

45
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

VALIDACION DE UN METODO COLORIMETRICO PARA
LA CUANTIFICACION DE MESTRANOL EN TABLETAS
COMO PRODUCTO TERMINADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
YIRA MARTHA ROSALES LOMBARDI

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
A. Validación	3
1. DEFINICION	3
2. ANTECEDENTES HISTORICOS	4
3. OBJETIVOS DE LA VALIDACION	6
a. Sistema de Control	6
b. Cumplimiento de normas	6
4. TIPOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	7
a. Retrospectiva	7
b. Prospectiva	8
5. TIPOS DE ENSAYOS A VALIDAR	9
a. Categoría I	9
b. Categoría II	9
c. Categoría III	10
6. PARAMETROS ANALITICOS	10
a. Precisión	10
b. Exactitud	11
c. Límite de detección	12
d. Límite de cuantificación	13
e. Especificidad	14
f. Rango	15
g. Linealidad	16
h. Reproducibilidad	17

7. DOCUMENTACION	17
B. MONOGRAFIA	20
1. DESCRIPCION	20
a. Nomenclatura	20
b. Fórmulas	20
c. Peso molecular	20
d. Composición elemental	20
e. Apariencia	20
2. PROPIEDADES FISICAS	21
a. Punto de fusión	21
b. Solubilidad	21
3. ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION	21
4. METODOS DE ANALISIS	21
a. Métodos volumétricos	21
b. Métodos de Espectrofotometría Ultravioleta	22
c. Métodos Colorimétricos	23
d. Métodos por Espectroscopia I R	24
e. Métodos Espectrofluorométricos	24
f. Métodos por Espectroscopia de Re- sonancia Magnética Nuclear (NMR)	25
g. Métodos Cromatográficos	26
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. OBJETIVOS	29
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO	30
V. METODOLOGIA	31
A. METODO GENERAL	31
1. MATERIAL	31

2. EQUIPO	31
3. REACTIVOS	32
4. METODO	32
a. Principio	32
b. Preparación del reactivo de color	32
c. Preparación de la solución estándar	33
d. Solución problema (Uniformidad de contenido)	33
e. Procedimiento	34
B. EVALUACION DEL SISTEMA	35
1. PRECISION	35
2. LINEALIDAD	35
C. EVALUACION DEL METODO ANALITICO	36
1. PRECISION Y EXACTITUD	36
2. LINEALIDAD	36
3. REPRODUCIBILIDAD	36
4. ESPECIFICIDAD	36
a. Placebo	36
b. Placebo cargado	36
c. Estándar de referencia	37
d. Blanco	37
e. Determinación	37
VI. RESULTADOS	38
A. PRECISION DEL SISTEMA	38
B. LINEALIDAD DEL SISTEMA	38
C. PRECISION DEL METODO ANALITICO	42
D. EXACTITUD DEL METODO ANALITICO	42

E. LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO	45
1. ORDENADA AL ORIGEN	45
2. PENDIENTE	45
F. REPRODUCIBILIDAD	49
G. ESPECIFICIDAD	51
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	52
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. SUGERENCIAS	55
X. ANEXOS	56
LISTA DE REFERENCIAS	62
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUCCION

El alto índice demográfico en los países subdesarrollados, como es el caso de México, ha originado que se tomen medidas para disminuir la tasa de natalidad. Estas medidas incluyen el uso de métodos anticonceptivos, los cuales se pueden clasificar en dos categorías:

Métodos físicos.

Métodos químicos

Entre los métodos químicos se incluyen los anticonceptivos de tipo oral, éstos consisten generalmente de combinados de estrógeno-progestágeno. Entre los estrógenos sintéticos utilizados usualmente están el etinilestradiol o su homólogo 3 - metoxi (mestranol).

Por otra parte, el control del proceso de manufactura, el control de calidad al producto terminado y las medidas de estabilidad de los principios activos, requieren de métodos de análisis exactos y sensitivos, con la finalidad de proporcionar al paciente la dosis adecuada para lograr el efecto terapéutico deseado.

La cantidad de estrógeno formulado requiera de métodos analíticos altamente selectivos y sensitivos.

En el presente trabajo se evaluó estadísticamente un método colorimétrico para la cuantificación de mestranol como pro-

ducto terminado, el cual tiene modificaciones con respecto al método de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

Dicho método presenta una reacción selectiva, que permite la cuantificación de mestranol en la formulación estudiada, y resulta ser exacto, preciso, lineal y reproducible; por lo cual permite su utilización en el laboratorio como método para determinar la uniformidad de contenido en el producto terminado.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. VALIDACION

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al desarrollo de técnicas analíticas más específicas y automatizadas, y al gran incremento de nuevos productos, que requieren métodos de análisis apropiados que aseguren su calidad.

En el aseguramiento de la calidad de un laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos constituyen los procesos que deben ser controlados para obtener resultados confiables.

1. DEFINICION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se determina si una metodología particular proporciona datos analíticos que son evaluados con respecto a sus requerimientos en condiciones específicas. El proceso de validación verifica que una metodología sea basada en principios científicos o técnicos adecuados para propósitos prácticos.

El proceso de proveer exactitud y confiabilidad de un método y la demostración de su aplicabilidad en condiciones de operación específicas implica el concepto de validación.

2. ANTECEDENTES HISTORICOS

La transferencia de tecnología de un laboratorio a otro es de gran utilidad; sin embargo, en la literatura existen ejemplos de estudios desde 1946, asociados con programas de prueba, que muestran variabilidad inter e intralaboratorios, utilizando análisis estadísticos de los datos.

Wernimont [1] trató de detectar y controlar las fuentes de variación en un método de prueba específico. Su investigación demostró el efecto de variables como son: tiempo, analista, equipo y reactivos en el resultado del ensayo.

Wernimont fue el primero en cubrir programas de ensayos interlaboratorios, empleando diseños balanceados y análisis de datos utilizando métodos estadísticos.

Posteriormente Youden [2] contribuyó significativamente a la literatura del diseño y análisis de experimentos para la validación de ensayos.

Kavanagh [3] presentó un excelente trabajo, marco de referencia para la industria farmacéutica, en The Greenbrier Procedure [4], que describe los objetivos de una validación creando programas de computación simples y sugiere experimentos para evaluar el efecto del tamaño de la muestra.

La importancia de la prueba de reproducibilidad es evidente en un sinnúmero de publicaciones que aparecieron en referencia al trabajo de Youden, describiendo el procedimiento estadístico específico que puede emplearse para evaluar la reproducibilidad.

Otras referencias adicionales importantes sobre el uso de análisis estadístico en la evaluación de un método de ensayo son:

Una publicación por la Chemical Division of the American Society for Quality Control, titulada "Técnicas de pruebas interlaboratorios" [5], el cual es una recopilación de publicaciones escritas por Wernimont, Youden y Mandel, que incluye descripciones del diseño y evaluación de experimentos para la validación de ensayos.

El segundo volumen publicado por la Division of Analytical Chemistry of the American Chemical Society titulado "Validación del proceso de medición" [6], incluye el papel de los materiales y métodos de referencia en el proceso de medición.

McGonigle y Kaminsky [7] sostienen que la validación de un ensayo comienza en el laboratorio de desarrollo analítico y para complementar el proceso es necesario llevar a cabo experimentos en donde será utilizado.

3. OBJETIVOS DE LA VALIDACION

Existen dos importantes razones científicas y económicas para la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica.

a. Sistema de Control. Es una parte integral del sistema de Control de Calidad. Como parte del sistema de Control de Calidad la validación de métodos analíticos es un punto clave en el ciclo de Control Universal. Este ciclo está constituido por los siguientes pasos:

- 1) Establecimiento de estándares.
- 2) Valoración de conformidad de los estándares.
- 3) Toma de acciones apropiadas cuando los estándares no son conocidos.
- 4) Planeación para mejorar resultados.

