454
Muestra 5	3	36.0789	3485	35.7465	3418	36.1837	3489	36.3091	3476	36.5424	3486	38.0370	3466
Muestra 6	1	36.9439	3569	36.7084	3510	36.9133	3559	37.0869	3551	37.3475	3563	38.7726	3533
Muestra 6	2	37.0587	3580	36.7528	3514	36.9269	3561	37.0798	3550	37.3884	3567	38.7126	3528
Muestra 6	3	37.1457	3588	36.6736	3507	36.8793	3556	37.1182	3554	37.4559	3573	38.8490	3540
PROM.			3540.1		3528.4		3561.6		3543.9		3540.1		3524.7
D. STD			37.71		72.01		46.08		41.71		40.88		51.42
C.V. %			1.07		2.04		1.29		1.18		1.15		1.46

NOTA: Cada gramo de Estandar de Vitamina A equivale a 97250 UI de Vitamina A

TABLA No. 6.2

REPRODUCTIBILIDAD DEL METODO
Unidades Internacionales de Vitamina A por tableta

Analista 1	X ²	Analista 2	X ²	Analista 3	X ²	Analista 4	X ²	Analista 5	X ²	Analista 6	X ²	
3545	12567025	3654	13351716	3588	12873744	3569	12737761	3541	12538681	3541	12538681	
3555	12638025	3652	13337104	3597	12938409	3586	12859396	3557	12652249	3551	12609601	
3556	12645136	3641	13256881	3589	12880921	3579	12809241	3472	12054784	3556	12645136	
3515	12355225	3592	12902464	3552	12616704	3549	12595401	3513	12341169	3524	12418576	
3509	12313081	3494	12206036	3549	12595401	3505	12285025	3518	12376324	3385	11458225	
3521	12397441	3492	12194064	3554	12630916	3502	12264004	3521	12397441	3504	12278016	
3580	12816400	3561	12680721	3629	13169641	3560	12673600	3568	12730624	3574	12773476	
3583	12837889	3559	12666481	3626	13147876	3584	12845056	3583	12837889	3573	12766329	
3576	12787776	3563	12694969	3625	13140625	3599	12952801	3584	12845056	3588	12873744	
3533	12482089	3506	12292036	3566	12716356	3564	12702096	3553	12623809	3548	12588304	
3537	12510369	3506	12292036	3565	12709225	3567	12723489	3551	12609601	3565	12709225	
3554	12630916	3506	12292036	3566	12716356	3570	12744900	3618	13089924	3559	12666481	
3459	11964681	3409	11621281	3467	12020089	3464	11999296	3479	12103441	3456	11943936	
3477	12089529	3424	11723776	3471	12047841	3462	11985444	3479	12103441	3454	11930116	
3485	12145225	3418	11682724	3489	12173121	3476	12082576	3486	12152196	3466	12013156	
3569	12737761	3510	12320100	3559	12666481	3551	12609601	3563	12694969	3533	12482089	
3580	12816400	3514	12348196	3561	12680721	3550	12602500	3567	12723489	3528	12446784	
3588	12873744	3507	12299049	3556	12645136	3554	12630916	3573	12766329	3540	12531600	
PROMEDIO	3540.1	3528.2		3561.6		3543.9		3540.3		3524.7		
D. STD.	37.8	72.0		46.1		41.7		40.9		51.4		
C.V. †	1.07	2.04		1.29		1.18		1.16		1.46		
SUMAT.	63722	2.3E+08	63508	2.2E+08	64109	2.3E+08	63791	2.3E+08	63726	2.3E+08	63445	2.2E+08
SUMAT ²	4.1E+09		4.0E+09		4.1E+09		4.1E+09		4.1E+09		4.0E+09	
SUM ² /N	2.3E+08		2.2E+08		2.3E+08		2.3E+08		2.3E+08		2.2E+08	

TABLA No. 6.3
ANALISIS DE VARIANZA DE REPRODUCTIBILIDAD

SUM =	382301
CM =	1353278283.3
SUM(x^2)=	1353559939.0
SC Total =	281655.7
SCT =	15383.9
SCE =	266271.7
CMT =	3076.8
CME =	2610.5
F =	1.18
F critica =	2.29

13.2 FORMULAS

13.2.1

PROMEDIO

$$Y = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n}$$

Donde:

Y_i = Valor de cada una de las observaciones
 n = Número de observaciones

13.2.2

DESVIACION ESTANDAR:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - Y)^2}{n - 1}}$$

