

# Determinación de carbendazina en suspensiones concentradas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)



Parra, J.; Matamoros, O.; Barrantes, D. Formulaciones Químicas S.A.: Puntarenas, Costa Rica.

## ■ ABSTRACT

Se presenta un método analítico rápido mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de carbendazina (metil 2-benzimidazol carbamato) en formulaciones comerciales. El procedimiento emplea una columna de fase reversa de octadecilos C18 y detección ultravioleta (UV) a 254 nm. La extracción del analito se realiza con metanol, utilizando carbaril como estándar interno para corregir variaciones en el proceso analítico. Los cálculos estadísticos de repetibilidad, ANOVA y veracidad, justifican la sensibilidad y aplicabilidad del método como una forma sencilla de evaluar la calidad de suspensiones concentradas.

## ■ INTRODUCCIÓN

La carbendazina,  $C_9H_9N_3O_2$  o *methyl 1H-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC)*, CIPAC 263, es un fungicida sistémico de amplio espectro utilizado para el control de diversos patógenos en la agricultura. Su aplicación más frecuente es como tratamiento post-cosecha para el control de hongos patógenos de frutas, vegetales, plantas ornamentales y gramíneas. Esta molécula frecuente formulaciones agrícolas como suspensiones concentradas (SC) dada la naturaleza química que le permite dispersarse con facilidad en agua con la ayuda de tensioactivos de alto HLB. La determinación y regulación de la cantidad de este material es esencial, debido a que la exposición oral de esta sustancia puede derivarse en la descomposición de metabolitos secundarios como el *5-hydroxy-2-benzimidazole carbamate (5-HBC)*, el cual posee efectos mutagénicos y disruptivos para el sistema endocrino de mamíferos.

La determinación cuantitativa de este carbamato mediante cromatografía de

gases (GC) presenta dificultades significativas debido a su degradación térmica y fenómenos de adsorción en la columna. Por su parte, las técnicas de espectrofotometría directa carecen frecuentemente de la especificidad necesaria ante la presencia de los subproductos de degradación que se describieron anteriormente. La técnica de HPLC en fase reversa se selecciona como la alternativa óptima por su capacidad de operar a temperatura ambiente y su alta resolución.

## ■ EXPERIMENTAL

**Instrumentación:** Se utilizó un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector UV (modelo Waters 48 o equivalente) y una Columna de fase inversa de octadecilo C18, 4.6 x 250 mm x 5 micras.

**Reactivos:** Carbendazina grado técnico, carbaril grado técnico y metanol grado HPLC.

**Preparación de soluciones:**

1. **Solución del IAGT:** Se miden 25 mg de carbendazina técnica en una balanza analítica y se disuelven en 100 ml de metanol.
2. **Solución del estándar interno STD:** 250 mg de carbaril técnico disueltos en 500 mL de metanol.
3. **Solución del estándar de trabajo:** 25 mg de carbendazina técnica disueltos en 100 mL de la Solución B.
4. **Preparación de la muestra:** Se pesa una cantidad de formulación comercial (SC) equivalente a 25 mg de carbendazina, se disuelve en 100 ml de la solución del estándar interno y se agita mecánicamente por unos minutos, luego se filtra a través de una membrana Econofilter Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  marca ALIGENT® de 25 mm de diámetro.

**Condiciones de operación:** Flujo de 1 ml/min, 7 min de tiempo de corrida, longitud de onda de 254 nm y una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua en proporción 60:40.

**Condiciones ambientales:** Para obtener resultados precisos y confiables la temperatura del laboratorio debe mantenerse entre 20 °C y 28 °C mientras la humedad relativa debe mantenerse entre 20 % y 80 %.

## ■ DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación, se desarrolla la discusión de los resultados obtenidos a partir del análisis cromatográfico del estándar de trabajo y de la una muestra comercial de una suspensión concentrada (SC) de carbendazina de aproximadamente 50%*m/v*, integrando un análisis estadístico descriptivo exhaustivo.

La repetibilidad mide la variabilidad de los resultados en un corto período bajo las mismas condiciones operativas (mismo analista, instrumento y reactivos). Para evaluar la precisión del sistema de calibración y del método analítico, se recopilaron las áreas de los picos cromatográficos para la carbendazina y el carbaril (EI), y se calcularon sus relaciones de área (ratios). Se obtuvo el promedio, varianza, desviación estándar y RSD de las áreas de ambos estándares y el área de la muestra de carbendazina.

$$\text{Promedio: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad [1]$$

$$\text{Varianza muestral: } s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad [2]$$

$$\text{Desviación estándar: } s = \sqrt{s^2} \quad [3]$$

$$\% \text{RSD: (RSD \%)} = \left( \frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad [4]$$