En el ciclo de Control de Calidad, que es un proceso evolutivo, la necesidad de validar un método analítico implica la verificación continua y completa del procedimiento durante el tiempo en el que está en uso.

Por otra parte, la responsabilidad de la industria de proporcionar productos con niveles de calidad consistentes dentro de especificaciones, requieren de un programa de validación de métodos analíticos.

b. Cumplimiento de Normas. A partir de 1971 en Estados

Unidos, en las Buenas Prácticas de Manufactura (cGMP's), se menciona aunque no explícitamente el término validación, estableciendo que los controles de laboratorio deben incluir el establecimiento de procedimientos de ensayo científicamente, los cuales deben tener exactitud y precisión.

En marzo de 1979 los c GMP's para productos farmacéuticos empiezan a ser efectivos e implican la necesidad de la validación de los métodos de ensayo. Se menciona que en cada método de análisis debe comprobarse su exactitud y confiabilidad mediante el uso de estándares y que la disponibilidad de los métodos de ensayo debe verificarse bajo las condiciones reales de uso, así como las variaciones recientes en la metodología deben estar sujetas al proceso de validación.

En México en el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 18 de febrero de 1988, se menciona que los procedimientos de prueba deben estar validados.

4. TIPOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

a. Retrospectiva. Cuando un proceso se lleva a cabo de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura se conoce en un promedio de veces la cantidad de ingrediente activo que es adicionado a cada lote. Considerando estos lotes como una serie de placebos gigantes enclavados en un valor conocido y los resultados promedios del ensayo sometidos bajo control estadístico se puede establecer la validación del ensayo. Este

procedimiento es similar a preparar lotes de placebos cargados en el laboratorio, solo que en gran escala.

Si este procedimiento no es posible de seguir, debido a diversas fuentes de variación en el proceso u otras razones, se puede usar otro alternativo.

Cuando una serie de muestras homogéneas, estables, de concentración conocida son sometidas rutinariamente en un laboratorio de Control de Calidad y los resultados reportados en un gráfico de control están consistentemente dentro de especificaciones, encerrándose en un valor promedio conocido al someterse a control estadístico pueden ser utilizados para demostrar que el método es válido.

b. Prospectiva. Cuando no es posible el uso de datos históricos para validar un ensayo se pueden emplear otras rutas para verificar un método de análisis en el laboratorio de Control de Calidad.

La valuación prospectiva consiste en evaluar estadísticamente los parámetros del método en una serie de muestras bajo condiciones específicas de trabajo.

En este tipo de validación se incluye la información antecedente del método, así como los datos empleados para soportar el ensayo inicial, los detalles de las dificultades del méto-

do, información de las técnicas disponibles pero no empleadas, el procedimiento de ensayo y los datos obtenidos durante la evaluación. Cuando se realizan en el producto cambios en la formulación o durante el proceso, es necesario llevar a cabo una validación.

Por otra parte, el avance tecnológico constante y la aparición de nuevos procedimientos de ensayo, lo cual a pesar de mejorar la precisión y exactitud del ensayo, requieren ser validados.

5. TIPOS DE ENSAYOS A VALIDAR

Dado a la variedad de ensayos que existen para la diversidad de productos, los distintos métodos de ensayo requieren de diferentes esquemas de validación. Los métodos analíticos pueden clasificarse en tres diferentes categorías:

a. Categoría I. Incluye métodos analíticos para la cuantificación de materia prima a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en formas farmacéuticas como producto terminado.

b. Categoría II. Abarca métodos de ensayo para la determinación de impurezas en productos a granel o compuestos de degradación en producto terminado.

En esta categoría los métodos de análisis pueden ser:

- 1) Ensayos cuantitativos
- 2) Pruebas de límite

c. Categoría III. Incluye métodos analíticos para la determinación de características de realización como disolución, liberación del fármaco.

En la tabla I se muestran datos elementales, los cuales normalmente requieren cada una de las categorías del ensayo.

6. PARAMETROS ANALITICOS

Las características de un método analítico son expresadas en término de parámetros analíticos.

a. Precisión.

1) Definición. La precisión de un conjunto de resultados analíticos obtenidos de las muestras es el grado de concordancia mutua entre los resultados individuales bajo circunstancias normales de operación.

La precisión es expresada como la desviación estándar de la prueba (SD) o bien, como la desviación estándar relativa (RSD).

2) Determinación. La precisión del método y del sistema debe ser determinada por el análisis de varias mues-

tras para el primer caso y la medida repetitiva de una simple muestra para el segundo.

b. Exactitud

1) Definición. Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia.

2) Determinación. La exactitud se puede determinar de dos maneras:

a) Método de adición de estándar de referencia. La mezcla de una cantidad conocida de estándar que ha sido adicionada es ensayada. La diferencia entre la muestra obtenida y la muestra original es la medida de la cantidad de estándar no recuperada por el ensayo.

b) Método de recobro de un placebo. El ingrediente activo puro es adicionado a una mezcla de excipientes del producto y la mezcla resultante es ensayada.

En ambos métodos el recobro es definido como la relación de estándar obtenido por el ensayo y la cantidad de estándar adicionado.

El método debe ser exacto, debe revelar entre límites aceptables la cantidad de fármaco que está presente en la forma farmacéutica.

La exactitud puede ser determinada a través de un rango que puede extenderse de un valor bajo esperado (80%) a un valor de 120% como nivel alto en el ensayo.

La exactitud puede ser expresada como porcentaje de recobro por un ensayo de cantidad conocida adicionada del fármaco.

c. Límite de detección.

1) Definición. Es la baja concentración de fármaco en una muestra; la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales fijadas.

El límite de detección es usualmente expresado como la concentración de fármaco en la muestra (porcentaje, partes por millón).

2) Determinación. La determinación del límite de detección de un método analítico puede variar sobre un procedimiento instrumental o no-instrumental.

a) Procedimientos instrumentales. Para procedimientos instrumentales diferentes técnicas pueden ser empleadas. La señal o ruido puede determinarse por comparación de los resultados del análisis de las muestras con concentración conocida de fármaco en las muestras blanco y establecer

el nivel mínimo al cuál el fármaco puede ser detectado confiablemente.

b) Procedimientos no-instrumentales. El límite de detección es generalmente determinado por análisis de muestras de concentración conocida de fármaco y estableciendo el nivel mínimo al cuál el principio activo puede ser detectado confiablemente.

d. Límite de cuantificación

1) Definición. Es un parámetro de cuantificación del ensayo para niveles bajos de compuestos mismos como impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en formas farmacéuticas. Esto es, a bajas concentraciones el principio activo en la muestra puede ser determinado con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es expresado como la concentración del principio activo en la muestra (porcentaje en partes por millón).

2) Determinación. Puede variar dependiendo del procedimiento.

a) Instrumental. Es la medida de la magnitud de la respuesta mínima analítica al analizar una serie de

muestras blanco y calcular la desviación estándar de esta respuesta.

El límite es subsecuentemente validado por el análisis de un número disponible de muestras conocidas por estar cerca o próximas al límite de cuantificación.

b) No-instrumental. Para métodos no-instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras de concentración conocida del fármaco y estableciendo el nivel mínimo al cual el fármaco puede ser detectado con aceptable precisión y exactitud.

e. Especificidad

1) Definición. La selectividad de un método analítico es la capacidad de medir exacta y específicamente el fármaco en presencia de compuestos que pueden estar presentes en la matriz de la muestra.

