

INCERTIDUMBRE EN MÉTODOS FARMACOPEICOS I: VOLUMETRÍA Y PRUEBAS LÍMITE

Valencia Ana Carolina, Olvera María de los Angeles
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Unidad de Metrología
Cd. Universitaria, Edificio A PB Lab. A004
56223759 maot@servidor.unam.mx

Resumen: La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es la norma de calidad para medicamentos y materias primas. Los requisitos de calidad son descritos en las monografías. Los métodos de ensayo para cumplir con éstos son descritos en los métodos generales de análisis (MGA). La interpretación de los resultados en los MGA es muy variada van desde determinaciones cuantitativas hasta apreciaciones cualitativas de cambio de color o apreciación visual de precipitados. Esta diversidad de interpretaciones complica la evaluación cuantitativa de la calidad (estimación de la incertidumbre) reduciendo en estimaciones de carácter individual de análisis y discusión. Con la finalidad de ayudar a uniformar criterios para las auditorías, acreditaciones, certificaciones y autorizaciones por el sector salud, la Unidad de Metrología de la Facultad de Química analiza la estimación de la incertidumbre de algunos de los MGA contenidos en la FEUM. Incertidumbre en métodos farmacopeicos I es el primer documento de una serie de cuatro, en este se revisan dos métodos fisicoquímicos: uno cuantitativo y otro cualitativo, que son ejemplos de un gran grupo de MGA que pueden tratarse de manera similar.

1. INTRODUCCIÓN

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento oficial que precisa especificaciones, tolerancias y procedimientos de los medicamentos y sus materias primas en México, en especial los incluidos en el cuadro básico. Estas especificaciones del producto farmacéutico deben de cumplirse para su salida al mercado o para continuar con el proceso de fabricación, entre ellas podemos encontrar: niveles de impurezas o disolventes residuales, presencia de aditivos, estudios de estabilidad, aseguramiento de procesos, control de materiales de envase, control del producto terminado, etc. Para evaluar el cumplimiento de las especificaciones, la FEUM propone los métodos analíticos oficiales y los denomina Métodos Generales de Análisis (MGA).

Los MGA se pueden clasificar como determinaciones, identificaciones, valoraciones, límites, prueba y análisis oficiales[1]. Cada uno de estos métodos tiene su propia naturaleza, algunos son cualitativos y otros cuantitativos. En los primeros, la estimación de incertidumbre normalmente no se informa por no tener un valor numérico, sin embargo la credibilidad del resultado obtenido es de suma importancia por el tipo de decisión que se toma.

Aunque la guía para la expresión de la incertidumbre de las mediciones NMX-CH-140-IMNC-2002 [2] es el

documento oficial y general para la estimación de la incertidumbre de medición, no puede ser usado de manera literal en todos los casos ya que la aplicación es específica para el propio método de medición. Para estimar la incertidumbre hemos clasificado los MGA de acuerdo a la naturaleza de métodos analíticos usados en: Fisicoquímicos, Espectrofotométricos, Cromatográficos, Biológicos y Microbiológicos y para cada uno de ellos en cualitativos y cuantitativos. En este trabajo, decidimos analizar dos MGA, que de acuerdo a la clasificación anterior sirven de ejemplo para su grupo y que consideramos ser de los más empleados en cualquier laboratorio de análisis de medicamentos.

Posteriormente a este trabajo se estudian otros métodos: en Métodos Farmacopeicos II se analizan algunos procedimientos analíticos espectrofotométricos, cromatograficos; en Métodos Farmacopeicos III se analizan los cualitativos en donde es necesario evaluar la incertidumbre a través de la ayuda de otros estadísticos como son: Teorema de Bayes, tablas de contingencia, límites de corte, curva características que representan la probabilidad de obtener resultados, etc., finalmente en Métodos Farmacopeicos IV se incluyen ejemplos de los métodos microbiológicos y biológicos que contiene la FEUM

La estimación de incertidumbre propuesto para los análisis cuantitativos es de acuerdo a la

Guía para la expresión de las incertidumbres [2] y para los cualitativos se hace una propuesta basada también en la guía y en las publicaciones de varios autores para pruebas cualitativas.[5][6]

2. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE PARA MGA FISCOQUÍMICOS

2.1 Métodos fisicoquímicos cuantitativos

En los métodos cuantitativos de los MGA se incluyen las valoraciones y determinaciones que establecen el contenido de un disolvente, un aditivo, un principio activo o una impureza en la muestra [1]. El valor numérico que se obtiene debe estar dentro de los límites indicados en la monografía específica del producto correspondiente. En estos casos, la normatividad [4] es aplicada sin ningún problema y se limita a las características especiales del método analítico. Un ejemplo de este tipo de métodos es el MGA 0991-Volumetría, aquí se definen las características para la titulación volumétrica de una sustancia en disolución ya sea directa, residual o en disolventes no acuosos. Se decidió ejemplificar particularmente con un método de titulación directa en donde se utiliza una solución valorada y se determina el punto final con ayuda de un indicador; la determinación del porcentaje de manitol en materia prima.

2.1.1 Volumetría directa % de manitol.

2.1.1.1 Método de medición

Para conocer la concentración de manitol se usa una reacción química cuyo punto final puede visualizarse mediante una sustancia indicadora. La reacción es llevada a cabo agregando poco a poco el reactivo en disolución a la disolución que contiene el analito cuya concentración se requiere conocer (el manitol). El volumen de reactivo gastado para llegar al final de la reacción nos permite el cálculo de la concentración del analito.

Para calcular el porcentaje de manitol se pesan alrededor de 200 mg de muestra y se diluyen a 250 mL con agua. De esta solución se toma una alícuota de 5 mL la que se titula con una solución de tiosulfato de sodio de normalidad conocida. Cada mililitro de solución de tiosulfato de sodio 0.02 N consumido, equivale a 0.3643 mg de manitol, este último valor se obtiene de una relación estequiométrica en donde esta involucrado el peso molecular del manitol

Modelo Matemático del Método General de Análisis:

$$\%Manitol = \left(\frac{V_m}{V_p}\right) \times \left(\frac{V_{Tit}}{P_{muestra}}\right) \times \left(\frac{N_{Na_2S_2O_4}}{0,02}\right) \times 0,3643 \quad (1)$$

Donde el %Manitol es el porcentaje de manitol contenido en la muestra; V_{Tit} es el volumen tiosulfato de sodio utilizado en la titulación; V_m corresponde a la dilución hecha con el matraz que equivale a 250 mL, V_p corresponde al volumen de la alícuota (5,0 mL) son las diluciones de la muestra; $P_{muestra}$ es el peso exacto de la muestra (alrededor de los 200 mg), $N_{Na_2S_2O_4}$ es la normalidad exacta del tiosulfato utilizado; 0,02 es un factor para convertir los mL de solución real a mL de solución 0,02N; finalmente 0,3643 es el factor de equivalencia reportado en la farmacopea.

2.1.1.2 Estimación de la incertidumbre Combinada

Para simplificar su estimación usamos las incertidumbres relativas considerando las fuentes planteadas en la figura 1 .

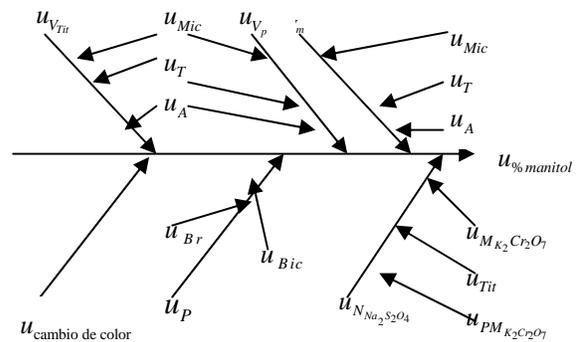


Fig. 1 Diagrama de causa y efecto estimación de la incertidumbre

Se propone la ecuación 2 donde:

- $u_{V_{Tit}}$ = incertidumbre del volumen gastado de tiosulfato de sodio
- u_{V_m} = incertidumbre del volumen de la dilucion de 250 mL
- u_{V_p} = incertidumbre de la parte alícuota (5 mL)
- $u_{N_{Na_2S_2O_4}}$ = incertidumbre de la normalidad del tiosulfato de sodio

$$u_{\%Manitol} = (\%Manitol) \sqrt{\left(\frac{u_p}{P}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_p}}{V_p}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{Tit}}}{V_{Tit}}\right)^2 + \left(\frac{u_{N_{Na_2S_2O_4}}}{N_{Na_2S_2O_4}}\right)^2 + \left(\frac{u_{M_{K_2Cr_2O_7}}}{M_{K_2Cr_2O_7}}\right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{K_2Cr_2O_7}}}{1}\right)^2} \quad (2)$$