**Cuadro I.** Resultados de la integración de áreas obtenidas en la determinación de estándares y muestra por HPLC.

| Compuesto / Grupo                  | Promedio ( $\bar{x}$ ) | Varianza ( $s^2$ ) | Desviación Estándar ( $s$ ) | RSD (%) |
|------------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|---------|
| <b>Carbendazina (Analito)</b>      |                        |                    |                             |         |
| Estándar de Trabajo                | 3589245                | 111810176,3        | 10574,03                    | 0,29%   |
| Muestra (SC 50)                    | 4592231                | 2633565313         | 51318,27                    | 1,12%   |
| <b>Carbaril (Estándar Interno)</b> |                        |                    |                             |         |
| Estándar de Trabajo                | 10077359               | 222559550,3        | 14918,43                    | 0,15%   |
| Muestra (50 SC)                    | 10443791               | 239432844,5        | 15473,62                    | 0,15%   |

A partir de los resultados obtenidos, se calcula el porcentaje en masa de la carbendazina presente en la muestra, utilizando la ecuación 5.

$$\text{Ecuación [5]:} \quad \% \text{Carbendazina} = \frac{A_{\text{Carben-M}}}{A_{\text{Carba-M}}} \times \frac{A_{\text{Carba-STD}}}{A_{\text{Carben-STD}}} \times \frac{\text{mg}_{\text{Carben-STD}}}{\text{mg}_{\text{Carben-M}}}$$

En donde:

- $A_{\text{Carben-M}}$ : Área de carbendazina en la muestra
- $A_{\text{Carba-M}}$ : Área de carbaril en la muestra
- $A_{\text{Carba-STD}}$ : Área de carbaril en el estándar
- $A_{\text{Carben-STD}}$ : Área de carbendazina en el estándar
- $mg_{\text{Carben-STD}}$ : Masa en miligramos de la carbendazina en el estándar
- $mg_{\text{Carben-M}}$ : Masa en miligramos de la carbendazina en la muestra
- P: Pureza de la carbendazina estándar analítico.

Se utilizó la ecuación 5 para determinar la concentración presente de carbendazina en la muestra comercial que corresponde a una suspensión concentrada. Los resultados obtenidos se tabulan en el siguiente cuadro.

**Cuadro II.** Porcentaje en masa de carbendazina presente en la suspensión concentrada.

| <i>Parámetro Estadístico</i> | <i>Valor Calculado</i> |
|------------------------------|------------------------|
| <b>Réplica 1</b>             | 50,155                 |
| <b>Réplica 2</b>             | 50,848                 |
| <b>Promedio</b>              | 50,5015                |
| <b>Varianza</b>              | 0,2401                 |
| <b>Desviación Estándar</b>   | 0,49                   |
| <b>RSD (%)</b>               | 0,9703                 |

De acuerdo con el libro de Miller & Miller, un RSD inferior al 1% demuestra una excelente precisión y repetibilidad del método de extracción y análisis para la cuantificación en formulaciones comerciales como la presente en este informe. La desviación estándar relativa

del estándar (0,29% según el Cuadro I) y de la muestra (0,97%) se sitúan holgadamente por debajo del límite de aceptación comúnmente establecido para métodos HPLC en control de calidad de formulaciones, lo justifica que el sistema cromatográfico posee una excelente repetibilidad instrumental. Asimismo, el uso de la relación de áreas respecto al estándar interno garantiza un control muy estrecho de la dispersión de los datos cromatográficos.

Para comprobar si existe un sesgo sistemático en la cuantificación de carbendazina con este método analítico, se contrastó la concentración promedio obtenida de la muestra comercial se la suspensión concentrada, frente a su valor nominal absoluto declarado del 50% de ingrediente activo, empleando la prueba *t de Student* de una muestra para tamaños muestrales pequeños a partir de la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}}{s} \quad [6]$$

$$t = 1,44$$

Para un tamaño de muestra de  $n = 2$ , los grados de libertad asociados son  $v = n - 1$ ; entonces  $v = 1$ . El valor crítico de la distribución de dos colas a un nivel de significación del 5% es de  $t_{\text{crítico}} = 12,7062$ . Un valor sustancialmente mayor al  $t$  calculado de 1,44; por lo que, **se acepta la veracidad de una hipótesis nula** que asevera que no hay diferencia significativa entre el valor nominal o absoluto del producto, reportado como 50 SC y la concentración media obtenida por el método de determinación por HPLC.