La selectividad puede ser expresada como el grado de sesgo de los resultados de prueba obtenidos por análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o excipientes cuando son comparados con los resultados de prueba para muestras sin substancias adicionadas.

La selectividad es una medida del grado de interferencia en

el análisis de una muestra de mezclas complejas.

Un método analítico para la cuantificación de un fármaco en una forma farmacéutica no debe presentar interferencia de los excipientes en la potencia del producto.

Los ensayos de fármacos a granel no deben tener interferencias atribuibles a productos de degradación conocidos, impurezas del proceso o precursores sintéticos.

Un método indicativo de estabilidad no debe mostrar interferencia por productos de degradación conocidos.

2) Determinación. La especificidad de un ensayo puede ser mostrada experimentalmente al establecer que compuestos similares (moléculas con mismo grupo funcional y aproximadamente mismo peso molecular) no interfieran con el procedimiento analítico para el compuesto en cuestión.

La selectividad de un método analítico es determinada por comparación de los resultados del ensayo de una muestra que contenga impurezas, productos de degradación o excipientes con los obtenidos del análisis de muestras sin impurezas u otros compuestos.

f. Rango

1) Definición. Es el intervalo entre los niveles

altos y bajos del fármaco a los cuales se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal.

El rango generalmente es expresado en las mismas unidades de resultado del análisis.

g. Linealidad

1) Definición. Es la capacidad de evaluar resultados de prueba; ya sea directamente, o por una transformación matemática bien definida si son proporcionales a la concentración de fármaco en muestras dentro de un rango dado.

La linealidad es la variación en la cantidad de fármaco recuperada por el ensayo como una función de la cantidad de fármaco adicionada.

Alguna desviación de la linealidad indica que el método no trabaja apropiadamente, en este caso debe modificarse o reválidarse el método en cuestión, o bien cambiarlo por otro.

La linealidad es usualmente expresada en término de la variación alrededor de la pendiente de la regresión lineal calculada de acuerdo a la relación matemática establecida de los resultados de prueba por análisis de muestras con concentraciones variadas del principio activo.

2) Determinación. Para un método de rutina, debe di

señarse de manera que permita una evaluación estadística con un nivel de confianza de 95%. La linealidad del método debe demostrarse sobre un rango de concentraciones en un espacio de 50 a 150% de la concentración esperada.

h. Reproducibilidad

1) Definición. La reproducibilidad es definida como la variación del ensayo entre diferentes laboratorios. Esta diferencia es un factor importante para la industria farmacéutica.

Un método reproducible es uno que ha sido realizado bajo diferentes condiciones como: equipo, analista, día, etc.

La Organización Internacional de Estandarización (1966) define la reproducibilidad como un acuerdo cerrado entre resultados individuales obtenidos con un mismo método y/o material de prueba, pero bajo diferentes condiciones (diferente analista, aparato, laboratorio, y/o diferente tiempo); y define la repetibilidad como el acuerdo cerrado entre algunos resultados obtenidos con el mismo método y/o material de prueba y bajo las mismas condiciones (mismo operador, aparato, laboratorio y tiempo).

7. DOCUMENTACION

Un formato adecuado para reportar un método analítico debe in

cluir un resumen de los experimentos realizados para la validación, con tablas que muestren los resultados y las pruebas estadísticas con una copia del método evaluado. Datos originales evaluados como gráficas o espectros deben incluirse para ilustrar los puntos que se están reportando.

El siguiente formato puede ser adecuado para la documentación de la validación del método analítico:

- a. Introducción
- b. Resumen
- c. Resultados y discusión
- d. Conclusión
- e. Tablas
- f. Gráficas, espectros, etc.
- g. Métodos
- h. Referencias bibliográficas

Si la descripción del método no es adecuada, la validez del método no puede ser establecida.

Tabla I. Datos elementales que requiere un estudio de validación.

Parámetro	CATEGORIAS			III
	I	II	III	
Analítico	Quantitativo	Prueba de limite		
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	*	*
Limite de detección	No	No	Si	*
Limite de cuantificación	No	Si	No	*
Selectividad	Si	Si	Si	*
Rango	Si	Si	*	*
Linealidad	Si	Si	No	*
Reproducibilidad	Si	Si	Si	Si

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba.

B. MONOGRAFIA

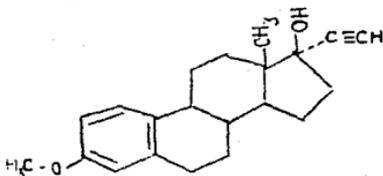
1. DESCRIPCION

a. Nomenclatura

- 1) Nombre químico. 3-metil Etiniloestradiol eter.
- 2) Nombre genérico. Maestranol

b. Formulas

- 1) Empírica. $C_{26}H_{42}O_2$
- 2) Estructural.



c. Peso molecular. 310.42 g/mol

d. Composicion elemental. C 81.25%, H 8.44%, O 10.31%.

e. Apariencia. Polvo cristalino blanco.

2. PROPIEDADES FISICAS

a. Punto de fusión, 146°C - 154°C con un rango de 4°C.

b. Solubilidad. Insoluble en agua, soluble 1 en 44 de etanol, 1 en 23 de éter, 1 en 4.5 de cloroformo, 1 en 12 de dioxano, 1 en 23 de acetona, ligeramente soluble en metanol.

3. ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION

El mestranol es un estrógeno sintético, el cuál es más potente que el estradiol. Se absorbe por el tracto gastrointestinal, es lentamente metabolizado y excretado en orina y heces.

4. METODOS DE ANALISIS

a. Métodos Volumétricos.

1) La Farmacopea Británica [8] recomienda un método volumétrico en el cuál el fármaco en tetrahydrofurano es tratado con nitrato de plata y posteriormente titulado con solución estandarizada de hidróxido de sodio. El punto final se determina potenciométricamente.

2) Una determinación argentométrica para algunos fármacos esteroidales acetilados, incluyendo al mestranol, ha sido desarrollado por Roushdi et al [9]. El método de ensayo depende de la precipitación de la sal de plata del esteroide

de una solución alcohólica amoniaca de nitrato de plata seguido por extracción con un solvente orgánico adecuado, evaporación del solvente y finalmente aplicación del método de Volhard.

b. Metodos de Espectrofotometría Ultravioleta

1) Gorog y Csizer [10] describieron métodos para la determinación de mestranol como impureza en tabletas de noretinodreal y noretisterona y en tabletas anticonceptivas de mestranol. Para el primer caso la muestra es disuelta en metanol y tratada con borohidruro. La solución de mestranol es tratada similarmente. Las extinciones de las dos soluciones son medidas a 287, 290.5 y 294 nm, y el contenido de mestranol es calculado por una ecuación dada. Para el segundo caso el polvo de las tabletas es calentado bajo reflujo con diclorometano, despues de filtración y evaporación del solvente, el mestranol es determinado como el primer caso.

2) Shroff y Grodsky [11] describieron un método de espectroscopía ultravioleta para la estimación de mestranol en tabletas frescas. En este método la muestra es agitada con agua y metilciclohexano, centrifugada y la extinción de la fa se superior medida a 287.7 nm. La corrección de la línea base fue aplicada. El método no es aplicado para tabletas almacenadas por la interferencia que puede producir el complejo formado entre polivinilpirrolidona y estearato de magnesio empleados como excipientes.

c. Métodos colorimétricos

1) Huettenrauch [12] utilizó cloruro de o-toluidina para la detección selectiva de esteroides con anillo A aromático y grupos C₁₃ - OH fueron liberados, esterificados o la ruptura de éteres. El mestranol da reacción positiva con una sensibilidad de 1-2 µg/ml.