13.2.3

COEFICIENTE DE VARIACION:

$$C.V. = \frac{S}{Y} * 100$$

13.2.3

INTERVALOS 2S Y 3S DEL VALOR MEDIO:

$$2S = Y \pm 2 * S$$

$$3S = Y \pm 3 * S$$

13.2.4

INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95%:

$$Y \pm \frac{t_{(\alpha/2)} * S}{\sqrt{n}}$$

$$t = \frac{Y - \mu}{s / n}$$

Donde

Y = media de la población
 μ = ...media estimada

13.2.4 FORMULAS PARA ANALISIS DE VARIANZA:

CM = Sumatoria de todas las observaciones Y

$$CM = \frac{\left[\sum_{l=1}^n \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{n}$$

SC total = Suma de cuadrados de todas las Y

$$SC \text{ total} = \sum_{l=1}^n \sum_{j=1}^{n_l} (Y_{ij})^2 - CM$$

SCT = Suma de cuadrados de los totales de los tratamientos con cada cuadrado dividido entre el número de observaciones en dicho total menos CM

$$SCT = \frac{\sum_{i=1}^n T_i^2}{n} - CM$$

SCE = SC total - SCT

$$CMT = \frac{SCT}{p - 1}$$

Donde:
p = número de poblaciones.

$$CME = \frac{SCE}{n - p}$$

Donde:
n = número de observaciones
p = número de poblaciones.

$$F \text{ calculado} = \frac{CMT}{CME}$$

13.3 MARCO TEORICO

13.3.1 VALIDACION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, con estudios de laboratorio, que las características de ejecución de el método llenan los requerimientos para las aplicaciones analíticas proyectadas (14). Es una forma sistemática de asegurar que un método de análisis cumple con las características necesarias para poder ser utilizado en el análisis de un producto determinado (2).

Las características de ejecución son expresadas en términos de parámetros analíticos. Los parámetros analíticos típicos que deben ser considerados en la validación de un método son los siguientes:

Selectividad

Exactitud

Precisión del método

Precisión del sistema

Linealidad

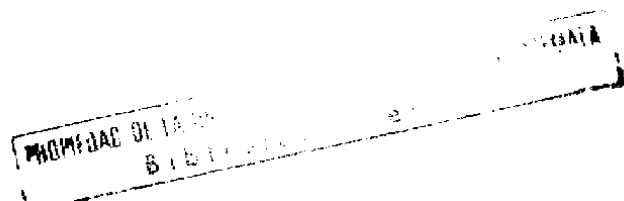
Reproductibilidad (13,14,2).

13.3.1.1 Selectividad

La selectividad, también llamada especificidad, de un método analítico es la capacidad de medir específicamente un componente en presencia de otros que puedan estar presentes en la matriz de la muestra (14). Es la capacidad que tiene un método analítico para diferenciar una sustancia de otra durante el análisis. Se analizan todos los componentes conocidos en forma ordenada, evaluados a determinadas concentraciones o en el límite de la especificación.

Pre-productos de síntesis

Post-productos de síntesis



Productos de degradación

Combinación de los 3 anteriores

Placebos

Componentes provenientes del empaque. (13,14)

Para métodos por cromatografía líquida de alta resolución, en tanto sea posible, la uniformidad de la señal del detector, será analizada como un criterio adicional. Exclusivamente se asegura la especificidad o selectividad del método para aquellas sustancias que fueron analizadas (2).

La prueba de selectividad es satisfactoria siempre y cuando el cromatograma incluya un listado de sustancias con sus correspondientes tiempos de retención, así como los picos desconocidos provenientes de los pre-productos y post-productos del placebo. De ser posible, deberán ser caracterizados con el tiempo de retención relativo (2).

13.3.1.2 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor real y el valor encontrado durante el análisis (2). Es una medida del valor real de un método analítico (13,14).

Como valor real se acepta:

Valor proveniente de un método validado (método por igualación)

Placebo más una cantidad conocida de activo.

Muestra más una cantidad conocida de activo.

La exactitud esta definida para:

La desviación de la media (\bar{X}) encontrada y el t-test.

La cantidad obtenida en porcentaje durante el análisis con una confianza del 99.9% ($\alpha = 0.05\%$) (2).

13.3.1.3 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de análisis individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea. La precisión es una medida de el grado de reproductibilidad de un método analítico bajo condiciones operacionales normales (13).

13.3.1.4 Precisión del método

La repetición de la desviación estándar describe las ocasionales dispersiones en los resultados del análisis. Durante una prueba particular la aplicación repetitiva del método en un equipo tiende a un valor central.