Para profundizar en la estructura de la variabilidad del sistema cromatográfico y

examinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en las relaciones de área (ratios) obtenidas para los estándares de trabajo y la muestra comercial de carbendazina al 50% en suspensión concentrada, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Aunque químicamente se espera que existan diferencias en los ratios debido a que corresponden a diferentes niveles de concentración, este análisis permite demostrar la potencia del modelo y evaluar la variabilidad dentro de los grupos (variabilidad residual o error instrumental) y entre los grupos.

Suma total de cuadrados:

$$SS_{\text{total}} = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_{\text{grand}})^2 \quad [7]$$

Suma de cuadrados entre grupos:

$$SS_{\text{entre}} = \sum_{i=1}^p n_i (\bar{x}_i - \bar{x}_{\text{grand}})^2 \quad [8]$$

Suma de cuadrados dentro de los grupos (residual):

$$SS_{\text{intra}} = \sum_{i=1}^p (n_i - 1) s_i^2 \quad [9]$$

Estadístico F:

$$F = \frac{MS_{\text{entre}}}{MS_{\text{intra}}} = \frac{SS_{\text{entre}}/(p-1)}{SS_{\text{intra}}/(N-p)} \quad [10]$$

Utilizando las ecuaciones de la 7 a la 10, se obtienen los parámetros necesarios para discriminar sobre la varianza de los resultados obtenidos. En el siguiente cuadro se tabulan los resultados obtenidos:

**Cuadro III. Tabla de parámetros ANOVA.**

| Parámetro Estadístico  | Entre Grupos (Tratamiento) | Intra-grupo (Residual) | Total                 |
|------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Suma de Cuadrados (SS) | 8,37x10 <sup>-3</sup>      | 2,02x10 <sup>-5</sup>  | 8,39x10 <sup>-3</sup> |
| Grados de Libertad     | 1                          | 3                      | 4                     |
| Cuadrado Medio (MS)    | 8,37x10 <sup>-3</sup>      | 6,73x10 <sup>-6</sup>  | —                     |
| Estadístico F          | 1243.13                    | —                      | —                     |
| Valor-p                | 5,02x10 <sup>-5</sup>      | —                      | —                     |
| F crítico (95% conf.)  | 10.128                     | —                      | —                     |

El estadístico de contraste calculado, definido como la razón de los cuadrados medios ( $F_{\text{calculado}} = MS_{\text{Entre}}/MS_{\text{Intra}}$ ), fue de 1243,13 unidades. Al contrastar este resultado con el valor límite de la distribución a un nivel de significación del 5% (0.05), se halló que supera de forma importante al valor crítico de la tabla del Miller & Miller ( $F_{\text{crítico}} = 10,128$ ) [Calculado de datos], arrojando un valor-p considerablemente pequeño. Por lo tanto, El rechazo contundente de la hipótesis nula (si hay diferencia entre los promedios) a un nivel de confianza del 95% es plenamente coherente con el diseño experimental de esta metodología. El estándar puro y la formulación comercial de carbendazina en suspensión concentrada al 50%, fueron sometidos a procesos independientes de dilución y extracción, por lo que la diferencia significativa entre sus ratios demuestra que el método discrimina con total sensibilidad las variaciones de concentración del analito en la región de trabajo.

De acuerdo con la convención de la Guía Eurachem (Sección 6.2) y los criterios de la IUPAC, la estimación del Límite de Detección (LOD) y del Límite de Cuantificación (LOQ) de un método instrumental se fundamenta en la desviación estándar de las señales a bajos niveles de concentración. Al tabular los datos de áreas del cuadro I, se obtiene la siguiente función (ver Anexo 1):

$$f(x) = 3.07823 \cdot x \quad [11]$$

La desviación estándar de la relación de áreas de trabajo es de aproximadamente  $s_{\text{ratio}} = 0,0010$ ; con lo que se puede estimar el límite de detección y cuantificación del método. Se obtiene la desviación estándar de los ratios expresada en concentración  $s_c$ :

$$s_c = \frac{s_{ratio}}{b} \quad [12]$$

A partir de la ecuación 12 se obtiene un valor de  $s_c = 0,00032822$ . Al multiplicar este valor por determinados valores absolutos se puede establecer los respectivos límites de detección y cuantificación del método de determinación de carbendazina por HPLC:

$$LOD = 3s_c = 0,00098 \quad [13]$$

$$LOQ = 10s_c = 0,00328 \quad [14]$$

Para expresar estos límites en unidades de concentración de carbendazina inyectada en el equipo de HPLC, se multiplica el ratio obtenido por la concentración fija de carbaril (estándar interno) empleada en las soluciones de trabajo (500 mg/L, preparada disolviendo 250 mg de carbaril técnico en 500 mL de metanol):

$$LOD \text{ absoluto} = (0,00098) (500 \text{ mg/L})$$

$$= 0,49 \text{ mg/L}$$

$$LOQ \text{ absoluto} = (0,00328) (500 \text{ mg/L})$$

$$= 1,64 \text{ mg/L}$$

## ■ CONCLUSIONES

El método analítico alternativo por HPLC en fase reversa utilizando una columna C18 y detección UV a demostró ser una herramienta quimiométrica y analíticamente robusta para la determinación y control de calidad de carbendazina en formulaciones de suspensiones concentradas. El uso de carbaril como estándar interno probó ser altamente selectivo y eficaz para corregir y normalizar cualquier variación instrumental o de inyección en el sistema cromatográfico.