2) Shroff y Huettermann [13] desarrollaron un método colorimétrico para el ensayo de mestranol en tabletas. El método se basa en la formación de un complejo con reactivo de fenol/ácido sulfúrico. Este complejo exhibe y absorbe a un máximo de 550 nm, obedece la ley de Beer y es estable por un lapso razonable. De acuerdo al método las tabletas son humedecidas con agua y agitadas con metilciclohexano. Una alícuota de la fase orgánica es evaporada en una atmósfera de nitrógeno y tratada con reactivo de fenol ácido sulfúrico y la extinción medida a 550 nm contra un blanco del reactivo. La presencia de excipientes no causa interferencia.

3) Un método colorimétrico directo para el ensayo de mestranol en tabletas, es reportado por Comer et al. [14]. Este método consiste en disolver una tableta en ácido sulfúrico/metanol (7:3) y la extinción medida a 545 nm contra un blanco del reactivo. Para evitar interferencia por clormadina la temperatura debe mantenerse por abajo de 5°C durante la reacción de color.

4) Beyer [15] desarrolló un método colorimétrico automatizado para la cuantificación de mestranol en tabletas, en el cuál las tabletas son suspendidas en agua y extraídas con cloroformo-etanol. En un sistema automático la re-extracción es efectuada con una solución de etanol en ácido sulfúrico al 10%. La extinción es medida a 538 nm.

5) Rizk et al [16] determinó colorimétricamente mestranol por medio de iones de plata. Una solución etanólica es tratada con amoníaco y un exceso de nitrato de plata acuoso, el compuesto de plata precipitado es filtrado. Los iones de plata en exceso son determinados espectrofotométricamente con ditizona, y la cantidad de esteroide se calcula a partir de los iones de plata consumidos.

d. Métodos por Espectroscopía Infrarrojo.

1) Beyermann y Roder [17] emplearon un método por espectroscopía infrarrojo para analizar mestranol en tabletas anticonceptivas, después de separar los componentes por cromatografía en capa fina. La separación se lleva a cabo sobre sílica gel con acetato de etilo como eluyente. La mancha se extrae con cloroformo y el espectro de infrarrojo en parafina líquida se registra y el mestranol determinado de su extinción a 7.95 μ m.

e. Métodos Espectrofluorométricos.

1) Un procedimiento espectrofluorométrico para la determinación de mestranol en algunas tabletas anticonceptivas orales se ha desarrollado. se utiliza la fluorescencia natural del mestranol. El método presenta ventajas como son rapidez, confiabilidad y sensibilidad. No requiere separaciones y es aplicable en presencia de noretinodrel, etinodiol y norgestisterona, aunque interfiere con acetato de clormadinona. Se aplica a análisis de tabletas simples.

De acuerdo al procedimiento la tableta es pulverizada, se agita con etanol anhidro y es centrifugada. Una alícuota del sobrenadante se diluye con etanol y la fluorescencia a 327 nm se compara con la de la solución estándar. El etanol anhidro se emplea como una solución de referencia y se aplica una corrección para su fluorescencia.

2) Templeton et al [18] describieron un método de ensayo para mestranol en tabletas, en el cuál ésta es desintegrada en una solución de hidróxido de sodio al 20% y agua, se extrae con cloroformo y una alícuota del extracto se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en una solución de metanol al 50% en ácido sulfúrico concentrado y la fluorescencia es medida a 498 nm con excitación a 468 nm.

f. Métodos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR).

1) Avdvich et al [19] emplearon una técnica NMR para la cuantificación de mestranol como fármaco a granel. El a

cido difenilacético fue empleado como estándar interno y piridina como el solvente. La cantidad de mestranol es calculada al integrar los picos a 6.33 ppm (protones de metoxilos) y a 6.80 ppm (protones de etínilos dados por la piridina).

5. Métodos Cromatográficos.

1) Cromatografía en capa fina. Existen varios métodos por cromatografía en capa fina para la separación y análisis de mestranol en mezclas y tabletas anticonceptivas. Para la cuantificación la placa es primero raspada y el mestranol eluido antes del tratamiento con el reactivo disponible.

2) Cromatografía en columna. Existen varios métodos para la cuantificación de mestranol por medio de cromatografía en columna.

a) Brunner y Kunze [27] publicaron un método analítico para mestranol en combinación con noretinadrona o noretinodrel por Cromatografía de partición y medición en UV. De acuerdo a este procedimiento, tabletas anticonceptivas orales son extraídas con dimetilformamida-formamida (1:1) y los esteroides separados por Cromatografía de partición con el uso de este solvente como fase estacionaria en celita y como fase móvil heptano. El mestranol, en fracción relevante, es determinado midiendo la extinción a 287 nm con una línea base corregida de la extinción a 302 y 315 nm. Se encuentra interferencia con diacetato de etinidol y acetato de clormadinona.

3) Cromatografía de líquidos. Hara y Hayashi [21] estudiaron la correlación de la conducta de retención de productos farmacéuticos esteroidales, en Cromatografía de líquidos con fase polar y fase-reversa. Para la sistematización de la correlación entre las estructuras químicas de los solutos y la conducta de retención en Cromatografía de líquidos, el volumen de retención de los esteroides modificados en sílica y químicamente en columnas fase-reversa, fueron estudiadas utilizando varios sistemas binarios de solventes.

4) Cromatografía de gases.

a) Una comparación de ensayos por Espectroscopia UV y Cromatografía de gases fue realizada [11] para nestranol en tabletas. Ambos métodos proporcionan buenos resultados y son disponibles para tabletas frescas. En el método por Cromatografía de gases, la columna utilizada es de acero inoxidable manteniendo la temperatura a 195°C. Nitrógeno es empleado como gas acarreador a 70-75 ml/hr. El método es preferido para el ensayo de tabletas almacenadas, ya que durante este período se forma el complejo entre polivinilpirrolidona y el estearato de magnesio, el cual produce interferencia con métodos UV y fue identificado por Cromatografía de gases.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gran incremento de nuevos productos farmacéuticos, requieren de métodos de análisis que aseguren su calidad y efectividad y el desarrollo de nuevas técnicas analíticas debe proporcionar metodologías que aporten resultados confiables.

Las determinaciones analíticas de productos como anticonceptivos de tipo oral, han sido de gran interés para la Industria Farmacéutica, ya que se requiere que sean exactas, de alta sensibilidad y selectividad debido a que las dosis terapéuticas están en un rango de microgramos.

El presente trabajo pretende evaluar estadísticamente el método analítico empleado para la cuantificación de mestranol como producto terminado con el fin de proporcionar al paciente un producto de calidad consistente a la dosis terapéutica.

III. OBJETIVOS

1. Validar un método colorimétrico para la cuantificación de mestranol en tabletas como producto terminado.
2. Determinar la precisión y la linealidad del sistema.
3. Determinar la exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad y especificidad del método analítico.
4. Evaluar estadísticamente los resultados obtenidos.

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO

El método analítico cumple los requisitos para lo cuál fue diseñado como son exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad y especificidad, dado a la selectividad de la reacción colorimétrica desarrollada.

La reacción colorimétrica en la que se basa el método analítico es selectiva para estrógenos que forman grupos cromóforos que permiten su cuantificación.