Cada una de las incertidumbres parciales es evaluada haciendo las siguientes consideraciones:

$$u_{MIC} = \frac{u_{ic}}{\sqrt{6}} \tag{6}$$

2.1.1.2.1 Incertidumbres parciales

2.1.1.2.1.1.- Incertidumbre del peso de la muestra

Las fuentes de incertidumbre para el peso de la muestra son principalmente las aportadas por la balanza, la incertidumbre del informe de calibración (u_{Bic}) y la incertidumbre de la resolución de la balanza (u_{Br}) (Ec. 3). La incertidumbre de la resolución se obtiene considerando la división mínima (dm) y con una distribución rectangular (Ec. 4)

$$u_p = \sqrt{(u_{Bic})^2 + (u_{Br})^2} \tag{3}$$

$$u_{Br} = \frac{d.m.}{2\sqrt{3}} \tag{4}$$

2.1.1.2.1.2 Incertidumbre de la dilución y de la alícuota

La primera dilución a 250,0 mL nos proporciona tres fuentes de incertidumbre (Ec 5): la incertidumbre del informe de calibración del matraz volumétrico (u_{Mic}) que se considera una distribución triangular; la incertidumbre por corrección por temperatura (u_T) entre la calibración del matraz y la temperatura de trabajo que se considera rectangular; y la incertidumbre del aforo (u_A) la cuál se puede evaluar a través de un estudio de repetibilidad en donde se hagan varias repeticiones de aforo, se pese y se calcule la desviación estándar.

$$u_{mL} = \sqrt{(u_{Mic})^2 + (u_T)^2 + (u_A)^2} \tag{5}$$

La incertidumbre del informe de calibración (Mic) corresponde al informado por el laboratorio acreditado (certificado de calibración) de acuerdo al nivel de confianza y con una distribución triangular, por ello se divide entre la raíz de 6. (Ec 6).[3] El material volumétrico es calibrado a una temperatura y normalmente el laboratorio que mide trabaja en un gradiente de temperatura ΔT . La incertidumbre de este efecto es estimada conforme la ecuación 7. El factor $2,1 \times 10^{-4}$ corresponde al coeficiente de expansión volumétrica para el agua.

$$u_T = \frac{(V)(\Delta T)(2.1 \times 10^{-4})}{\sqrt{3}} \tag{7}$$

La incertidumbre del aforo es obtenida a partir de un estudio particular de repetibilidad con el recipiente volumétrico.

La incertidumbre por la alícuota de 5 mL tiene una contribución similar a la contribución de la dilución a 250 mL indicada en la ecuación 5. El único valor que varía en la contribución por corrección por temperatura de la ecuación 7, es el volumen utilizado que corresponde a los 5 mL de la alícuota.

2.1.1.2.1.3 Incertidumbre del volumen gastado en la titulación.

Para la estimación es necesario usar la ley de propagación de incertidumbre debido a la naturaleza del modelo matemático (Ec 8 y 9).

$$V = V_{muestra} - V_{blanco} \tag{8}$$

$$u_V^2 = \left(\frac{\partial V}{\partial V_{muestra}} \right)^2 u_{V_{muestra}}^2 + \left(\frac{\partial V}{\partial V_{blanco}} \right)^2 u_{V_{blanco}}^2 \tag{9}$$

$$\frac{\partial V}{\partial V_{muestra}} = 1$$

$$\frac{\partial V}{\partial V_{blanco}} = -1$$

Para la estimación de la incertidumbre del volumen de titulación consideramos 4 fuentes (Ec.10): las tres correspondientes a una medición volumétrica (calibración, temperatura y aforo) mencionadas anteriormente y una cuarta por la incertidumbre en la detección del punto final dependiente del operador, esta última se puede evaluar mediante un estudio independiente de repetibilidad. (Ec. 11).

$$u_{V_{tit}} = \sqrt{(u_{Mic})^2 + (u_T)^2 + (u_A)^2 + (u_{Punto_final})^2} \tag{10}$$

$$u_{Punto_final} = u_{repetibilidad} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \tag{11}$$