El método posee una excelente precisión en condiciones de repetibilidad, con una desviación típica de repetibilidad en masa

de solo EL 0,49% y un coeficiente de variación (RSD) de 0,9703% para la muestra comercial. Al situarse significativamente por debajo del límite sugerido del 2,0% para este tipo de formulaciones concentradas, el proceso de extracción rápida asistida con metanol se valida como un protocolo de preparación altamente reproducible y óptimo para análisis rutinarios en el laboratorio.

La veracidad del método analítico fue confirmada exhaustivamente mediante la prueba de Student de una muestra. La concentración promedio obtenida de carbendazina (50,50%) frente al valor nominal del fabricante no mostró diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%, lo que garantiza un método exacto y libre de sesgo o errores sistemáticos.

El método demostró una alta sensibilidad metrológica, con un Límite de Detección (LOD) de 0,49 mg/L y un Límite de Cuantificación (LOQ) de 1,64 mg/L de carbendazina inyectada. Esto define un intervalo de trabajo lineal y de aplicación seguro que se extiende desde el LOQ hasta concentraciones superiores a los 55 mg/L. En este rango, el método opera con una incertidumbre analítica insignificante, asegurando la emisión de resultados confiables y técnicamente válidos

El método descrito es simple, rápido y altamente sensible, permitiendo la identificación y cuantificación precisa de carbendazina en concentraciones bajas. La implementación de carbaril como estándar interno garantiza la estabilidad de los resultados frente a fluctuaciones en el flujo o volumen de inyección. Este protocolo es apto para su integración en los programas de control de calidad y estudios de

estabilidad de Formuquisa, cumpliendo con los requerimientos técnicos de validación analítica.

## ■ REFERENCIAS

Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th ed.; Pearson Education: Harlow, Essex, Reino Unido, 2010.

Morillas Bravo, P. P., Colabs. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*, 1ª ed.; Eurolab España: Madrid, España, 2016.

Mathur, R. P.; Sharma, S.; Bhushan, R. HPLC Determination of Carbendazim in Formulations. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11* (12), 2621–2628.

Hashim, M.; Al-Attar, A.; Abu Zeid, I. Toxicological Effects of Carbendazim: A Review. *Acta Sci. Med. Sci.* **2023**, *7* (7), 218–225. DOI: 10.31080/ASMS.2023.07.1528.

## ■ ANEXOS

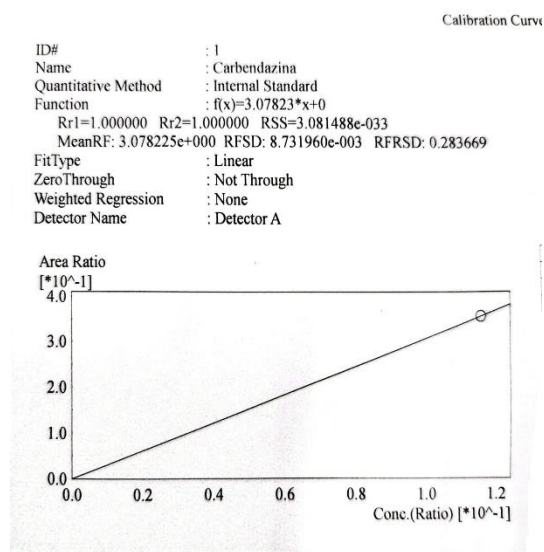


Figura 1. Curva de calibración obtenida a partir de las áreas obtenidas en el método.

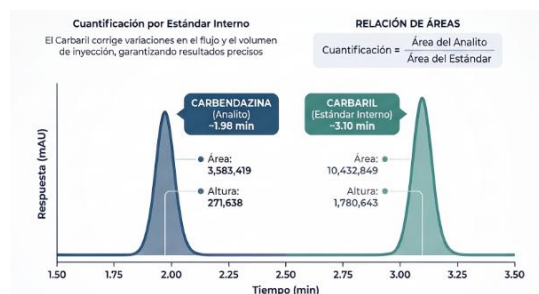


Figura 2. Esquema de señales obtenidas por los estándares inyectados en el equipo de HPLC.