V. METODOLOGIA

A. Método General

1. MATERIAL

Matraz volumétrico	200 ml	Marca Pyrex
Matraz volumétrico	100 ml	Marca Pyrex
Matraz volumétrico	50 ml	Marca Pyrex
Matraz volumétrico	25 ml	Marca Pyrex
Matraz volumétrico	10 ml	Marca Pyrex
Matraz Erlenmeyer	50 ml	Marca Kimax
Pipeta volumétrica	20 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	10 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	5 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	4 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	3 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	2 ml	Marca Pyrex
Pipeta volumétrica	1 ml	Marca Pyrex
Pipeta graduada	1 ml	Marca Pyrex
Probeta graduada	50 ml	Marca Pyrex
Pipetas pasteur		
Termómetro	-10 - 150 C	
Barras magnéticas		
Vasos de precipitados	100 ml	Marca Kimax

2. EQUIPO

Espectrofotómetro

Bechmann

Baño maría

Parrilla de agitación

3. REACTIVOS

Cloroformo R.A	Baker
Acido sulfúrico R.A	Merck
Metanol absoluto R.A	Baker
Sulfato de sodio anhidro R.A	Baker
Hidróxido de sodio R.A	Baker
Mestranol estándar	Aldrich
Mestranol materia prima	Syntex
Placebo	
Placebos cargados	

4. METODO

a. Principio. La técnica se basa en la reacción colorimétrica del mestranol con el ácido sulfúrico en metanol.

Se sugiere que la reacción cromogénica, envuelve los grupos de la posición 17 de etinilestradiol y sus éteres. La explicación de la aparente selectividad de las reacciones de estrógenos con ácido sulfúrico-metanol espera la caracterización de estos cromóforos [22].

b. Preparación del reactivo de color. Transferir 30 ml de metanol absoluto a un matraz volumétrico de 100 ml, previamente colocado en un baño de hielo con agitación constante. Adicionar cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado hasta apro-

ximadamente 95 ml.

Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente, aforar con ácido sulfúrico.

El reactivo permanece estable al menos durante 7 días [22].

c. Preparación de la solución estándar de referencia. Colocar 80 mg de mestranol estándar de referencia, exactamente pesados en un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar al volumen con cloroformo.

Transferir 5 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al volumen con cloroformo.

Tomar nuevamente 5 ml de esta última dilución y colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con cloroformo.

[Concentración final 8 $\mu\text{g/ml}$]

d. Solución problema (Uniformidad de contenido). Pesar exactamente una tableta y colocarla en un matraz volumétrico de 50 ml.

Adicionar 2 ml de agua destilada y 0.2 ml de hidróxido de sodio al 20% (P/V). Agitar mecánicamente durante 5 minutos hasta que la tableta se desintegre.

Adicionar 25 ml de cloroformo y agitar mecánicamente durante 60 minutos.

Agregar suficiente cloroformo, hasta pasar la fase acuosa al cuello del matraz. Descartar la fase acuosa con una pipeta pasteur.

Secar la fase orgánica en sulfato de sodio anhidro, previamente saturado de cloroformo.

Transferir la fase clorofórmica a un matraz de 100 ml y llevar al volumen con cloroformo.

[Concentración final 0.8 µg/ml]

e. Procedimiento. Transferir 20 ml de la solución problema a un matraz erlenmeyer de 50 ml.

Colocar 2 ml de la solución estándar a un matraz erlenmeyer de 50 ml.

Evaporar a sequedad con ayuda de un baño de agua a 80°C (evitar tener pérdidas durante la evaporación).

Adicionar a cada matraz 0.3 ml de metanol absoluto, para disolver el residuo completamente.

Con rotación constante de los matraces, adicionar 10 ml del reactivo de color a cada matraz, mantener la temperatura a

25 °C como máximo en un baño de agua.

Determinar la absorbancia de cada una de las muestras a los 6 minutos de la adición del reactivo de color, a una longitud de onda de 545 nm.

Ajustar el aparato previamente utilizando como blanco el reactivo de color.

B. Evaluación del sistema

1. PRECISION

De una solución estándar de referencia correspondiente al 100%, tomar 10 alícuotas de 2 ml cada una.

Analizar cada una de las muestras según el procedimiento.

2. LINEALIDAD

Construir una curva de calibración (absorbancia versus concentración) con una misma solución patrón empleando 5 diluciones (nivel 80, 90, 100, 110, 120%) de la concentración central.

Analizar cada dilución por triplicado.

C. Evaluación del método analítico

1. PRECISION Y EXACTITUD

Analizar 10 placebos cargados con el 100% de la dosis terapéutica bajo las mismas condiciones, de acuerdo a como se describe para la solución problema.

2. LINEALIDAD

Analizar 5 placebos cargados de cada uno de los niveles 80, 100 y 120% de la concentración central, de acuerdo al procedimiento para uniformidad de contenido.

3. REPRODUCIBILIDAD

Determinar el efecto analista-día. Analizar tres placebos cargados al 100% por analista y por día, de acuerdo al procedimiento descrito.

4. ESPECIFICIDAD

a. Placebo. Pesar 100 mg de placebo equivalente al peso de una tableta y colocarlo en un matraz volumétrico de 50 ml, y tratarlo de la misma manera que la solución problema.

b. Placebo cargado. Analizar el equivalente al peso de una tableta de acuerdo al tratamiento para la solución problema.

c. Estándar de referencia. Preparar una solución estándar de acuerdo al procedimiento.

d. Blanco. Colocar en un matraz erlenmeyer de 50 ml 0.3 ml de metanol absoluto y 10 ml de la solución reactivo.

e. Determinación. Efectuar un barrido de absorción en la región de luz visible para cada una de las muestras preparadas bajo las mismas condiciones, previamente calibrado el equipo.

VI. RESULTADOS

A. Precisión del sistema

La tabla I muestra los resultados obtenidos al evaluar la respuesta del equipo con varias muestras de una misma solución patrón.

La respuesta del equipo fue evaluada mediante el coeficiente de variación (fórmula de cálculo anexo I) el cual fue de 0.8054% siendo el máximo permitido 1.5%, con lo cual se considera que el sistema es preciso.

B. Linealidad del sistema

Al evaluar la linealidad del sistema se emplearon 5 niveles de concentración (80, 90, 100, 110, 120%), los cuales dieron por resultado los datos reportados en la tabla II.

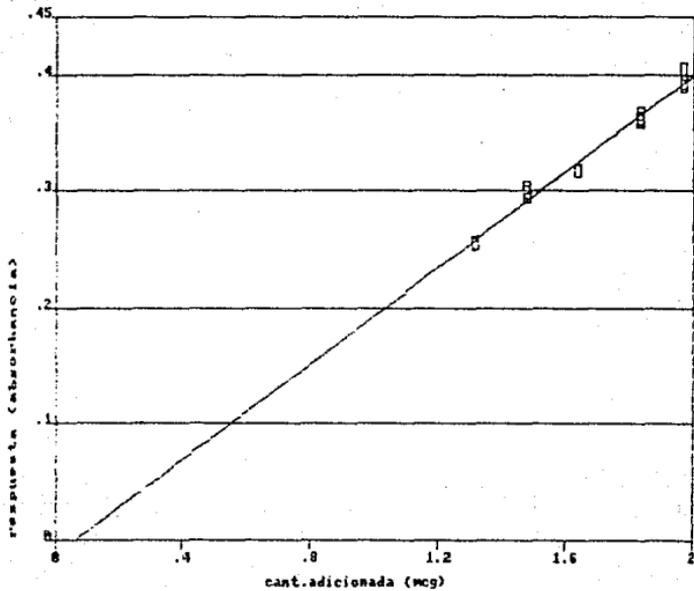
Con los datos reportados se evaluó el coeficiente de correlación (fórmula de cálculo anexo I), mediante el cual se observa el grado de asociación entre las dos variables (cant. adicionada y respuesta del equipo). El coeficiente de correlación encontrado fue de 0.9916, el cual indica una asociación directa entre las dos variables antes mencionadas, como se muestra en la gráfica 1.