El analista verificará el método analítico, y efectuará las mediciones durante la corrida. Para calcular la repetibilidad de la desviación estándar se requiere por lo menos 6 resultados. Cada muestra debe seguirse según el método. La precisión del método se mide con:

La repetibilidad de la desviación estándar.

El coeficiente de variación

Intervalos 2S y 3S del valor medio.

Nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

Posterior a la recepción de un método analítico en cualquier laboratorio, la determinación y la comparación de la desviación estándar es complementario (13).

13.3.1.5 Precisión del sistema

Es una medida de la oscilación y desviación del sistema con la realidad. En rutina, para métodos HPLC podrá ser evaluado igualando los resultados obtenidos al inyectar una misma solución por duplicado.

Como medición de la precisión del sistema tenemos:

La repetibilidad de la desviación estándar

El coeficiente de variación

Intervalos 2S y 3S del valor medio.

Nivel de confianza del 95% (=0.05%) (2).

La precisión de un método analítico se determina analizando un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea adecuado para calcular la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los ensayos en este contexto son análisis independientes de muestras que han sido sometidas a un procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final (13).

13.3.1.6 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico de definir en forma matemática que los resultados de un ensayo son directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración de la muestra dentro de un rango dado. Usualmente es expresada en términos de la varianza alrededor de la línea de regresión calculada de acuerdo a una relación matemática establecida a partir de los resultados obtenidos por las muestras analizadas con concentraciones variables del activo (13).

Para métodos HPLC es la capacidad de un método analítico de definir en forma matemática que la señal recibida es proporcional a la concentración. La linealidad se debe comprobar en el rango de trabajo; esto significa que la cantidad de activo debe ser evaluada en los siguientes puntos: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración teórica. Los valores se grafican en función de la concentración. Esto soporta el grado de confiabilidad de acuerdo a los intervalos de confianza y regresión lineal de una recta. Se deberá calcular el intercepto y la pendiente de la recta (2).

13.3.1.7 Reproducibilidad:

La reproducibilidad de un método analítico es el grado de variación de los resultados obtenidos por el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones normales de ensayo, tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de ensayo, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes días, etc. Es una medida de la reproducibilidad de los resultados de análisis bajo condiciones normales de laboratorio a laboratorio y de analista a analista (13).

Al emplear un método analítico pueden variar las condiciones del aparato, los reactivos, así como también las soluciones e influir en los resultados satisfactorios del análisis. Todas las variaciones observadas deberán ser reportadas por escrito. Al recibir un método de análisis la reproducibilidad del sistema puede ser complementada comparando las desviaciones estándar obtenidas en cada análisis (13).

La comparación de la desviación estándar informa sobre probables desviaciones de los resultados de una muestra analizada bajo diferentes condiciones, por ejemplo: diferentes equipos, analistas, muestras o diferente tiempo.

Para comparar y calcular las diferentes desviaciones estándar es necesario por lo menos 3 muestras y 2 analistas diferentes para la obtención de resultados.

En la validación de métodos HPLC, para cada muestra es necesario calcular la desviación estándar de 6 inyecciones como mínimo, analizadas bajo las mismas condiciones (igual que para la precisión del método) (2).

Antes de validar cualquier método de análisis se deberá comprobar que los resultados son correctos. El método de validación debe ser totalmente documentado.

El alcance de la validación debe ser enmarcado dentro del rango de trabajo en el que será empleado.

En general, el alcance de la validación se puede resumir de la siguiente manera:

Categoría I: Método para:

Cuantificación de un principio activo.

Cuantificación de principios activos y excipientes en productos terminados.

Categoría II: Método para:

Productos de degradación presentes en un principio activo.

Productos de degradación presentes en un producto terminado.

Métodos cuantitativo para caracterizar un medicamento (prueba de disolución).

Cualquier desviación del esquema anterior, deberá ser argumentado por escrito en forma breve (2).

13.3.2 CROMATOGRAFIA

13.3.2.1 HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia variedad de técnicas de separación basadas en la partición entre una fase en movimiento que puede ser un líquido o un gas y una fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida (6,8,11).

El descubrimiento de la cromatografía es generalmente acreditado a Tswett, quien en 1903, separó pigmentos de plantas por cromatografía de adsorción. La técnica no fue seguida hasta la década de 1930 cuando Kuhn y Lederer y Reichstein y Van Euw usaron de nuevo la cromatografía de adsorción para la separación de productos naturales (6).