2.1.1.2.1.4 Incertidumbre de la concentración del tiosulfato

La disolución de tiosulfato es preparada de acuerdo a la farmacopea, el modelo matemático corresponde a la ecuación 12. Para simplificar el cálculo se considera la estimación de la incertidumbre combinada usando las incertidumbres relativas. (Ec 14). [3]

$$N_{Na_2S_2O_3} = \left(\frac{M_{K_2Cr_2O_7}}{V_{Tit}} \right) \times \left(\frac{1000}{PM_{K_2Cr_2O_7}} \right) \times \left(\frac{2eq_{Na_2S_2O_3}}{1mol_{Na_2S_2O_3}} \right) \times \left(\frac{1mol_{Na_2S_2O_3}}{1mol_{K_2Cr_2O_7}} \right) \quad (12)$$

Donde $N_{Na_2S_2O_3}$ es la normalidad del Tiosulfato de sodio, $M_{K_2Cr_2O_7}$ es la masa exacta en gramos del dicromato de potasio, $PM_{K_2Cr_2O_7}$ es el peso molecular del Dicromato de Potasio en g/mol y V_{Tit} es el volumen utilizado en la titulación a partir de la ecuación 13

$$V_{Tit} = V_{blanco} - V_{muestra} \quad (13)$$

La incertidumbre es estimada como incertidumbre relativa [3] de acuerdo a la ecuación 14.

$$u_{N_{Na_2S_2O_3}} = \left(N_{Na_2S_2O_3} \right) \sqrt{ \left(\frac{u_{M_{K_2Cr_2O_7}}}{M_{K_2Cr_2O_7}} \right)^2 + \left(\frac{u_{V_{Tit}}}{V_{Tit}} \right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{K_2Cr_2O_7}}}{PM_{K_2Cr_2O_7}} \right)^2 } \quad (14)$$

2.1.1.2.1.4.1 Incertidumbre del peso del dicromato

Se estima considerando los mismos factores que se consideraron para calcular el peso de la muestra (punto 2.1.1.2.1.1)

2.1.1.2.1.4.2 Incertidumbre del volumen utilizado durante la titulación

Se estima de la misma forma que en el punto 2.1.1.2.1.3 sustituyendo los correspondientes a esta titulación

2.1.1.2.1.4.3 Incertidumbre del Peso Molecular del Dicromato de Potasio

El cálculo se realiza de acuerdo a la publicación de EURACHEM [3] dónde consideran la suma de cada una de las incertidumbres de tipo triangular de cada uno de los elementos (Ec.15).

$$u_{PM_{K_2Cr_2O_7}} = \sqrt{ \left(\frac{u_{PM_K}}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{Cr}}}{\sqrt{3}} \right)^2 + \left(\frac{u_{PM_O}}{\sqrt{3}} \right)^2 } \quad (15)$$

Para calcular la incertidumbre de cada elemento por separado, se considera el valor informado por la IUPAC (u_{IUPAC}) [4] multiplicado por el número de átomos contenidos en la fórmula molecular (No) (Ec.16). Tabla 1

$$u_{PM_K} = u_{PM.IUPAC} \times No \quad (16)$$

Elemento	$u_{PM.IUPAC}$	$u_{PM.IUPAC} \times No = u_{PM}$
K	0.0001	0.0002
Cr	0.0006	0.0012
O	0.0003	0.0021

Tabla 1. Incertidumbre de los peso moleculares del dicromato de potasio.

2.2 Métodos fisicoquímicos cualitativos

La respuesta cualitativa suele ser binaria es decir si o no, o puede responder a distintas situaciones: presencia o ausencia de un analito en una muestra, o de un nivel de concentración que viene fijado por legislación o por el cliente. En el análisis cualitativo clásico la detección es de tipo sensorial es decir en base a los sentidos humanos como puede ser la vista, el olfato etc., en la mayoría de los casos se basa en la aparición o no de un determinado color como resultado de una reacción química, bioquímica o inmunológica. En este tipo de sistema se obtiene el resultado de manera directa sin ningún tratamiento de datos. Sin embargo la preparación de la muestra el peso de la muestra y el uso de material de referencia son fuentes de la estimación de la calidad en la determinación, por lo que es importante evaluar de alguna forma un valor cuantitativo de esa calidad.