Tabla I. Respuesta obtenida al evaluar la precisión del sistema.

Muestra	Respuesta del equipo Absorbancia
1	0.325
2	0.325
3	0.327
4	0.323
5	0.330
6	0.320
7	0.325
8	0.325
9	0.323
10	0.325

Tabla II. Datos obtenidos al evaluar la linealidad del sistema.

Cant. adicionada $\mu\text{cg/ml}$	Respuesta Absorbancia
1.310	0.254
1.310	0.256
1.310	0.256
1.474	0.299
1.474	0.295
1.474	0.303
1.638	0.317
1.638	0.317
1.638	0.318
1.834	0.360
1.834	0.363
1.834	0.366
1.965	0.393
1.965	0.390
1.965	0.405



Grafica 1. Evaluación de la linealidad del sistema.

C. Precisión del método analítico

Al evaluar la precisión del método analítico se relaciona la cantidad adicionada con la cantidad recuperada después del ensayo, tal como se muestra en la tabla III.

Para la evaluación estadística se plantea la siguiente hipótesis:

$$H_0: \sigma \leq 3\%$$

$$H_1: \sigma > 3\%$$

Utilizando como estadígrafo de contraste χ^2 cuadrada (fórmula de cálculo anexo II), con un nivel de significancia de 0.05 y con 19 grados de libertad, se obtiene que:

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 2.840$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} = 30.144$$

Dado que $\chi^2_{\text{calc.}}$ es menor que $\chi^2_{\text{tab.}}$, se considera que el método analítico es preciso con un rango de variación de 0.921 a 1.589 de la desviación estándar promedio.

D. Exactitud del método analítico

La exactitud del método analítico se evaluó utilizando los mismos datos reportados en la tabla III.

Para evaluar estadísticamente la exactitud se planteó la siguiente hipótesis:

$$H_0 : \mu = 100\%$$

$$H_1 : \mu \neq 100\%$$

Empleando como estadígrafo de contraste la prueba de " t " de student (fórmula de cálculo anexo III), un nivel de significancia de 0.05 y con 19 grados de libertad se obtuvo que:

$$t_{calc.} = 7.722 \times 10^{-3}$$

$$t_{tab.} = 1.7291$$

Como $t_{calc.}$ es menor que $t_{tab.}$ se considera el método exacto con límite de confianza del 99.55 al 100.499.

Tabla III. Resultados del % de recobro al evaluar la precisión y exactitud del método analítico.

Cant. adicionada μcg	Cant. recuperada μcg	% de recobro
82.80	83.99	101.438
82.96	82.74	99.740
81.36	80.74	99.243
81.44	81.24	99.765
82.40	83.24	101.023
82.80	84.23	101.739
80.80	80.99	100.247
80.40	80.49	100.121
81.92	81.74	99.789
82.80	83.98	101.434
82.80	81.50	98.433
82.80	81.25	98.133
82.96	84.39	101.734
82.80	82.74	99.934
81.20	79.76	98.231
81.84	80.75	98.677
80.64	80.26	99.529
80.40	79.75	99.203
81.84	82.08	100.295

E. Linealidad del método analítico

Los datos reportados en la tabla IV fueron obtenidos para la evaluación de la linealidad del método analítico, para lo cual se emplearon 3 niveles de concentración cada uno por quintuplicado.

1. ORDENADA AL ORIGEN

El método analítico muestra una ordenada al origen de 0.1819 (fórmula de cálculo anexo IV).

Al realizar su cálculo inferencial se planteó la siguiente hipótesis:

$$H_0 : A_0 = 0$$

$$H_1 : A \neq 0$$

Utilizando la prueba de "t" de student con un nivel de significancia de 0.05 y 14 grados de libertad se obtiene que:

$$t_{calc.} = 0.0888$$

$$t_{tab.} = 2.1604$$

Como $t_{calc.}$ es menor que $t_{tab.}$ se considera que el método tiene una ordenada al origen igual a cero.

2. PENDIENTE

La pendiente del método obtenida fue de 0.9981, la cual se evaluó a partir del planteamiento de la siguiente hipótesis:

$$H_0 : B = 1$$

$$H_1 : B \neq 1$$

La prueba de "t" de student con un nivel de significancia de 0.05 y 14 grados de libertad proporcionó como resultado:

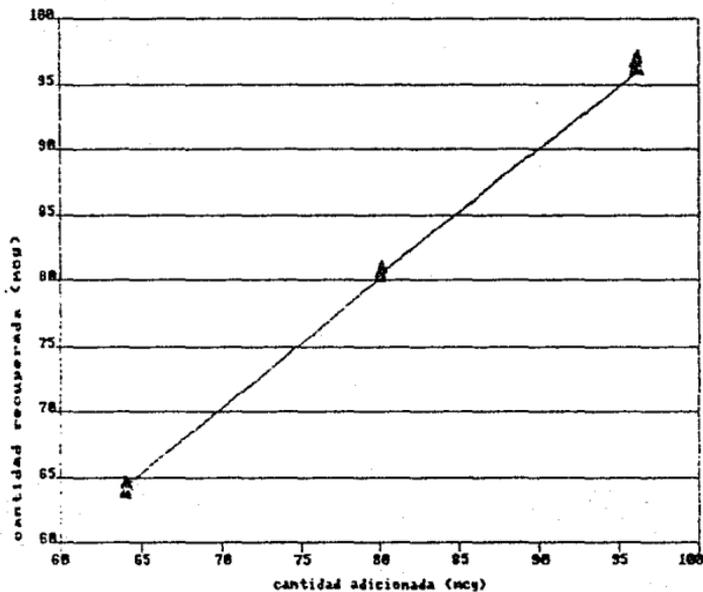
$$t_{calc.} = 0.0752$$

$$t_{tab.} = 2.1604$$

Como se puede observar t_{calc} es menor que t_{tab} . por lo cuál se considera que el método posee una pendiente igual a uno, como se observa en la gráfica 2.

Tabla IV. Datos obtenidos al evaluar la linealidad del método analítico.

Nivel	Cant. adicionada	Cant. recuperada
	μg	μg
80	64.064	63.634
	64.192	64.257
	64.064	63.885
	64.000	63.697
	64.064	64.386
	80.080	80.169
100	80.000	80.500
	80.000	80.500
	80.200	80.799
	80.080	80.419
120	96.288	96.011
	96.000	96.547
	96.000	96.048
	96.096	96.203
	96.144	96.904



Grafica 2. Representacion de la linealidad del método analítico

CO

F. Reproducibilidad del método analítico

La evaluación de la reproducibilidad del método analítico se realizó con dos analistas en dos días diferentes, proporcionando como resultado los datos que se muestran en la tabla V.

Tabla V. Resultado del % de recobro por dos analistas en dos días diferentes.

	Día 1	Día 2
	100.687	100.405
Analista 1	101.102	101.038
	100.270	100.753
	99.200	100.307
Analista 2	100.299	99.723
	99.763	100.744

El análisis de varianza (fórmulas de cálculo anexo V) permite establecer si existe o no efecto en los resultados del análisis, debido a las variables analista y día.

En la tabla V se muestra el resultado del análisis de varianza obtenida a partir de los datos proporcionados anteriormente.