La cromatografía decayó por muchos años. Si la técnica fue usada, se hizo generalmente en la forma líquido-sólido (LSC). Luego, a finales de la década de los treinta y principios de los cuarenta, la cromatografía comienza a desarrollarse.

El fundamento para la cromatografía en capa fina (TLC, thin layer chromatography) fue establecido en 1938 por Izmailov y Schraiber y posteriormente refinado por Stahl, en 1958 (6).

El remarcable trabajo de Martin y Synge en 1941 (por el cual ganaron el premio Nobel) no solo revolucionó la cromatografía líquida sino en general ubicó el escenario para el desarrollo de la cromatografía gaseosa y la cromatografía en papel. En 1952, Martin y James publicaron el primer trabajo sobre cromatografía gaseosa. Entre 1952 y finales de la década de los 60's la cromatografía gaseosa se desarrolló dentro de una técnica analítica sofisticada (6,8).

La cromatografía fue practicada en columnas de vidrio de gran diámetro bajo condiciones atmosféricas esenciales. Los tiempos de análisis fueron largos y el procedimiento entero fue generalmente muy tedioso.

A finales de los años 60's se hizo más y más énfasis sobre el desarrollo de la cromatografía líquida como una técnica complementaria a la cromatografía de gases. La cromatografía líquida de alta presión fue mejorada en este esfuerzo (8).

13.3.2.2 DEFINICION

La cromatografía es un conjunto de técnicas de separación. Mezclas complejas se separan en sus componentes individuales por diferencias de distribución entre 2 fases:

La fase móvil y
la fase estacionaria (3).

La fase móvil puede ser:

Un gas en cuyo caso se trata de cromatografía de gases.

Un líquido en cuyo caso tenemos cromatografía líquida.

A su vez, la cromatografía líquida se divide en:

Cromatografía en columna

Cromatografía de superficie: de capa fina y de papel.

La cromatografía en columna admite cinco tipos principales que incluyen:

1. Cromatografía líquido-sólido o cromatografía de adsorción.

2. Cromatografía líquido-líquido o cromatografía de partición.
3. Cromatografía de enlace químico.
4. Cromatografía de intercambio iónico.
5. Cromatografía de exclusión. De esta última se conocen dos modalidades:
 - a. Cromatografía de permeación en gel.
 - b. Cromatografía de filtración en gel (3,6,8,11).

13.3.2.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica usada para separar componentes de una mezcla química. Estos componentes (o solutos) son primeramente disueltos en un solvente líquido y luego son forzados a fluir a través de una columna cromatográfica bajo presión alta. En esta columna, la mezcla es resuelta en sus componentes. La cantidad de resolución es importante y es dependiente de la extensión de la interacción entre los componentes del soluto y la fase estacionaria. La fase estacionaria esta definida como un material de empaque inmóvil en la columna. La parte en movimiento del sistema es la fase móvil, la cual es un líquido. La interacción de el soluto con las fases móvil y estacionaria puede ser manipulada a través de diferentes solventes y columnas. Como resultado la cromatografía líquida de alta resolución adquiere alto grado de versatilidad no encontrado en otros sistemas cromatográficos. De esta forma la técnica HPLC tiene la capacidad de separar fácilmente una amplia variedad de mezclas químicas (11).

13.3.2.4 COMPONENTES DEL SISTEMA

En la instrumentación de la cromatografía líquida se necesita una bomba de alta presión para empujar el solvente a través de una válvula de inyección, lugar donde se introduce la muestra, luego pasa a través de una corta y estrecha columna de acero inoxidable rellena compactamente con partículas pequeñas. El solvente y los componentes

separados de la muestra pasan a través de un detector en donde se mide su concentración. La señal del detector se traslada a un registrador que imprime el cromatograma el cual consiste en una serie de picos cada uno de los cuales representa un componente de la mezcla original.

Las principales diferencia entre la técnica HPLC y la cromatografía en columna son:

La técnica HPLC utiliza bombas de alta presión, columnas cortas y estrechas empacadas con partículas pequeñas y un detector, el cual registra continuamente la concentración de los componentes.

Estas circunstancias determinan las ventajas de la instrumentación HPLC.

Antes de inyectar la muestra, el solvente es bombeado del reservorio a través del inyector, columna, detector hasta obtener una línea base recta. Luego, se inyecta la muestra y el solvente o la fase móvil la lleva a la columna. Esta retendrá más tiempo algunos componentes que otros. Eventualmente, cada uno de ellos pasará al detector, diluido en el solvente. Los picos impresos en el cromatograma corresponden a cada uno de los compuestos separados en la columna (11).