Para ejemplificar este tipo de método, decidimos hacerlo con la prueba de límites.

En los límites se busca el contenido máximo que puede tener una muestra de acuerdo a las especificaciones en la monografía. Por ejemplo; en la monografía del acetato de magnesio la FEUM nos indica que el contenido de cloruros no debe ser mayor de $350\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (350ppm). A pesar de que en la prueba de cloruros el resultado es solamente comparar a simple vista la turbidez entre la solución de la muestra y la solución de referencia, ambas tratadas de la misma forma, la interpretación final es numérica. Por lo anterior y por el valor tan pequeño en la interpretación consideramos que en estos casos la evaluación de la calidad en la medición debe ser cuantitativa y debemos considerar las fuentes de incertidumbre

en las diluciones y la del material de referencia y no conformarnos con la evaluación de la calidad de los métodos cualitativos basada en teoremas de probabilidad, como Bayes, límite de corte, tablas de contingencia, curvas características que representan la probabilidad de obtener resultados positivos, pruebas de hipótesis entre otras.

2.2.1 MGA 0161 Límite de cloruros

2.2.1.1 Método de medición

Esta prueba se basa en la reacción de precipitación de los cloruros presentes en una muestra dada con una solución de nitrato de plata, el precipitado producido es de color blanco y se compara visualmente contra el precipitado producido por una cantidad conocida de cloruros.

2.2.1.2 Estimación de la incertidumbre

La incertidumbre informada corresponde a la incertidumbre de la satisfacción de la prueba límite de cloruros. Se considera una medida directa con valor de 1 y la incertidumbre es estimada como incertidumbres relativas.

Las fuentes de incertidumbre son aquéllas que pueden tenerse al preparar las soluciones, además una incertidumbre de apreciación del operador al cambio visual en la transparencia.

Para determinar los $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ en el caso de límite de cloruros, se consideran seis fuentes de incertidumbre (Fig. 2)

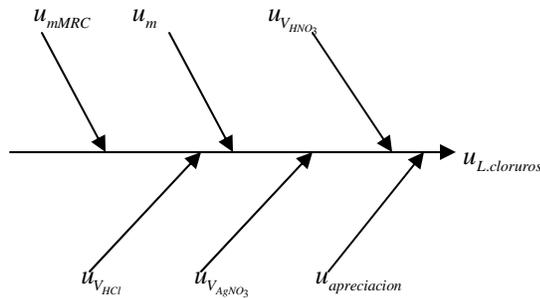


Fig. 2 Diagrama de Causa y Efecto de las fuentes de incertidumbre de la determinación de límites de cloruros

Las fuentes de incertidumbre son definidas como:

$u_{m_{SR}}$ = Incertidumbre del pesado del material de referencia.

$u_{m_{mta}}$ = Incertidumbre del pesado de la muestra

$u_{V_{nitrico}}$ =Incertidumbre del volumen del ácido nítrico

$u_{V_{HCl}}$ =Incertidumbre del volumen del HCl

$u_{V_{AgNO_3}}$ =Incertidumbre del volumen del nitrato de plata

$u_{apreciacion}$ =Incertidumbre de la apreciación de la turbidez

La incertidumbre de la satisfacción es evaluada mediante la propagación de las incertidumbres relativas, con un valor de mensurando 1 (Ec.17)

$$u_{propagacion} = \sqrt{\left(\frac{u_{m_{SR}}}{m_{SR}}\right)^2 + \left(\frac{u_{m_{mta}}}{m_{mta}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{nitrico}}}{V_{nitrico}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{HCl}}}{V_{HCl}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{AgNO_3}}}{V_{AgNO_3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{apreciacion\ del\ operador}}{1}\right)^2}$$

(17)

2.2.1.2.1 Incertidumbre de la apreciación de la turbidez

Para evaluar esta incertidumbre se propone un estudio en el que se aprecie el error estimado en tres diferentes niveles; para evaluar los que se digan que están por abajo y realmente están por arriba y así para cada nivel: 1.- Turbidez francamente menor a la solución de referencia, 2.- Turbidez similar a la solución de referencia 3.- Turbidez francamente mayor a la solución de referencia, esto variando a los operadores que llevan a cabo la prueba. Las muestras para los tres diferentes niveles deben ser apreciados por un experto reconocido previamente.