Tabla VI Tabla de ANADEVA

Fte. de error	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Fcalc.	Ftab.
Analista	1	1.49	1.49	9.93	161.4
dia	1	0.23	0.23	1.53	161.4
analista/dia	1	0.15	0.15	0.71	5.3
error exp.	8	1.67	0.20	-	-

Empleando el estadígrafo de contraste F para evaluar si existe o no efecto por analista, se obtuvo:

$$F_{calc} = 9.93$$

$$F_{tab} = 161.4$$

Por lo tanto, F_{calc} es menor que F_{tab} , lo cual indica que no existe efecto por analista.

Para evaluar si existe efecto o no por la variable dia, se obtuvo:

$$F_{calc} = 1.53$$

$$F_{tab} = 161.4$$

Dado que F_{calc} es menor que F_{tab} , no existe efecto por esta

variable.

Finalmente al evaluar la interacción de dos variables (analista-día) se obtuvo:

$$F_{calc.} = 0.71$$

$$F_{tab.} = 5.32$$

Por lo tanto, no existe efecto en los resultados por la interacción analista-día.

G. Especificidad

El método analítico muestra especificidad frente a excipientes bajo las mismas condiciones de operación para cada una de las muestras, tal como se muestra en el gráfico del espectro de absorción (Anexo VI).

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

Al realizar el estudio de validación del método analítico para la cuantificación de mestranol, se evaluaron los parámetros elementales para un análisis de rutina, como son: la exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad y especificidad.

Al evaluar el sistema como se muestra en los resultados (tabla I y II, gráfica 1), se encontró que el sistema es preciso así como también existe una relación lineal entre la cantidad adicionada del estándar y la respuesta del equipo (absorbancia) ya que tiene un coeficiente de correlación de 0.99.

El método presenta exactitud y precisión, por lo que puede ser empleado para uniformidad de contenido durante el análisis de rutina del laboratorio.

La linealidad presentada por el método, muestra una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada en el ensayo, lo cual indica la proporcionalidad existente en el rango de concentración analizado (tabla IV).

El método es reproducible y no presenta efecto en los resultados debido al analista o al día en el que se realiza la prueba, ni por la interacción día-analista, lo cual indica que el

método puede ser empleado en cualquier día y por cualquier analista sin encontrar efecto en los resultados del análisis.

VIII. CONCLUSIONES

1. La reacción colorimétrica desarrollada es selectiva para el mestranol que forma grupos cromóforos.
2. El método analítico propuesto es específico para la formulación de las tabletas, ya que no muestra interferencia por los excipientes de la misma.
3. El sistema, relación de la respuesta del equipo y la concentración de la muestra, es preciso y lineal.
4. El método analítico propuesto es preciso, exacto, lineal y reproducible, bajo las condiciones de trabajo establecidas.
5. El método es válido para realizar la prueba de uniformidad de contenido durante análisis de rutina.

IX. SUGERENCIAS

1. Desarrollar una técnica analítica alternativa para la cuantificación de mestranol, que proporcione datos confiables sea económica y disminuya tiempo de análisis, como sería una técnica por HPLC.
2. Realizar un estudio de especificidad para la misma formulación frente a productos de degradación para utilizar el método en estudios de estabilidad y para la detección de impurezas de la materia prima que pudiesen ocasionar interferencia durante el ensayo.

X. ANEXOSAnexo I

Coeficiente de variación (CV)

$$CV = s/\bar{x} \times 100$$

donde:

s = desviación estándar de la muestra

x = media de la muestra

Criterio de aceptación

CV no mayor a 1.5%

Coeficiente de correlación (r)

$$r_z = \bar{E}xy - 1/n (\bar{E}x \bar{E}yz) / \left[\bar{E}x^2 - 1/n (\bar{E}x)^2 \right] \left[\bar{E}y^2 - 1/n (\bar{E}y)^2 \right]$$

donde:

x = media muestral de las concentraciones

y = media muestral de las respuestas

s_x = desviación estándar de las concentracioness_y = desviación estándar de las respuestas

n = número de muestras

Criterio de aceptación

r_z = 0.98

$$r = 0.99$$

Anexo II

Fórmula de cálculo para precisión

$$X_{iz} \text{ calc.} = (n - 1)S^2 / \alpha$$

Criterio de aceptación

$X_{iz} \text{ calc.}$ debe ser menor que $X_{iz} \text{ tablas.}$

Intervalo de confianza

$$\sqrt{(n - 1)S^2 / X_{iz} 1 - \alpha/2}} < \sigma < \sqrt{(n - 1)S^2 / X_{iz} \alpha/2}}$$

Anexo III

Fórmula de cálculo para exactitud

$$t_{\text{calc.}} = \bar{X}_n - \mu / S \sqrt{n}$$

Criterio de aceptación

$t_{\text{calc.}}$ debe ser menor que $t_{\text{tablas.}}$

Intervalo de confianza

$$\bar{X} \pm t_{1 - \alpha/2} \times S / \sqrt{n}$$

Anexo IV

Cálculo de la ordenada al origen

$$A = \frac{\sum Y \sum X^2 - \sum X \sum XY}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Cálculo de la pendiente

$$B = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Cálculo del error típico de estimación modificado

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{n - 2}}$$

Evaluación de la ordenada al origen

Hipótesis planteada

$$H_0 : A = 0$$

$$H_1 : A \neq 0$$

Estadígrafo de contraste : t de student

Fórmula de cálculo

$$t_{calc.} = \frac{A - A_0}{S_{x/y}} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n} - (\bar{x})^2}$$

Criterio de aceptación

t_{calc.} debe ser menor que t_{tablas.}

Evaluación de la pendiente

Hipótesis planteada

$$H_0 : B = 1$$

$$H_1 : B \neq 1$$

Estadígrafo de contraste: t de student

Fórmula de cálculo

$$t_{calc.} = (B - B_0) s_x \sqrt{n - 1} / s_{y/x}$$

Criterio de aceptación

tabla debe ser mayor a $t_{calc.}$

Anexo V

Tabla de ANADEVIA

Suma de cuadrados

Analista

$$\Sigma y_{12}/bc - \Sigma Yz/abc =$$

Día

$$\Sigma y_{12}/ac - \Sigma Yz/abc =$$

Analista - día

$$\Sigma \Sigma y_{12}jkz - \Sigma y_{12}/c =$$

ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO DEBE
BIBLIOTECA

Media cuadrática

Analista

$$M C \text{ analista} = S C \text{ analista} / (a - 1)$$

Día

$$M C \text{ día} = S C \text{ día} / (b - 1)$$

Analista - día

$$M C \text{ anal. - día} = S C \text{ anal. - día} / (a - 1) (b - 1)$$

Error

$$M C \text{ error} = S C \text{ error} / ab (c - 1)$$

F calc. para factores aleatorios

Analista

$$F_{\text{calc.}} = M C \text{ anal.} / M C \text{ anal. - día}$$

Día

$$F_{\text{calc.}} = M C \text{ día} / M C \text{ anal. - día}$$

Analista - día

$$F_{\text{calc.}} = M C \text{ anal. - día} / M C \text{ error}$$

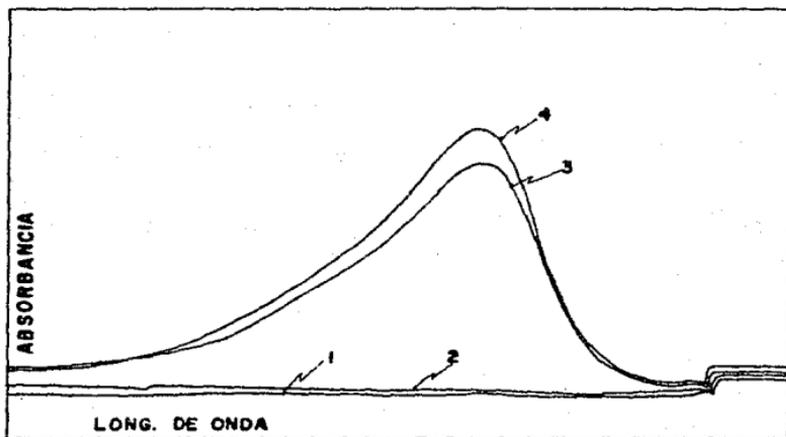
Criterio de aceptación

$$F_{\text{analista (calc.)}} < F_{\text{tablas (0.05)}}$$

$$F_{\text{día (calc.)}} < F_{\text{tablas (0.05)}}$$

$$F_{\text{anal. - día (calc.)}} < F_{\text{tablas (0.05)}}$$

Anexo V.