La temperatura de la columna cromatográfica debe mantenerse constante.

13.3.2.5 METODO

La columna debe ser equilibrada con la fase móvil prescrita.

Se prepara la solución de la sustancia a ser examinada y la solución de referencia o soluciones de referencia. La solución debe ser libre de partículas sólidas. Usando la solución de referencia se determina la adecuabilidad del sistema y las cantidades a ser inyectadas para producir una respuesta adecuada. Se llevaran inyecciones repetidas para verificar la repetibilidad de la respuesta y chequear, si se requiere, el número de platos teóricos.

Se inyecta la solución y se registran los cromatogramas resultantes. Las inyecciones se llevan en replica para verificar la repetibilidad de la respuesta. Se determina el área de

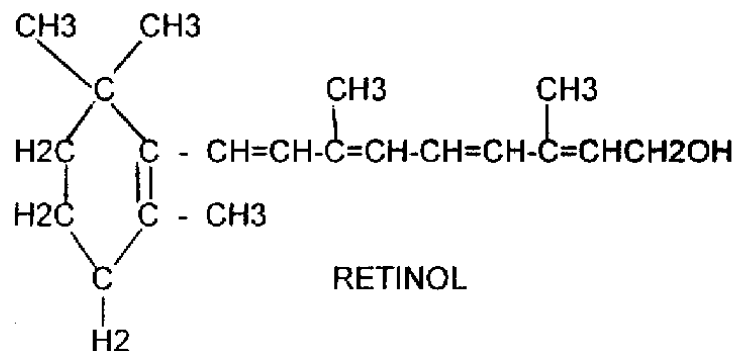
los picos, o, alternativamente cuando el factor de simetría calculado está entre 0.80 y 1.20, las alturas de los picos correspondientes a los componentes de interés. De los valores obtenidos, se calcula el contenido del componente o los componentes a determinar (6,11).

13.4 MONOGRAFIA DE LA VITAMINA "A"

13.4.1 QUIMICA Y ESTADO NATURAL

La observación de Steenbock (1919) de que el contenido de vitamina A en las hortalizas variaba según el grado de pigmentación abrió el camino al descubrimiento de la naturaleza química de la vitamina. Euler y sus colaboradores (1929) y Moore (1929) demostraron que el caroteno purificado es una fuente muy poderosa de vitamina A.

Se conocen varias formas de vitamina A, término que frecuentemente se emplea para significar cualquiera de ellas. El retinol (vitamina A1) es un alcohol primario que se halla esterificado en tejidos animales y peces de agua salada, principalmente en el hígado. Su fórmula de estructura, establecida por Karrer y sus colaboradores (1931) es la siguiente:



El 3-dehidrorretinol (vitamina A2), se obtiene de los tejidos de peces de agua dulce, generalmente mezclado con retinol, del que se diferencia por un segundo doble enlace en el anillo. Cumple las mismas funciones, sigue los mismos procesos bioquímicos y tiene 30 por ciento de la potencia del retinol, forma a la cual no es convertible naturalmente.

Existen varios isómeros geométricos del retinol por las posibles configuraciones cis-trans de la cadena lateral con sus dobles enlaces. Los aceites de hígado de pescado contienen mezclas de los estereoisómeros; el retinol sintético es exclusivamente el isómero trans. La interconversión de los isómeros se realiza fácilmente en el organismo. En el ciclo visual, la reacción entre la retinal (aldehído de la vitamina A) y la opsina para formar rodopsina sólo se efectúa con un determinado isómero cis.

Son posibles ciertas modificaciones de la estructura del retinol sin que la molécula pierda su actividad. El ácido retinóico es muy potente para estimular el crecimiento de animales que sufren deficiencia de vitamina A, pero no es útil para la función visual ni para restablecer la función reproductora en algunas especies en las cuales el retinol sí resulta eficaz.

Los ésteres y éteres derivados del alcohol son también activos. Para la actividad biológica de todos estos compuestos es esencial la estructura anular del retinol (beta-yonona), o la más insaturada del anillo del 3-dehidrorretinol (dehidro-beta-yonona). Por la hidrogenación se destruye la actividad biológica. De todos los derivados conocidos, el trans-retinol y su aldehído, el retinal, son los más potentes.

13.4.2 FARMACOLOGIA

13.4.2.1 ACCIONES FARMACOLOGICAS

La vitamina A, que tiene un papel esencial en procesos bioquímicos y fisiológicos, no causa efectos tóxicos cuando se da en pequeñas dosis; pero en administración masiva posee notable toxicidad.