1.-Repetir la prueba por lo menos 15 veces con diferente operador y misma muestra subdividida en 15 partes y contar el número de veces en que la solución es detectada como menor a la solución de referencia $N_{m \geq 15}$. Se estima el porcentaje de error y se considera una distribución normal.

$$E_{\%} = \frac{(N_{m \geq 15})(100)}{15}$$

(18)

Para los dos siguientes niveles se propone repetir el punto 1 y estimar el % de error con muestras francamente de mayor turbidez a la solución del material de referencia Se propone de tipo rectangular, ésta estará determinada por el error en cada medición (Ec. 18)

$$u_{apreciacion\ operador} = \frac{E_{\%}}{\sqrt{3}}$$

(19)

La incertidumbre de la apreciación de la turbidez esta dada por las tres contribuciones (Ec. 20)

$$u_{apreciación} = \sqrt{(\% E_{T>S_R})^2 + (\% E_{T<S_R})^2 + (\% E_{T=S_R})^2} \quad (20)$$

2.2.1.2.2 Incertidumbre de la masa del material de referencia y la muestra

La masa del material de referencia y de la muestra aportan cada una incertidumbre obtenida de un tratamiento igual del explicado en el 2.1.1.2.1.1

2.2.1.2.3 Incertidumbre del volumen de los ácidos de tratamiento de muestra y del reactivo.

El volumen de los ácidos de tratamiento de muestra y del reactivo nitrato de plata aportan una incertidumbre estimada de la misma forma que en el punto 2.1.1.2.1.2 Con los datos correspondientes a esta determinación.

2.2.2 Interpretación del resultado de la estimación de la incertidumbre para el método cualitativo.

Para una prueba cualitativa de este tipo, la interpretación del resultado de la estimación de la incertidumbre es de acuerdo a la naturaleza de la prueba. Por ejemplo en la monografía del acetato de magnesio la FEUM nos indica que el contenido de cloruros no debe ser mayor de $350 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Nuestra respuesta si el valor del mensurando es menor de $350 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ entonces concluiríamos que la muestra cumple con el límite de cloruros. "La muestra analizada de acetato de magnesio tiene un contenido de cloruros menos de $350 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ con una incertidumbre de $\pm u_{\text{cppCloruros}}$ obtenida por la ecuación 16, dada en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

3. CONCLUSIONES:

El trabajo tiene dos aportaciones significativas, por un lado, propone una forma de evaluar de manera cuantitativa la calidad de la medición de pruebas límite, en las que una concentración límite evaluada de manera visual es determinante para decisiones importantes relacionadas con la salud, este tipo de estimaciones de incertidumbre no las considera la

NMX-CH-140-IMNC-2002. Por otro lado, se analiza la estimación de la incertidumbre para dos casos de estudio de los métodos generales de análisis (MGA) de la FEUM que puede ayudar a uniformar criterios en las auditorías para acreditaciones, certificaciones y autorizaciones del sector salud. De manera menos importante también clasifica, para estimar la incertidumbre de medición, a los MGA de acuerdo al método analítico usado y a su característica de cuantitativo y cualitativo; se mostró la estimación de la incertidumbre de dos métodos que son ejemplo para un grupo de la misma naturaleza analítica, lo que puede ayudar a los laboratorios a cumplir con las exigencias normativas para lograr demostrar la confiabilidad en sus procesos de medición. Se deja para un trabajo posterior analizar la estimación de la incertidumbre de los MGA restantes de la FEUM.

AGRADECIMIENTOS

Laboratorio de Control Analítico. A las profesoras Isaura Carrera García y Georgina Margarita Maya Ruiz por sus valiosos comentarios para los métodos de análisis.

REFERENCIAS

- [1] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) Vol 1 Octava Edición
- [2] NMX-CH-140-IMNC- 2002
- [3] Eurachem /Citac Guide C64 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition.
- [4] R.D.Loss Atomic Weights of the elements 2001. Pure Appl.Chem.,Vol 75, No 8, pp 1107-1122, 2003.
- [5] Alvarez-Coque ma. Celia, Ramis Ramos Guillermo. Quimiometría Edit. Síntesis 2001.
- [6] Miller,J. Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Edit. Pearson Prentice Hall, 2002