- 1 Blanco
- 2 Placebo
- 3 Placebo cargado
- 4 Estándar

CONDICIONES DE BARRIDO

Span	1A
Vel. de la carta	2 cm/seg
Abs.	0.5
vel. longitud de onda	2mm/seg

LISTA DE REFERENCIAS

- [1] Wernimont, G., "Analytical Chemistry", 18, 587-592, (1946)
- [2] Youden, W.J.; Steiner, E.H.; "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", A.O.A.C., Washington, D.C., (1975).
- [3] Kavanagh, F., "Analytical Microbiology", Academic Press, N.Y.C. (1972)
- [4] "The Greenbrier Procedure", Pharm. Mfg. Assoc./ Q.C Section, Washington, D.C., (1977).
- [5] Mandel, J., "Interlaboratory Testing Techniques", A.S.G.A. Chem. Div. Tech. Supplement, Milwaukee, W.I., (1978).
- [6] De Voe, J., "Validation of the Measurement Process", A.C.S., Symposium Series, Washington, D.C., (1977).
- [7] Mc. Gonigle, E.J., Kaminski, E.E., "Analytical Method Validation", Chemical Institute of Canada, (1980).
- [8] British Pharmacopeia, Her Majesty's Stationery Office, London, U.K., 291, (1973).

- [9] Roushdi, I.M., El Sebai, A.I., Egypt J. Pharm. Sci., 15 (1) 81, (1974).
- [10] Gorog, S., Csizer, E., Acta Chim.(Budapest), 65 (1), 41, (1970).
- [11] Shroff, A.P., Grodsky, J., "Comparison of an Ultraviolet Spectrophotometric Assay and a Gas-Liquid Chromatographic Assay for 17 α -Ethinylestradiol 3-Methyl Ether", J. Pharm. Sci., 56 (4), 460-464, (1967)
- [12] Huettenrauch, R., Pharmazie, 20(11), 740, (1965).
- [13] Shroff, A.P., Huettermann, R.E., "Determination of 17 α - Ethinylestradiol 3- Methyl Ether in Tablets by a Colorimetric Assay". J. Pharm. Sci., 56(5), p.654-655, (1967).
- [14] Comer, J.P., Hartsaw, P., "Unit Tablet Assay of 17 α - Ethinylestradiol -3- Methyl Ether (Mestranol) by a Direct Colorimetric and an Automated Fluorometric Method", J. Pharm. Sci., 57(1), p.147-151, (1968).
- [15] Beyer, W.F. "Automated Colorimetric Analysis of Ethinyl Estradiol and Mestranol in Pharmaceutical Tablets", J. Pharm. Sci., 57 (8), 1415-1418, (1968).
- [16] Rizk, M., Analytical Chim. Acta, 65 (1), 220, (1973).

- [17] Beyermann, K., Roder, E., Z. Analyt. Chem., 230 (5), 347, (1967).
- [18] Templeton, R.J., "Comparative Study of a New Fluorometric Assay Mestranol Ether in Tablets with GLC and Colorimetric Assays", J. Pharm. Sci., 57 (7), 1168-1172, (1968).
- [19] Avdovich, H.W., Bowron, M., "NMR Analysis of Mestranol Bulk Drug". J. Pharm. Sci., 59 (12), p.1821-1824, (1970)
- [20] Brummer, C.A., Kunze, F.M., J. Ass. Offic. Anal. Chem., 53 (2), 234, (1970).
- [21] Hara, S., Hayashi, S., J. Chromatogr., 142, 689, (1977).
- [22] James, T., "Spectrophotofluorometric Determination of Mestranol in oral contraceptive tablets", J. Pharm. Sci., 59(11), p.1648-1649, (1970).

BIBLIOGRAFIA

1. ACS Committee on Environmental Improvement, "Guidelines for data acquisition and data Quality Evaluation in Environmental Chemistry", Analytical Chemistry, (52) 14, (1980), p. 2242- 2249.
2. Adrianus J. V.; Hardwidge. E. A.; "Guidelines for Assay Validation". Pharm. Tech., 5 (3), (1982).
3. American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standard's Part 41. "Standard Practice of calibration of volumetric ware", p. 763-767.
4. American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standards Part. "Standard Recommended Practice for use of the terms Precision and Accuracy as Applied to Measurement of a property of a materials", p. 938-960.
5. Boehliert, J.P. "Assay Development in Stability Test Methods". Drug Development and Industrial Pharmacy, 10 (8,9) p.1343-1371. (1984).
6. Comision Permanente de la Farmacopea. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, 5a. edici3n, p. 1313-14, (1988).

7. Day , R. A., "Quantitative Analysis", 3d. edition, Ed. Prentice Hall, New Jersey, 1974, p. 296.
8. Florey, K.; "Analytical Profiles Of Drug Substances". Vol. 11, Ed. Academic Press, N.Y., 1982, p.375-406.
9. Guerra, J.; Finkelson, M.J., "Validation of Analytical Method by FDA Laboratories I, II", Pharm. Tech. , 4(3), p. 74-84, (1986).
10. Khoury, A.J., Cali, L.J., "Automatic Determination of Ethynil Estradiol in Pharmaceutical Preparations", J. Pharm. Sci., 56 (11), (1967).
11. Lachman L., Liebermann, H.A., "The Theory and Practice of Industrial Pharmacy", 3a. edition, Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, p.832-833.
12. Loftus, B.T.; Nash, R.A.: "Pharmaceutical Process Validation. Marcel Dekker Inc.. USA, 1984, 1a. edition, p.251-266.
13. Martindale. "the Extra Pharmacopeia". 27 edition, Ed. Ainley Wade, 1977, Published by: The Pharmaceutical Press.
14. Massart, D.L.; Dijkstra, A.; "Evaluation and Optimiza-

tion of Laboratory Methods and Analytical Procedures", Elsevier Scientific Publishing Company, 1978, p.7-21.

15. Pharmacopeial Forum Stimuli to the revision Process Current Concepts for the Validation of Compendial Assays, United States Pharmacopeial Convention, 1986, p. 1241-1245.
16. Templeton, R.J., Arnett, N.A., "Comparative Study of a New Fluorometric Assay Mestranol Ether in Tablets with GLC and Colorimetric Assays", J. Pharm. Sci.; 57 (7), p.1168-1172, (1968).
17. Tsilifonis, D.C., Chafetz, L.; "Selective Colorimetric Determination of microgram amounts of Quinestrol and Ethynil Estradiol in Dosage Forms", J. Pharm. Sci.; 56 (5), p. 625-629, (1967).
18. United States Pharmacopeial Convention, "Pharmacopeial Forum in Process- revision. "Validation of Compendial Assays Guidelines". p.4129-4134, (1988).
19. Vogel, A.J., "Quimica Analitica Cuantitativa", Vol.I ed. Kapelus, Buenos Aires Argentina, 1960, p.268-275.