La vitamina A tiene un papel esencial en el funcionamiento de la retina; es esencial para la integridad de las células epiteliales. La vitamina A se necesita para el crecimiento, especialmente del hueso, la reproducción y el desarrollo embrionario. También tiene un efecto estabilizante sobre varias membranas, actúa regulando la permeabilidad membranosa y puede intervenir en la formación de miscelas.

13.4.2.2 SIGNOS Y SINTOMAS DE LA DEFICIENCIA

Como sucede con todas las sustancias esenciales de los alimentos, la deficiencia de retinol retarda el crecimiento y el desarrollo normales. Por ello, la valoración de vitamina A se basa en la capacidad de la vitamina para restaurar el crecimiento normal en ratas alimentadas con una dieta deficiente de vitamina A y completa en todos los demás nutrientes.

La deficiencia de vitamina A es muy frecuente en Asia suroriental, Oriente medio, Africa y América del sur, sobre todo en niños y se acompaña de desnutrición general. La deficiencia de vitamina A puede ser mortal, especialmente en lactantes y niños pequeños que sufren Kwashiorkor o marasmo.

Los signos y síntomas de deficiencia ligera de vitamina A fácilmente pasan inadvertidos. La manifestación primera y más fácil de reconocer es la nictalopia, aunque su comienzo sólo se presenta cuando la falta de vitamina A es intensa. Además de los efectos sobre desarrollo y crecimiento, la deficiencia de vitamina A se acompaña de queratinización del epitelio, especialmente de conjuntiva y córnea. Frecuentemente hay trastorno de gusto y olfato en individuos que sufren carencia de vitamina A, resultante indudablemente de su efecto queratinizante. También puede disminuir la audición.

13.4.2.3 HIPERVITAMINOSIS A

La ingesta de vitamina A en gran exceso sobre las necesidades diarias corporales resulta en un síndrome denominado hipervitaminosis A. En todos los casos infantiles se reporta ingestión crónica de 50,000 a 500,000 unidades por día ya por exceso en la profiláctica paterna, ya por confusión entre el aceite de hígado de percoformo y el menos potente aceite de hígado de bacalao.

Los primeros signos y síntomas de la intoxicación con vitamina A son irritabilidad, vómitos, pérdida de apetito, cefalea, piel seca y pruriginosa y descamación cutánea. Se han observado también fatiga, mialgia, pérdida del vello corporal, nistagmo, gingivitis,

hepatosplenomegalia y engrosamiento de los ganglios linfáticos. La presión intracraneal puede estar aumentada y se han registrado síntomas neurológicos que semejan los de tumor cerebral. Las radiografías muestran hiperostosis en el hueso subyacente. En la sangre la única anormalidad consiste en la considerable elevación del nivel de vitamina A en el plasma que confirma el diagnóstico.

13.4.2.4 FARMACOCINETICA

La vitamina A es fácilmente absorbida en el conducto digestivo normal. Y, a pesar de su naturaleza liposoluble, las dispersiones acuosas del retinol o de sus ésteres son absorbidas más rápidamente y de modo más completo que las soluciones oleosas.

La absorción en el intestino se efectúa por transporte activo y es sensible a los inhibidores metabólicos. Los ésteres de retinol son hidrolizados en la luz del intestino por enzimas pancreáticas, y dentro del borde ciliado de la célula intestinal antes de ser absorbidos y después de la absorción son reesterificados, principalmente en forma de palmitato. Puede haber varios ciclos de hidrólisis y reesterificación. También se absorben cantidades importantes de vitamina A directamente hacia la circulación.

Los ésteres de ácidos grasos de cadena larga entran en la circulación por transporte en la fracción de quilomicrones de la linfa. El retinol esterificado llega en el plasma a su cantidad máxima en el término de cuatro horas después de la administración de la vitamina.

La mayor parte de la vitamina es almacenada en el hígado, principalmente en hepatocitos parenquimatosos, en forma de éster de palmitato; hay una pequeña cantidad de retinol en las células de Kupffer (4).

13.5 METODOS DE ANALISIS PARA VITAMINA A

Se han utilizado procedimientos biológicos, colorimétricos, espectrométricos y fluorométricos para determinar y cuantificar vitamina A (9).

13.5.1 METODOS BIOLOGICOS

El ensayo biológico en ratas es de valor debido a que da un total de la figura de potencia de la vitamina A la cual es la suma de las potencia de vitamina A y sus isómeros y de varias provitaminas y sus isómeros los cuales pueden estar presentes en cualquier muestra. El método biológico es el único medio de determinar la actividad fisiológica de vitamina A presente en una sustancia.

Dieta para ensayo de vitamina A:

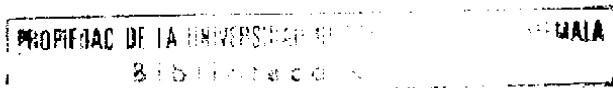
	Porcentaje
Caseina (libre de vitamina A	18.0
Mezcla de sales	04.0
Levadura seca	07.9
Almidón	65.0
Aceite vegetal	05.0
Levadura irradiada	0.10

Procedimiento:

Ratas de 28 días de edad, con un peso entre 40 y 50 gramos son alimentadas con la dieta libre de vitamina A por un período de 24 a 45 días o hasta que se observen manifestaciones características de deficiencia de vitamina A. A partir del 21 día de deplección se registran el peso corporal y la condición del ojo de cada rata. La condición del ojo se designa como normal, húmedos, sensitivos a la luz, hinchados, con exudado sanguíneo, purulento, etc.

Período de ensayo:

Las ratas adecuadas para el período de ensayo son separadas en grupos de por lo menos 6 o más ratas en cada uno. Las ratas son colocadas en cajas individuales. Un grupo



de ratas servirá como control negativo y un grupo es usado como grupo de referencia, al cual le será administrada una cantidad conocida de aceite U.S.P. de referencia. Durante el período de ensayo, las ratas en el grupo de ensayo y el grupo de referencia reciben una dosis diaria de aceite de referencia o aceite de prueba, la cantidad no excede de 0.1 mL de el aceite diluido. El aceite diluido debe ser almacenado en la oscuridad a una temperatura no superior a 10°C, y por un período de no más de siete días. Los registros se hacen sobre el peso de las ratas y la condición del ojo.

Interpretación de resultados:

La potencia de la vitamina A de el aceite de prueba se determina por comparación de su actividad contra el aceite de referencia (11).

13.5.2 METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

La vitamina A pura (retinol, todos-trans) en isopropanol tiene una absorción máxima a 325 nm. La extinción a esta longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de vitamina, de tal modo que la cantidad total de vitamina A puede calcularse en unidades internacionales por gramo de muestra a partir de la extinción medida E, la concentración en gramos de muestra por 100 mL y el espesor de la celda (5).

13.5.2.1 Método

Se pesa cuantitativamente alrededor de un gramo de la muestra dispuesta en un frasco de saponificación de cuello largo y se calienta a reflujo en un baño de agua con 30 mL de etanol y 3 mL de solución de hidróxido de potasio, en corriente de nitrógeno libre de oxígeno, durante treinta minutos. Se deja enfriar la muestra a la temperatura ambiente. Se lava en un embudo de separación empleando un total de 35 mL de agua y se extrae con cuatro porciones de 30 mL de éter dietílico o de petróleo. Se reúnen los extractos de éter obtenidos y se lavan con agua destilada, hasta que la fase acuosa ya no da coloración

rosada con solución de fenolftaleína. Se lleva a volumen a 250 mL en un balón aforado con el disolvente apropiado.

25 mL de esta solución (u otra alícuota, de acuerdo con la concentración de vitamina A) se evaporan inmediata y cuidadosamente en baño de agua hasta que se elimina totalmente el disolvente. Los últimos 5 mL deben evaporarse en corriente de nitrógeno. Se recoge el residuo con la cantidad suficiente de isopropanol para proporcionar una concentración en vitamina A de alrededor de 10 a 15 UI por mL de solución. Se mide la extinción de esta solución a longitudes de onda de 310, 325 y 334 nm, en una cubeta de cuarzo de un centímetro, frente a isopropanol. La extinción corregida se calcula como sigue:

$$E_{\text{corr.}} = 6815 E_{325} - 2.555 E_{310} - 4.260 E_{334}$$

La cifra resultante se convierte en unidades internacionales de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{E_{\text{corr.}}}{c \times d} \times 1.830 = \text{UI de vitamina A por gramo o por tableta.}$$

En estas fórmulas, E₃₂₅, E₃₁₀ y E₃₃₄ representan las extinciones medidas a las correspondientes longitudes de onda; c es la cantidad de muestra (peso en gramos o número de tabletas) en 100 mL de la solución isopropanólica final, por tanto, si se han evaporado 25 mL de la solución etérea y el residuo se ha redisoluelto en 50 mL de isopropanol, resultaría c = 0.2 para un peso de un gramo de la muestra original.

Si no se aplica la corrección, el contenido en vitamina A se calcula directamente a partir de la extinción a 325 nm.

$$\frac{E_{325}}{c \times d} \times 1,830 = \text{UI vitamina A por gramo o tableta.}$$

(5,12)

13 5.3 ANALISIS DE VITAMINA A POR CONVERSION EN ANHIDROVITAMINA A SEGUN EL METODO DE BUDOWSKI Y BONDI

La vitamina A-alcohol disuelta en benceno anhidro pierde una molécula de agua en presencia de ácido p-toluensulfónico y se convierte en anhidro-vitamina A. Este hidrocarburo altamente desaturado tiene un espectro de absorción característico, notablemente distinto del de la vitamina A. De los dos máximos bien definidos que posee a 377 y 399nm, el último es más apropiado para la medida, puesto que la vitamina A pura no muestra prácticamente absorción en esta zona. Budowski y Bondi han demostrado que el análisis basado en esta reacción, es decir, la medida del incremento en la extinción a 399 nm después de la deshidratación, supera en especificidad a la determinación espectrofotométrica.

13.5.3.1 Método:

Se saponifica la muestra de acuerdo con el método descrito para la determinación espectrofotométrica. La fracción insaponificable se extrae de la forma habitual a partir de la solución hidrolizada. Se lava la solución, se deseca con sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente orgánico mediante destilación. El residuo seco, que contiene la vitamina A, se redisuelve en la cantidad suficiente de benceno recién destilado para proporcionar una solución (solución de vitamina A) que contenga de 5 a 50 UI de vitamina A por mL.

Se pipetea 2 mL de la solución de vitamina A en un matraz aforado de 10 mL, se completa el volumen hasta la señal de aforo con el reactivo deshidratante y se mezcla inmediatamente lo más completamente posible.

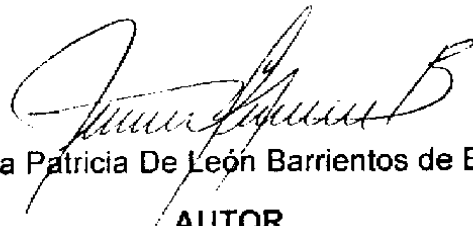
Transcurridos uno o dos minutos desde la mezcla, se vierte la solución en un pequeño embudo de decantación que contenga 10 mL de solución de hidróxido de sodio 0.5 N y se agita durante un minuto; se deja en reposo para que se separen las fases y se desprecia la capa acuosa. La capa bencénica se seca con un poco de sulfato sódico anhidro y se filtra

a través de un filtro seco. La extinción de esta solución (solución de anhidro-vitamina A) se mide a 399 nm frente a 2 mL de la solución de vitamina A y 8 mL de benceno, empleando un espectrofotómetro. El valor de extinción medido (E) representa el incremento en opacidad de la solución debido a la deshidratación de la vitamina A y puede ser convertido en UI mediante la siguiente fórmula:

$$E = \text{UI de vitamina A por mL de la solución en benceno de la}$$

$$0.0122 \quad \text{fracción insaponificable (solución de vitamina A) (5).}$$

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA
Biblioteca Central



Sandra Patricia De León Barrientos de Barco

AUTOR



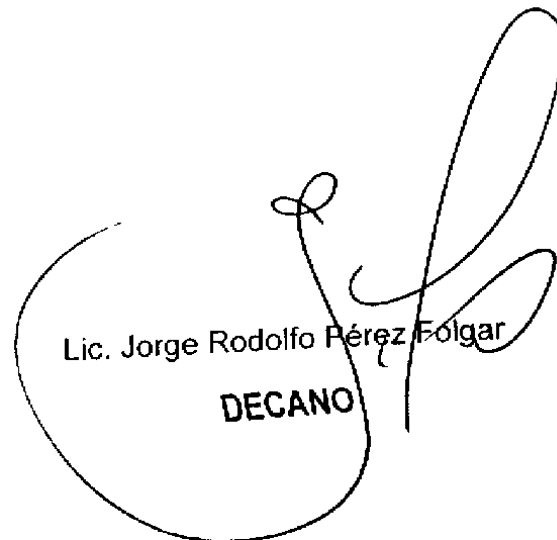
Ing. Oscar Vásquez Antillón

ASESOR



Licda. Beatriz Batres de Jiménez

DIRECTORA



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

DECANO